

ปริมาณสารทุติยภูมิของยอดหัวข้าวเย็น (*Dioscorea birmanica* Prain & Burkill) ในสภาพปลอดเชื้อที่ระยะเวลาเพาะเลี้ยงต่างกัน Secondary Metabolite Contents of *In Vitro* Hua-Khao-Yen (*Dioscorea birmanica* Prain & Burkill) Shoots at Different Culture Periods

รัชนิวรรณ จิระพงศ์พัฒนา, เยาวพา จิระเกียรติกุล* และภาณุมาศ ฤทธิไชย

ภาควิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

ศรีโสภา เรืองหนู และอรุณพร อธิรัตน์

ภาควิชาแพทย์แผนไทยประยุกต์ คณะแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

Ratchaneewan Jirapongpattana, Yaowapha Jirakiattikul* and Panumart Rithichai

Department of Agricultural Technology, Faculty of Science and Technology,

Thammasat University, Rangsit Centre, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

Srisopa Ruangnoo and Arunporn Itharat

Department of Applied Thai Traditional Medicine, Faculty of Medicine, Thammasat University,

Rangsit Centre, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

บทคัดย่อ

หัวข้าวเย็น (*Dioscorea birmanica* Prain & Burkill) เป็นพืชสมุนไพรที่นิยมใช้ส่วนของเหง้าร่วมกับสมุนไพรชนิดอื่น ๆ เพื่อรักษาโรคต่าง ๆ เช่น โรคกระษัย โรคน้ำเหลืองเสีย และโรคเอดส์ สารสำคัญที่พบคือ 3-O- α -L-rhamnopyranosyl (1 $\rightarrow$ 2)- β -D glucopyranoside หรือ prosapogenin A of dioscin (DBS1) ปริมาณสารทุติยภูมิของพืชในสภาพปลอดเชื้ออาจเปลี่ยนแปลงตามระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของระยะเวลาเพาะเลี้ยงต่อปริมาณสารทุติยภูมิและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของยอดหัวข้าวเย็นในสภาพปลอดเชื้อ โดยเพาะเลี้ยงข้อบนอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog) ที่เติม BA (6-benzyladenine) ความเข้มข้น 8.87 μ M IAA (3-indole-acetic acid) ความเข้มข้น 0.57 μ M และผงถ่าน 0.01 % เป็นเวลานาน 4-12 สัปดาห์ พบว่าปริมาณสาร DBS1 ของยอดที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน 8-12 สัปดาห์ (0.72 ± 0.16 ถึง 0.91 ± 0.11 % w/w) สูงกว่ายอดเพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน 4-6 สัปดาห์ ส่วนปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (54.17 ± 0.05

ถึง 68.14 ± 0.03 mg GAE/g dry extract) และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (EC_{50} 39.89 ± 2.14 ถึง 49.97 ± 9.23 μ g/ml) ไม่แตกต่างกันทางสถิติระหว่างระยะเวลาเพาะเลี้ยง

คำสำคัญ : DBS1; หัวข้าวเย็น; สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด; ระยะเวลาเพาะเลี้ยง; สารทุติยภูมิ

Abstract

Hua-Khao-Yen (*Dioscorea birmanica* Prain & Burkill) is a medicinal plant which its rhizome has been used with other medicinal plant species for the treatments of cancers, lymphatic diseases and AIDS. The important secondary metabolite of this plant is 3-O- α -L-rhamnopyranosyl(1 $\rightarrow$ 2)- β -D glucopyranoside or prosapogenin A of dioscin (DBS1). Secondary metabolite of micropropagated shoots may change during culture *in vitro*. Therefore, the objective of this study was to investigate effects of culture periods on secondary metabolite content and DPPH radical scavenging activity of *in vitro* Hua-Khao-Yen shoots. Single node segments were cultured on MS (Murashige and Skoog) medium supplemented with 8.87 μ M BA (6-benzyladenine), 0.57 μ M IAA (3-indoleacetic acid) and 0.01 % activated charcoal for 4-12 weeks. The results showed that the regenerated shoots cultured for 8-12 weeks exhibited the higher contents of DBS1 (0.72 ± 0.16 to 0.91 ± 0.11 % w/w) than those cultured for 4-6 weeks. The total phenolic contents (54.17 ± 0.05 to 68.14 ± 0.03 mg GAE/g dry extract) and DPPH radical scavenging activity (EC_{50} 39.89 ± 2.14 to 49.97 ± 9.23 μ g/ml) were not significantly different among the treatments.

Keywords: DBS1; *Dioscorea birmanica*; total phenolic; cultured period; secondary metabolite

1. บทนำ

หัวข้าวเย็น (*Dioscorea birmanica* Prain & Burkill) เป็นพืชสมุนไพรไทยชนิดหนึ่งที่อยู่ในวงศ์ Dioscoreaceae มีลักษณะเป็นไม้เถาเลื้อย มีลำต้นใต้ดินสะสมอาหารในเหง้า (rhizome) หมอพื้นบ้านนิยมใช้ส่วนเหง้าร่วมกับสมุนไพรชนิดอื่น เพื่อใช้เป็นยาลดการอักเสบ ยับยั้งเชื้อ เลือดเป็นพิษ และน้ำเหลืองเสีย [1] จากการศึกษาของ Jaiaree [2] ที่ทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอดจากสารสกัดหัวข้าวเย็น พบว่ามีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งปอดชนิด A 549 และ COR-L23 มีค่า IC_{50} เป็น 6.14 ± 0.08 และ 16.44 ± 1.23 μ g/ml ตามลำดับ แต่มีพิษน้อยต่อเซลล์ปกติชนิด

MRC-5 และได้นำสารสกัดมาสกัดเพื่อแยกสารอีกครั้ง พบ diosgenin-3-O- α -L-rhamnopyranosyl (1 $\rightarrow$ 2)- β -D glucopyranoside หรือ prosapogenin A of dioscin (DBS1) ที่มีฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอดสูงสุด โดยมีฤทธิ์ต้านมะเร็งปอดชนิด A 549 และ COR-L23 (IC_{50} = 1.81 ± 0.03 และ 1.84 ± 0.05 μ g/ml ตามลำดับ) แต่มีฤทธิ์น้อยในการต้านเซลล์ปกติที่ปอดชนิด MRC-5 (IC_{50} = 37.09 ± 0.67 μ g/ml) จากสมบัติของหัวข้าวเย็น หัวพันธุ์หรือเหง้าที่จะใช้ในการรักษาจึงควรมีอย่างเพียงพอกับความความต้องการที่จะใช้เพิ่มมากขึ้น แต่ในปัจจุบันหัวพันธุ์ที่นำมาใช้นั้นยังจำเป็นต้องเข้าไปเก็บในป่า ซึ่งการเก็บอย่างต่อเนื่องอาจส่งผลให้หัว

พันธุ์หายากขึ้นและสูญพันธุ์ไปในที่สุด พืชในสกุล *Dioscorea* สามารถขยายพันธุ์ได้ด้วยการเพาะเมล็ด แต่วิธีการขยายพันธุ์ดังกล่าวยังมีข้อจำกัด คือ เมล็ดมีการพักตัวและมีอัตราการงอกค่อนข้างต่ำ ส่วนการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ สามารถทำได้โดยการแบ่งเหง้า (Okezie และคณะ, 1994 อ้างโดย [3]) แต่ใช้ระยะเวลาค่อนข้างนานจึงจะสามารถผลิตต้นให้เพียงพอกับความต้องการได้ [4] นอกจากนี้ปริมาณสารสำคัญมักแปรผันตามสภาพแวดล้อมของพื้นที่ที่เก็บ ในปัจจุบันได้มีการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นอีกทางเลือกในการใช้เป็นแหล่งผลิตสารสำคัญทดแทนการผลิตสารจากการเพาะปลูกพืชตามธรรมชาติ เนื่องจากเซลล์พืชมีนครบถ้วน สามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในกระบวนการชีวสังเคราะห์ต่าง ๆ และสร้างสารสำคัญได้เช่นเดียวกับพืชที่ปลูกในสภาพธรรมชาติ การผลิตสารจึงสามารถทำได้อย่างต่อเนื่อง [5] อรุมา [6] ได้รายงานถึงการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) รวมถึงปริมาณสาร DBS1 ในยอดที่เพาะเลี้ยงอายุ 2 เดือน อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานถึงปริมาณสารทุติยภูมิของยอดหัวข้าวเย็นเมื่อเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อเป็นระยะเวลานานต่างกัน ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาผลของระยะเวลาเพาะเลี้ยงต่อปริมาณสารทุติยภูมิ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของยอดหัวข้าวเย็นในสภาพปลอดเชื้อ

2. อุปกรณ์และวิธีการ

นำยอดหัวข้าวเย็นที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 8.87 μM IAA ความเข้มข้น 0.57 μM ผงถ่าน 0.01 % น้ำตาลซูโครส 3 % และผงวุ้น 0.8 % มาตัดแบ่งเป็นข้อ ๆ เพาะเลี้ยงบนอาหารใหม่สูตรเดิมเป็นระยะเวลานานต่างกัน 5 ระยะเวลาย่อย คือ 4, 6, 8, 10 และ 12

สัปดาห์ เมื่อครบกำหนด บันทึกน้ำหนักสดของยอดที่พัฒนา จากนั้นนำยอดที่พัฒนาบนอาหารเพาะเลี้ยงไปอบที่อุณหภูมิ 50 $^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง บันทึกน้ำหนักแห้งต่อยอด นำตัวอย่างแห้งของพืชที่บดละเอียด 2 g ใส่ในขวดแก้ว สกัดด้วย chloroform 3 ครั้ง แต่ละครั้งนาน 3 วัน อัตราส่วนเนื้อเยื่อพืชแห้ง : chloroform เป็น 1:3 โดยปริมาตร กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 นำไประเหยให้แห้งใน hot air oven จากนั้นนำมาวิเคราะห์หาปริมาณสาร DBS1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH โดยมีวิธีการดังนี้

2.1 ปริมาณสาร DBS1 (Diosgenin-3-O- α -L-rhamnopyranosyl (1 $\rightarrow$ 2)- β -D Glucopyranoside)

วิเคราะห์ตามวิธีของ Jaiaree [2] โดยนำสารสกัดหัวข้าวเย็น 10 mg มาละลายด้วยตัวทำละลาย methanol และ acetonitrile (50:50) ปริมาตร 1 mL จากนั้นนำไป sonicate เป็นเวลา 1 นาที แล้วนำไปกรองผ่าน filter membrane ขนาด 0.45 μm ใส่ในขวด vial นำสารตัวอย่างที่ได้ฉีดเข้าเครื่อง HPLC (high performance liquid chromatography) ยี่ห้อ Agilent Technologies รุ่น Agilent Technologies 1200 Series (Analytical, USA) ปริมาตร 10 μL ตัวอย่าง ผ่าน guard column พร้อมกับ column ชนิด Agilent Eclipse XDB-C18[®] ขนาด 4.6x250 mm (5 μ) (Agilent, USA) ใช้ระบบ isocratic ในอัตราส่วน 50:50 (ใช้เวลา 60 นาที/ตัวอย่าง) โดยมี mobile phase คือ acetonitrile (A) และน้ำ (D) มีอัตราการเคลื่อนที่ของสารเท่ากับ 1 mL/นาที ใช้ความยาวคลื่น 194 nm และมีค่า retention time เท่ากับ 12.252 นาที

2.2 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic content)

วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu's colorimetric โดยดัดแปลงจากวิธีของ Folin and Ciocalteu [7] ละลายสารสกัดหัวข้าวเย็น 1 mg ด้วยตัวทำละลาย absolute ethanol (99.9 %) ปริมาตร 1 ml จากนั้นนำไป sonicate เป็นเวลา 1 นาที ปิดเตาสารละลายปริมาตร 20 μ l ใส่ในหลุม 96 well-microplates เติมสารละลาย 2 M Folin-Ciocalteu's reagent ที่เจือจาง 10 เท่า ปริมาตร 100 μ l และเติมสารละลาย 7.5 % w/v Na_2CO_3 ปริมาตร 80 μ l จากนั้นตั้งทิ้งไว้ใน 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบกำหนดเวลานำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm ด้วยเครื่อง microplate reader โดยใช้ absolute ethanol ปริมาตร 20 μ l ร่วมกับ Folin-Ciocalteu's reagent ปริมาตร 100 μ l และ 7.5 % w/v Na_2CO_3 ปริมาตร 80 μ l เป็น blank ของสารละลายตัวอย่าง

2.3ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging activity

การวิเคราะห์ที่ดัดแปลงจากวิธีของ Yamasaki และคณะ (1994) อ้างโดย Jaiarree [2] นำสารสกัดหัวข้าวเย็นมาละลายด้วยตัวทำละลาย absolute ethanol (99.9 %) ปริมาตร 1 ml จากนั้นนำไป sonicate เป็นเวลา 1 นาที ปิดเตาสารละลายตัวอย่างให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 200, 100, 50 และ 25 μ g/ml นำสารละลายตัวอย่างในแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 100 μ l ใส่ลงในหลุม 96 well-microplates และเติมสารละลาย DPPH ปริมาตร 100 μ l ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดนาน 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm ด้วยเครื่อง microplate reader โดยใช้สารละลายตัวอย่างความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 100 μ l และเติม absolute ethanol ปริมาตร 100 μ l เป็น

blank ของสารละลายตัวอย่าง และใช้ absolute ethanol ปริมาตร 100 μ l ร่วมกับสารละลาย DPPH ปริมาตร 100 μ l เป็น control จากนั้นคำนวณหาค่า EC_{50}

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 น้ำหนักสดและแห้ง

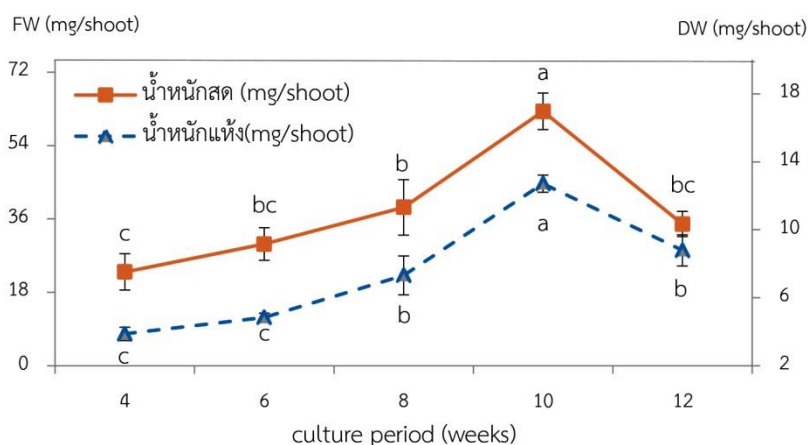
การเพาะเลี้ยงข้อของหัวข้าวเย็นบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 8.87 μ M IAA ความเข้มข้น 0.57 μ M และ ผงถ่าน 0.01 % เป็นระยะเวลา 4, 6, 8, 10 และ 12 สัปดาห์ พบว่ายอดที่พัฒนามีน้ำหนักสดและแห้งเพิ่มสูงขึ้นตามระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงในสัปดาห์ที่ 4-10 (รูปที่ 1) โดยยอดที่เพาะเลี้ยงนาน 4 และ 6 สัปดาห์ มีน้ำหนักสด (23.01 ± 4.44 และ 29.84 ± 3.97 mg/shoot ตามลำดับ) และ น้ำหนักแห้ง (3.88 ± 0.39 และ 4.85 ± 0.24 mg/shoot ตามลำดับ) น้อยที่สุด ส่วนยอดที่เพาะเลี้ยงนาน 10 สัปดาห์ มีน้ำหนักสดและแห้งสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเท่ากับ 62.37 ± 4.49 และ 12.72 ± 0.51 mg/shoot ตามลำดับ จากการที่ยอดมีการสะสม น้ำหนักสดและแห้งเพิ่มขึ้นในช่วงเวลาดังกล่าวเนื่องจากพืชมีการเจริญเติบโต และพัฒนาเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม สารควบคุมการเจริญเติบโตในอาหารเพาะเลี้ยงทำหน้าที่ควบคุมการแบ่งเซลล์ กระตุ้นการเจริญเติบโตทางลำต้นพืช และเพิ่มขนาดเซลล์ [8] เมื่อยอดอายุ 12 สัปดาห์ น้ำหนักสดและแห้งของยอดลดลงอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่า เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานานเกินไปจะมีผลต่อน้ำหนักสดและแห้งของยอด ทั้งนี้อาจเนื่องจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในอาหารเดิมเป็นระยะเวลานานจะทำให้พืชเกิดภาวะขาดอาหาร และมีของเสียที่เนื้อเยื่อปล่อยออกมาได้ [9] ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองของทิพย์สุคนธ์ [10] ที่

เพาะเลี้ยงข้อข้าวเย็นใต้ในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารเพาะเลี้ยงที่เติม BA ความเข้มข้น $8.87 \mu\text{M}$ เป็นเวลา 4-16 สัปดาห์ พบว่ายอดที่เพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ มีน้ำหนักสดและแห้งน้อยที่สุด ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับน้ำหนักสดและแห้งของยอดที่เพาะเลี้ยงนาน 6-16 สัปดาห์ ส่วนยอดที่เพาะเลี้ยงนาน 12 สัปดาห์ มีน้ำหนักสดและแห้งสูงสุด เท่ากับ 332.33 ± 5.49 และ $45.31 \pm 0.06 \text{ mg/shoot}$ ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติกับน้ำหนักสดและแห้งของยอดที่เพาะเลี้ยงนาน 14 และ 16 สัปดาห์ นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับ Tan และคณะ [11] ที่เพาะเลี้ยงแคลลัสของใบบัวบก [*Centella asiatica* L. (Urban)] เป็นระยะเวลา 22 วัน พบว่าน้ำหนักสดและแห้งของแคลลัสเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในช่วง 4 วันแรก และหลังจากวันที่ 6 น้ำหนักสดและแห้งของแคลลัสเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนถึงจุดการทดลอง เนื่องจากช่วง 6-22 วัน เป็นระยะ exponential phase เซลล์จึงมีการแบ่งตัวและเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ยังได้ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ใบบัวบกสายพันธุ์ UPM03 ในอาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 2 mg/l ร่วมกับ

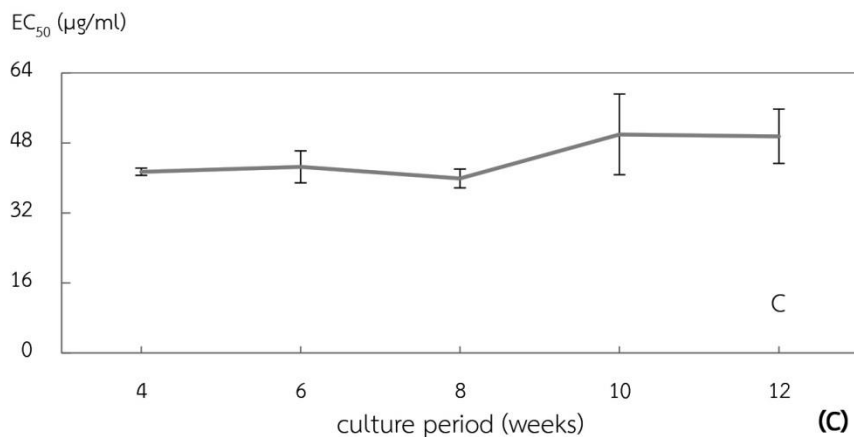
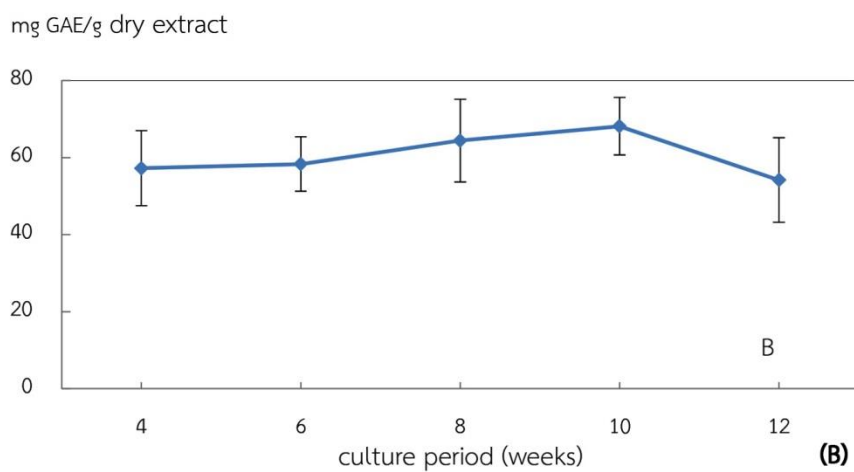
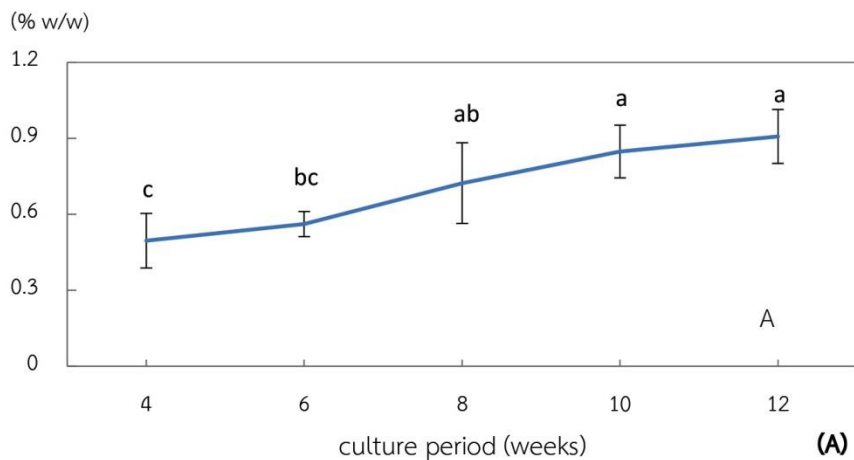
kinetin ความเข้มข้น 1 mg/l พบว่า น้ำหนักสดและแห้งของเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วตั้งแต่วันแรก และสูงสุดที่อายุ 14 วัน หลังจากนั้นน้ำหนักสดและแห้งจะลดลง ส่วนการเพาะเลี้ยงแคลลัสของ *Trigonella foenumgraecum* L. พบว่าน้ำหนักสดและแห้งของแคลลัสที่ได้จากชิ้นส่วนใบ ลำต้น และรากเพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ ในช่วง 15-28, 12-20 และ 10-15 วัน ตามลำดับ จากนั้นน้ำหนักสดและแห้งของแคลลัสจากทั้ง 3 ชิ้นส่วนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 28-45, 20-45 และ 15-30 วัน ตามลำดับ และคงที่ในช่วง 45-60, 45-60 และ 30-60 วัน ตามลำดับ [12] ดังนั้นจะเห็นได้ว่าพืชแต่ละชนิดมีระยะเวลาในการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันไปในสภาพปลอดเชื้อ

3.2 ปริมาณสาร DBS1

การวิเคราะห์หาปริมาณสาร DBS1 ของยอดที่พัฒนามาบนอาหารเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลาต่างกัน พบว่าปริมาณสาร DBS1 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตามระยะเวลาที่เพาะเลี้ยง (รูปที่ 2A) โดยยอดที่เพาะเลี้ยงนาน 8, 10 และ 12 สัปดาห์ มีปริมาณสาร DBS1 สูงสุด 0.72 ± 0.16 , 0.85 ± 0.10



รูปที่ 1 น้ำหนักสด (FW) และน้ำหนักแห้ง (DW) ของยอดหัวข้าวเย็นที่พัฒนามาบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น $8.87 \mu\text{M}$ IAA ความเข้มข้น $0.57 \mu\text{M}$ และผงถ่าน 0.01% เป็นระยะเวลานาน 4-12 สัปดาห์



รูปที่ 2 ปริมาณสาร DBS1 (A) ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (B) และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (C) ของยอดหัวข้าวเย็น (*D. birmanica* Prain & Burkill) ที่พัฒนาบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 8.87 μ M IAA ความเข้มข้น 0.57 μ M และผงถ่าน 0.01 % เป็นระยะเวลา 4-12 สัปดาห์

และ 0.91 ± 0.11 % w/w ตามลำดับ ส่วนยอดที่เพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ มีปริมาณสาร DBS1 น้อยที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเท่ากับ 0.50 ± 0.11 % w/w ซึ่งปริมาณสาร DBS1 ที่พบในยอดหัวข้าวเย็นนี้เป็นไปในทิศทางเดียวกันกับน้ำหนักสดและแห้งของยอด คือ ปริมาณสาร DBS1 เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง อย่างไรก็ตาม น้ำหนักสดและแห้งลดลงในสัปดาห์ที่ 12 ในขณะที่ปริมาณ DBS1 ยังคงเพิ่มขึ้นแต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับปริมาณสารที่พบในยอดอายุ 10 สัปดาห์ จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงมีผลต่อการสร้างและการสะสมสารสำคัญของหัวข้าวเย็น โดยการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารทุติยภูมิตามระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงนั้น จะแตกต่างกันไปตามชนิดของพืช เช่น ทิพย์สุคนธ์ [10] ได้รายงานถึงการเพาะเลี้ยงยอดของข้าวเย็นได้ในสภาพปลอดเชื้อ เป็นเวลา 4-16 สัปดาห์ พบว่ายอดที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน 4 และ 6 สัปดาห์ มีปริมาณสาร dioscorealide B น้อย (0.37 ± 0.17 และ 0.55 ± 0.08 % w/w) จากนั้นปริมาณสาร dioscorealide B จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 6-10 สัปดาห์ และสูงสุดเมื่อยอดอายุ 10 และ 12 สัปดาห์ (1.90 ± 0.18 และ 1.72 ± 0.06 % w/w) หลังจากนั้นปริมาณสาร dioscorealide B ของยอดลดลงอย่างมีนัยสำคัญในสัปดาห์ที่ 14 และ 16 สัปดาห์ (1.49 ± 0.09 และ 1.14 ± 0.06 % w/w) นอกจากนี้ Chen และ Chen [13] ที่เพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของ *Salvia miltiorrhiza* เป็นเวลา 5-16 วัน พบว่าปริมาณ total cryptotanshinone และ cryptotanshinone เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่เพาะเลี้ยง แต่ปริมาณ rosmarinic acid เพิ่มขึ้นสูงสุดเมื่ออายุ 10 วัน หลังจากนั้นปริมาณสารดังกล่าวลดลงเรื่อย ๆ ตามระยะเวลาการเพาะเลี้ยง หรือในเซลล์แขวนลอยของ *Dioscorea floribunda* ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6-18

วัน พบว่าปริมาณของ diosgenin มีแนวโน้มค่อนข้างคงที่ โดยสูงขึ้นเล็กน้อยเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 9 วัน และลดลงอีกเล็กน้อยจนสิ้นสุดการทดลอง [14] จากผลการทดลองนี้สนับสนุน วราภรณ์ [5] ที่ได้กล่าวไว้ว่าต้นอ่อนจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีคุณลักษณะทางพันธุกรรมที่คงไว้ซึ่งความสามารถในการผลิตสารทุติยภูมิเช่นเดียวกับการผลิตสารทุติยภูมิในสภาพธรรมชาติ อย่างไรก็ตาม ปริมาณสาร DBS1 ที่ได้จากยอดในสภาพปลอดเชื้อ มีปริมาณน้อย (0.50 ± 0.11 ถึง 0.91 ± 0.11 % w/w) เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณ DBS1 ที่สกัดได้จากส่วนของเหง้าที่ปลูกในธรรมชาติอายุมากกว่า 1 ปี ตามรายงานของ อรอุมา [6] โดยมีค่าเท่ากับ 3.27 % w/w แต่หากพิจารณาระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง จะเห็นได้ว่ายอดของหัวข้าวเย็นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถผลิตสาร DBS1 ได้เร็วกว่าการปลูกในธรรมชาติ โดยสามารถผลิตสาร DBS1 ได้ตั้งแต่ยอดอายุ 4 สัปดาห์ และมีปริมาณสาร DBS1 สูง 0.91 ± 0.11 % w/w ภายในเวลา 12 สัปดาห์ ซึ่งการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีข้อดีในการผลิตสารทุติยภูมิมากกว่าการเพาะปลูกในสภาพธรรมชาติ เนื่องจากสามารถควบคุมสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ในการเพาะเลี้ยงได้ ไม่ว่าจะเป็นแสง อุณหภูมิ ความชื้น สภาพอากาศ อาหารที่ใช้ในการเจริญเติบโต [5]

3.3 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic content)

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของยอดที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน 4-12 สัปดาห์ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (รูปที่ 2B) โดยสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมีค่าอยู่ในช่วง 54.17 ± 0.05 ถึง 68.14 ± 0.03 mg GAE/g dry extract แสดงให้เห็นว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของยอดไม่เปลี่ยนแปลงไปตามระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดอาจไม่ใช่สารทุติย

ภูมิหลักที่พืชชนิดนี้สร้างและสะสม จึงทำให้มีปริมาณการสะสมของสารประกอบฟีนอลิกค่อนข้างคงที่แม้เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานานต่างกัน แต่ปริมาณสารอาจเปลี่ยนแปลงเมื่อได้รับสารกระตุ้น โดยสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของหัวข้าวเย็นที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ มีค่าใกล้เคียงกับ อรอุมา [6] ที่ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของหัวข้าวเย็นในสภาพปลอดเชื้อที่อายุ 2 เดือน (44.24 ± 8.47 mg GAE/g dry extract) และสอดคล้องกับการศึกษาของทิพย์สุคนธ์ [10] ที่เพาะเลี้ยงยอดข้าวเย็นใต้ เป็นเวลา 4-16 สัปดาห์ พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดอยู่ระหว่าง 56.70 ± 5.76 ถึง 65.23 ± 3.05 mg GAE/g dry extract ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติระหว่างระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง อย่างไรก็ตาม ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของยอดหัวข้าวเย็นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนี้มีค่าน้อยกว่าปริมาณสารดังกล่าวที่พบในเหง้าอายุมากกว่า 1 ปี ซึ่งมีค่าเท่ากับ 259.27 ± 7.34 mg GAE/g dry extract [6]

3.4ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH

ยอดหัวข้าวเย็นมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ไม่แตกต่างกันทางสถิติเมื่อเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อเป็นระยะเวลา 4-12 สัปดาห์ (รูปที่ 2C) โดยมีค่า EC_{50} อยู่ในช่วง 39.89 ± 2.14 ถึง 49.97 ± 9.23 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งผลการทดลองนี้เป็นไปในทิศทางเดียวกันกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของยอดที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ คือระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงไม่ส่งผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH เนื่องจากพืชชนิดนี้อาจมีสารต้านอนุมูลอิสระ DPPH ในระดับต่ำ ถึงแม้จะเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานานสารต้านอนุมูลอิสระ DPPH ยังคงไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ ทิพย์สุคนธ์ [10] ที่กล่าวไว้ว่ายอดข้าวเย็นได้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ไม่แตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเพาะเลี้ยงยอดเป็น

เวลา 4-16 สัปดาห์ นอกจากนี้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่ตรวจพบในการศึกษารังนี้ใกล้เคียงกับ อรอุมา (2556) ที่รายงานไว้ว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของยอดหัวข้าวเย็นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่อายุ 2 เดือน มีค่า EC_{50} เท่ากับ 51.46 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งมีฤทธิ์น้อยกว่าในเหง้าที่มีค่า EC_{50} เท่ากับ 9.35 ± 0.62 $\mu\text{g/ml}$

4. สรุป

ยอดหัวข้าวเย็นที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อเป็นเวลานาน 8-12 สัปดาห์ มีปริมาณสาร DBS1 สูงสุด (0.72 ± 0.16 ถึง 0.91 ± 0.11 % w/w) ส่วนปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (54.17 ± 0.05 ถึง 68.14 ± 0.03 mg GAE/g dry extract) และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (39.89 ± 2.14 ถึง 49.97 ± 9.23 $\mu\text{g/ml}$) ไม่แตกต่างกันทางสถิติเมื่อเพาะเลี้ยงนาน 4-12 สัปดาห์

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดินของมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ 2557 และการวิจัยครั้งนี้ได้รับการสนับสนุนการวิจัยบางส่วนจากศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

6. รายการอ้างอิง

- [1] วิทย์ เทียงบุรณธรรม, 2538, พจนานุกรมสมุนไพรไทย ฉบับสรรพคุณยาไทย, โรงพิมพ์นิยมวิทยา, กรุงเทพฯ, 428 น.
- [2] Jaiaaree, N, 2010, Biological Activities of *Dioscorea birmanica* Prain & Burkill Extract and Its Active Ingredients, Dissertation in Medical Sciences, Faculty

- of Medicine, Thammasat University, Pathum Thani.
- [3] จันทรา แพร่เพ็ชร, 2547, การขยายพันธุ์มันม่วงในสภาพปลอดเชื้อ, วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.
- [4] Craufurd, P.Q., Summerfield, R.J., Asiedu, R. and Vara Prasad, P.V., 2001, Dormancy in yams, *Exp. Agr.* 37: 147-181.
- [5] วราภรณ์ ภูตะลุน, 2551, การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสมุนไพร : แนวทางการศึกษาเพื่อผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา, บริษัทขอนแก่นพิมพ์พัฒนา จำกัด, ขอนแก่น, 120 น.
- [6] อรุมา สองศรี, 2556, การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหัวข้าวเย็น (*Dioscorea birmanica* Prain & Burkill) และการสะสมสารทุติยภูมิ, วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์, ปทุมธานี.
- [7] Folin, O. and Ciocalteu, V., 1927, On tyrosine and tryptophan determination in proteins, *J. Biol. Chem.* 27: 627-650.
- [8] คำคุณ กาญจนภูมิ, 2542, การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช, สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ, 162 น.
- [9] Rout, G.R., Samantaray, S. and Das, P. 2000, *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants, *Biotechnol. Adv.* 18: 91-120.
- [10] ทิพย์สุคนธ์ บุญเย็น, 2557, ผลของ Jasmonic acid และ Salicylic acid ต่อปริมาณ dioscorealide B ในการเพาะเลี้ยงยอดของข้าวเย็นใต้ (*Dioscorea membranacea* Pierre ex Prain & Burkill), วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์, ปทุมธานี.
- [11] Tan, S.H., Musa, R., Ariff, A. and Maziah, M., 2010, Effect of plant growth regulators on callus, cell suspension and cell line selection for flavonoid production from Pegaga (*Centella asiatica* L. urban), *Am. J. Biochem. & Biotech.* 6: 284-299.
- [12] Oncina, R., Del Rio, J.A., Gomez, P. and Ortuno, A., 2002, Effect of ethylene on diosgenin accumulation in callus cultures of *Trigonella foenumgraecum* L., *Food Chem.* 76: 475-479.
- [13] Chen, H. and Chen, F., 2000, Effect of yeast elicitor on the secondary metabolism of Ti-transformed *Salvia miltiorrhiza* cell suspension culture, *Plant Cell Rep.* 19: 710-717.
- [14] De, D. and De, B., 2005, Elicitation of diosgenin production in *Dioscorea floribunda* by ethylene-generating agent, *Fitoterapia* 76: 153-156.