รายงานการวิจัย

เรื่อง

การเหนี่ยวนำการสร้างสารแนพโธควิโนน ในเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงของต้นทองพันชั่ง

Induction of Naphthoquinone Formation in *Rhinacanthus nasutus* (Linn.) Kurz Tissue Cultures

ภาคภูมิ พาณิชยูปการนันท์

สมอ
เลขหมู่ QK725 ภ162 2542 ฉ.1
Bib Key 212120
18 ก.ค. 2544

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินรายได้มหาวิทยาลัย วิทยาเขตหาดใหญ่
ประเภททั่วไป ประจำปีงบประมาณ 2540

บทคัดย่อ

เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงทองพันชั่งถูกสร้างขึ้นจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบและเนื้อเยื่อตาข้างของทองพันชั่งในสูตรอาหาร Murashige-Skoog (MS) และ Gamborg B5 (B5) ที่เสริมด้วยฮอร์โมนออกซินและไซโตไคนิน ชนิดและความเข้มข้นต่างๆ กัน เพื่อศึกษาความสามารถในการสร้างสาร naphthoquinone จากการศึกษาพบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสำหรับการสร้างคัลลัสและเซลล์เพาะเลี้ยงทองพันชั่งคือ สูตรอาหาร MS เสริมด้วยฮอร์โมน 2,4-D 1.0 mg/l และ kinetin 3.0 mg/l ส่วนสูตรอาหารที่เหมาะสำหรับการสร้างยอดเพาะเลี้ยงทองพันชั่งคือ สูตรอาหาร MS เสริมด้วยฮอร์โมน IBA 2.0 mg/l และ BA 2.0 mg/l หรือ MS เสริมด้วยฮอร์โมน IBA 2.0 mg/l และ BA 1.0 mg/l การศึกษาการสร้างสาร naphthoquinone ในเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงของทองพันชั่งพบว่าสาร naphthoquinone ที่ตรวจพบในเนื้อเยื่อทองพันชั่งคือ rhinacanthin-C และพบว่าเซลล์เพาะเลี้ยงของทองพันชั่งในสูตรอาหาร MS เสริมด้วยฮอร์โมน 2,4-D 2.0 mg/l และ kinetin 2.0 mg/l สามารถสร้างสาร rhinacanthin-C ได้ แต่เมื่อทำการ subculture เพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ไปเรื่อยๆ กลับมีผลทำให้ความสามารถในการสร้างสาร rhinacanthin-C ของเซลล์เพาะเลี้ยงหายไป เนื่องจากความไม่คงตัวในการสร้างสารทุติยภูมิของเซลล์เพาะเลี้ยง ในขณะที่สูตรอาหารที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำให้ยอดเพาะเลี้ยงของทองพันชั่งสร้างและเก็บสะสมสาร rhinacanthin-C ปริมาณสูงที่สุด (0.1446%w/w) คือ สูตรอาหาร B5 เสริมด้วยฮอร์โมน BA 2.0 mg/l และ IAA 2.0 mg/l แต่ปริมาณ rhinacanthin-C ที่ตรวจพบในยอดเพาะเลี้ยงของทองพันชั่งยังน้อยกว่าปริมาณ rhinacanthin-C ที่พบในใบทองพันชั่งตามธรรมชาติ (0.5194 %w/w)

สารบัญ

		หน้า
กิตติกรรมประกาศ		ก
สารบัญ		ข
สารบัญรูปภาพ		ง
สารบัญตาราง		จ
บทคัดย่อ		ฉ
บทที่ 1	บทนำ	1
	ข้อมูลทางพฤกษศาสตร์ของทองพันชั่ง	1
	ประโยชน์ของทองพันชั่ง	3
	สารเคมีที่พบในทองพันชั่ง	4
	ฤทธิ์ทางชีวภาพของทองพันชั่ง	9
	การศึกษาความเป็นพิษของทองพันชั่ง	15
บทที่ 2	อุปกรณ์และสารเคมี	16
	ตัวอย่างพืช	16
	เครื่องมือและอุปกรณ์	16
	สารเคมี	17
	อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	18
บทที่ 3	การทดลอง	20
	สภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทองพันชั่ง	20
	การทดลองหาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อทองพันชั่ง	20
	การสกัดและแยกสาร naphthoquinone จากใบทองพันชั่งในธรรมชาติ	22
	การพิสูจน์เอกลักษณ์สาร Rn1	23
	การตรวจความสามารถในการสร้างสารและการวิเคราะห์ปริมาณสาร naphthoquinone ในเนื้อเยื่อทองพันชั่ง	23
บทที่ 4	ผลการทดลอง	26
	การทำ callus culture ของต้นทองพันชั่ง	26
	การเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยงของทองพันชั่ง	26
	การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับการเจริญเติบโตของเซลล์เพาะเลี้ยงของทองพันชั่ง	28

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
การหาชนิดและความเข้มข้นของฮอร์โมนออกซินที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อตาข้าง	29
การหาความเข้มข้นของไซโตไคนินที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อตาข้าง	30
การพิสูจน์เอกลักษณ์	34
การตรวจหาการสร้างสาร naphthoquinone จากเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงของทองพันชั่ง	34
การวิเคราะห์หาปริมาณ rhinacanthin-C ในเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงทองพันชั่ง	39
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	41
เอกสารอ้างอิง	42

สารบัญรูปภาพ

รูปที่		หน้า
1	ทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasutus*)	2
2	โครงสร้างของ rhinacanthin-A, -B, -O, และ -P	4
3	โครงสร้างของ rhinacanthin-C, -D, -G, -H, -I, -J, -K, -L, -M, -N และ -Q	5
4	โครงสร้างของ โครงสร้างของ 3,4-dihydro-3,3-dimethyl-2H-naphtho-{2,3-B} pyran-5,6-dione และ 3,4-dihydro-3,3-dimethyl-2H-naphtho-{2,3-B} pyran-5,10-dione	6
5	โครงสร้างของ rhinacanthin-E และ -F	6
6	คัลลัสของทองพันชั่ง	27
7	ความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับการเจริญเติบโตของเซลล์เพาะเลี้ยงทองพันชั่งที่เลี้ยงในสูตรอาหาร E3	28
8	ความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับการเจริญเติบโตของเซลล์เพาะเลี้ยงทองพันชั่งที่เลี้ยงในสูตรอาหาร E5	29
9	การเจริญเป็นยอดของเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงทองพันชั่งในสูตรอาหาร MS	33
10	การเกิดคัลลัสของเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงทองพันชั่งในสูตรอาหาร MS	33
11	โครงสร้างของ rhinacanthin-C	34
12	TLC chromatogram ของสารสกัดจากเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงทองพันชั่ง	36
13	โครมาโตแกรมของสารสกัดจากเนื้อเยื่อทองพันชั่งเปรียบเทียบกับ rhinacanthin-C	37
14	UV absorption spectrum ของสารมาตรฐาน rhinacanthin-C เปรียบเทียบกับ spot สารในสารสกัดจากเนื้อเยื่อทองพันชั่ง	38
15	calibration curve ของสารมาตรฐาน rhinacanthin-C	39

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	คุณสมบัติต่างๆ ของสารควิโนนที่พบในทองพันชั่ง	9
2	ผลของสารสกัดใบทองพันชั่งในการลดความดันโลหิตในหนูขาว	10
3	ผลการต้านเชื้อไวรัสของ rhinacanthin-C และ rhinacanthin-D	11
4	ผลการต้านเชื้อไวรัสของ rhinacanthin-E และ rhinacanthin-F	12
5	ฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งของสารกลุ่ม naphthoquinone และ flavonoid	13
6	ผลของสารในกลุ่ม naphthoquinone และ flavonoid ที่พบในทองพันชั่งต่อการเกาะกลุ่มของเกร็ดเลือด	14
7	stock solution ของสูตรอาหาร MS และ B5	18
8	ปริมาณ stock solution ที่ใช้เตรียมอาหารสูตร MS และ B5	19
9	สูตรอาหารมาตรฐาน B5 และ MS เสริมด้วยฮอร์โมนพืชชนิดต่างๆ	20
10	การเปลี่ยนแปลงปริมาณของ 2,4-D และ kinetin ในสูตรอาหาร MS	21
11	การเปลี่ยนแปรชนิดและความเข้มข้นของฮอร์โมนออกซินในสูตรอาหาร B5 ที่เสริมด้วย BA 2 mg/l	22
12	การเปลี่ยนแปรชนิดและความเข้มข้นของฮอร์โมนออกซินและไซโตไคนินในสูตรอาหาร B5 และ MS	22
13	การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อตาข้างของทองพันชั่ง (อายุ 1 เดือน) ในสูตรอาหาร B5	30
14	การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อตาข้างของทองพันชั่ง (อายุ 1 เดือน) ในสูตรอาหาร B5 และ MS	31
15	การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อตาข้างของทองพันชั่ง (อายุ 2 เดือน) ในสูตรอาหาร B5 และ MS	32
16	ปริมาณ rhinacanthin -C ที่ตรวจพบในเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงทองพันชั่ง	40

บทที่ 1
บทนำ

1. ข้อมูลทางพฤกษศาสตร์ของทองพันชั่ง

(โครงการสมุนไพรเพื่อการพึ่งตนเอง, 2530 ; นันทวัน บุณยะประภัศร, 2530)

ชื่อวิทยาศาสตร์	*Rhinacanthus nasutus* (Linn.) Kurz
ชื่อวงศ์	Acanthaceae
ชื่อพื้นเมืองอื่นๆ	หญ้ามันไก่, ทองพันชั่ง (ชื่อไทย)
	แปะเฮาะเล่งจือ (ชื่อจีน)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

เป็นพืชล้มลุกกึ่งไม้พุ่มเตี้ย สูงไม่เกิน 1.5 เมตร มักแตกหน่อและแผ่กิ่งก้านออกเป็นกอ ลำต้นและกิ่งก้านมีขนประปรายทั่วไป กิ่งอ่อนมักเป็นสันสี่เหลี่ยมตามยาว

ใบ เป็นใบเดี่ยว รูปมน กว้าง 2-3 ซม. ยาว 4-6 ซม. โคนและปลายใบสอบเรียวออก เป็นคู่ๆ ตรงข้ามกัน และแต่ละคู่ออกสลับทิศทางกัน เนื้อใบบางและเกลี้ยง ขอบใบเรียบหรือเป็นคลื่นบ้างเล็กน้อย (รูปที่ 1)

ดอก สีขาวคล้ายนกกระยาง ออกเป็นช่อสั้นๆ ตามง่ามใบ ดอกรวมกันเป็นหลอดรูปทรงสูง ปลายแยกเป็นสองกลีบ ปลายกลีบล่างห้อยย้อยลง และหยักเป็นสามลอน กลีบบนชี้ตั้งขึ้น ปลายแยกเป็นสามลอน โคนกลีบมีจุดประสีม่วงแดง เกสรตัวผู้สีน้ำตาลอ่อนมีสองอันยื่นพ้นปากหลอดออกมาเล็กน้อย รังไข่มี 1 อัน รูปยาวรี มีหลอดท่อรังไข่คล้ายเส้นด้าย ยาวเสมอปากหลอดดอก แต่ชาวสุรินทร์เห็นว่าดอกทองพันชั่งคล้ายข้าวเม่า คือ มีกลีบดอกสี่กลีบตกออกคล้ายข้าวเม่า จึงเรียกต้นทองพันชั่งว่า "ผกาอ็อมบก" แปลว่า ต้นดอกข้าวเม่า (รูปที่ 1)

ผล เป็นฝักยาวมีขนสั้นๆ คลุม ภายในมี 4 เมล็ด

นิเวศวิทยาและการกระจายพันธุ์

ส่วนใหญ่นิยมปลูกเป็นไม้ประดับ และใช้เป็นยาพื้นบ้านตามบ้านเรือน ทองพันชั่งเป็นพืชที่ไม่ชอบร่มเงามากนัก ชอบที่ดินปนทราย การระบายน้ำดีไม่ขังแฉะ แต่ต้องคอยรดน้ำให้ดินชุ่มอยู่เสมอใบจึงจะงาม ถ้าดินขาดน้ำหรือถูกแดดมากไปใบจะมีจุดสีเหลือง

การขยายพันธุ์

ใช้เมล็ดเพาะ หรือเอากิ่งปักชำ

รูปที่ 1 ทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasutus*)

การเก็บมาใช้

ควรเก็บใบและรากจากต้นที่สมบูรณ์แข็งแรงได้รับปุ๋ย, แสงแดด และน้ำเพียงพอ กล่าวคือใบไม่มีจุดเหลือง มีสีเขียวสดเป็นมัน และควรเลือกเก็บจากต้นที่มีอายุเกิน 1 ปี หรือออกดอกแล้ว

2. ประโยชน์ของทองพันชั่ง

งานสาธารณสุขมูลฐาน

ใช้ทองพันชั่งในการรักษากลากเกลื้อน โดยใช้ใบ (สดหรือแห้ง) หรือราก (สดหรือแห้ง) ตำให้ละเอียด แช่เหล้าหรือแอลกอฮอล์พอท่วมตั้งไว้ 7 วัน นำน้ำยาที่ได้มาทาบริเวณที่เป็นบ่อยๆ หรือทาวันละ 3-4 ครั้ง จนกว่าจะหาย เมื่อหายแล้วให้ทาต่ออีก 7 วัน (มาโนช วามานนท์ และ เพ็ญนภา ทรัพย์เจริญ, 2537)

เหตุที่ต้องแช่ไว้นาน 7 วัน เป็นเพราะน้ำยาที่ยังแช่ไม่ครบกำหนดจะมีฤทธิ์กัดผิวหนัง ถ้านำไปทาจะทำให้ผิวหนังแสบและคันมากขึ้น น้ำยาจากรากแห้งกัดผิวมากกว่าใบแห้ง ส่วนน้ำยาจากใบสดไม่กัดผิว

ข้อควรระวัง บางคนอาจแพ้ทองพันชั่งได้ คือ ทาแล้วมีเม็ดตุ่มขึ้น ต่อมาแตกมีน้ำเหลืองซึมออกมา ผิวหนังเปื่อยมากขึ้น ทำให้โรคกำเริบลุกลาม ควรหยุดทาทันที (โครงการสมุนไพรเพื่อการพึ่งตนเอง, 2530)

ตำรายาแผนไทย (นันทวัน บุณยะประภัศร, 2530)

ในตำรายาแผนไทยได้บ่งสรรพคุณของทองพันชั่งในการบำบัดรักษาโรคต่างๆ โดยแบ่งเป็นแต่ละส่วนของพืชต่อไปนี้ คือ

ราก รักษาโรคผิวหนัง กลากเกลื้อน รักษาโรคมะเร็ง ดับพิษไข้ แก้พิษงู พยาธิวงแหวนตามผิวหนัง

ทั้งต้น รักษาโรคผิวหนัง กลากเกลื้อน แก้น้ำเหลืองเสีย ผื่นคัน รักษามะเร็ง ขับพยาธิตามผิวหนังหรือบาดแผล รักษาอาการไส้เลื่อน ปัสสาวะผิดปกติ

ต้น บำรุงร่างกาย รักษาอาการผมร่วง

ใบ ดับพิษไข้ รักษาโรคผิวหนัง ผื่นคัน กลากเกลื้อน โรคไขข้ออักเสบ โรคมะเร็ง โรคความดันโลหิตสูง โรคพยาธิวงแหวนตามผิวหนัง อาการผมร่วง ปวดฝี แก้พิษ ถอนพิษ แก้อักเสบ และบำรุงร่างกาย

การใช้ในประเทศไต้หวัน

ในประเทศไต้หวันใช้ทองพันชั่งเป็นยาพื้นบ้านในการบำบัดรักษาโรคเบาหวาน โรคผิวหนัง ความดันโลหิตสูง และตับอักเสบ (Wu, *et al.*, 1995)

3. สารเคมีที่พบในทองพันชั่ง

สารประกอบที่พบในส่วนต่างๆ ของทองพันชั่งมีด้วยกันหลายกลุ่มได้แก่

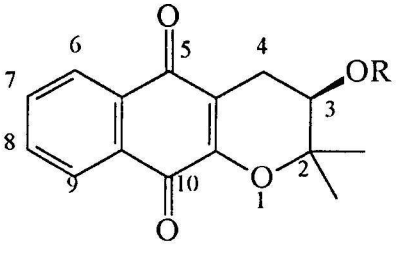
3.1 Naphthoquinones

ปัจจุบันพบสารในกลุ่มนี้ 17 ชนิด ได้แก่

rhinacanthin-A, -B, -C, -D, -G, -H, -I, -J, -K, -L, -M, -N, -O, -P, -Q (Wu, *et al.*, 1988; Wu, *et al.*, 1998a, b; Sendl, et al., 1996), rhinacanthone, และ

3,4-dihydro-3,3-dimethyl-2H-naphtho-{2,3-B}pyran-5,10-dione (Kuwahara, *et al.*, 1995; Kodama, *et al.*, 1993)

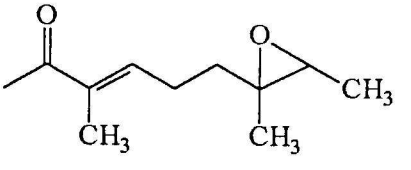
rhinacanthin-A, -B, -O, และ -P มีโครงสร้างหลักเหมือนกัน ต่างกันที่หมู่ R (รูปที่ 2)



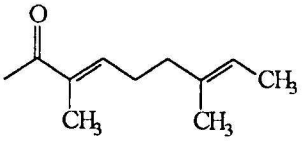
Rhinacanthin

A:R= H

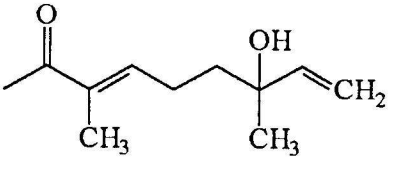
O : R=



B:R=

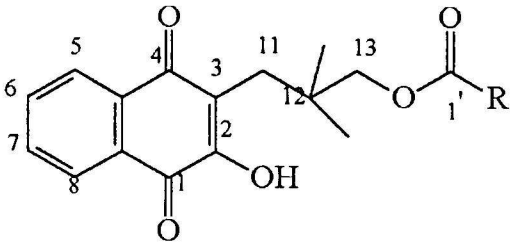


P : R=

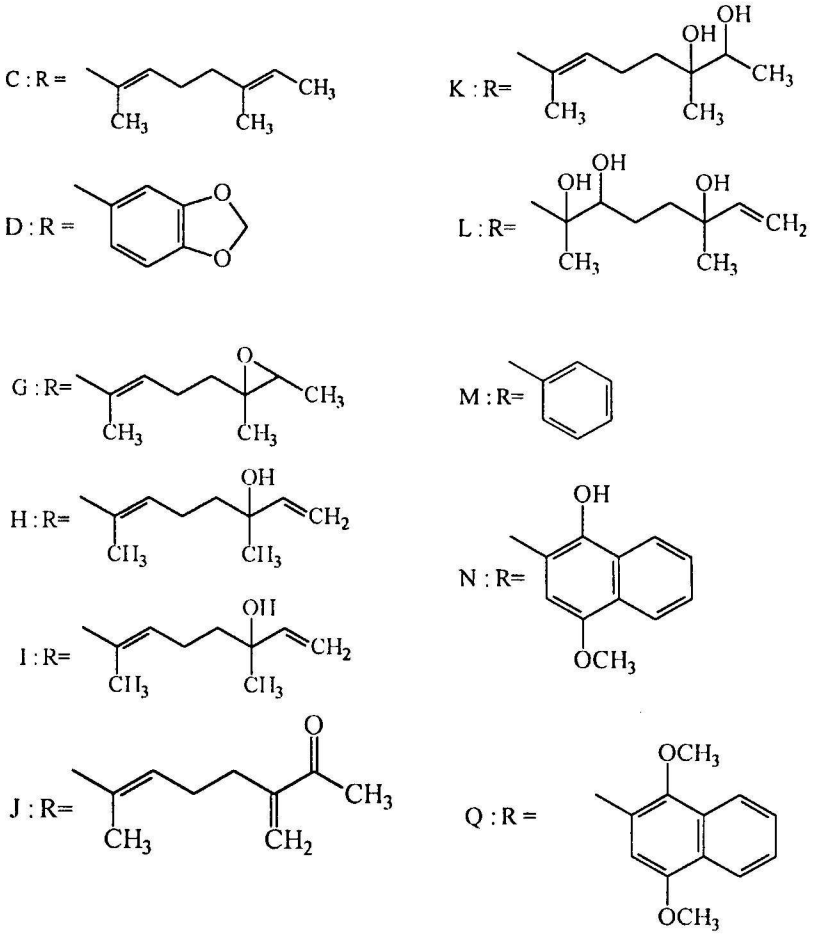


รูปที่ 2 โครงสร้างของ rhinacanthin-A, -B, -O, และ -P

rhinacanthin-C, -D, -G, -H, -I, -J, -K, -L, -M, -N และ -Q มีโครงสร้างหลักเหมือนกัน ต่างกันที่ หมู่ R (รูปที่ 3)

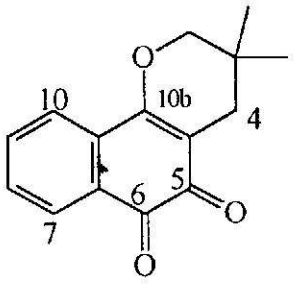


rhinacanthin

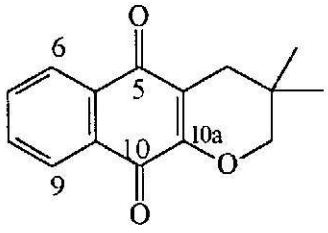


รูปที่ 3 โครงสร้างของ rhinacanthin-C, -D, -G, -H, -I, -J, -K, -L, -M, -N และ -Q

rhinacanthone ได้แก่ 3,4-dihydro-3,3-dimethyl-2H-naphtho-{2,3-B}pyran-5,6-dione เป็น *O*-quinone analogous ของ *β*-lapachone และ 3,4-dihydro-3,3-dimethyl-2H-naphtho-{2,3-B} pyran-5,10-dione เป็น *p*-quinone (รูปที่ 4)



(a)



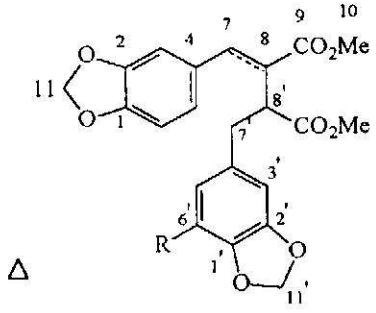
(b)

รูปที่ 4 โครงสร้างของ 3,4-dihydro-3,3-dimethyl-2H-naphtho-{2,3-B}pyran-5,6-dione (a) และ 3,4-dihydro-3,3-dimethyl-2H-naphtho-{2,3-B}pyran-5,10-dione (b)

3.2 Lignan

พบสารในกลุ่มนี้ 2 ชนิด ได้แก่

rhinacanthin-E และ -F (Kernan, *et al.*, 1997) โดย rhinacanthin-F เป็น dihydro derivative ของ rhinacanthin-E (รูปที่ 5)



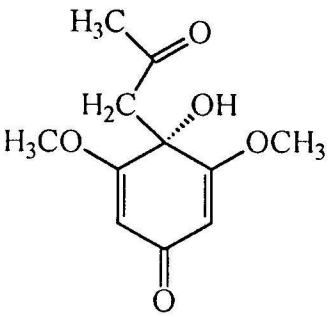
Δ

rhinacanthin-E : R = OCH_3 , 7E rhinacanthin-F : R = OCH_3

รูปที่ 5 โครงสร้างของ rhinacanthin-E และ -F

3.3 Quinol

ได้แก่ 4-acetonyl-3,5-dimethoxy-*p*-quinol (Wu, *et al.*, 1995) (รูปที่ 6)



รูปที่ 6 โครงสร้างของ 4-acetonyl-3,5-dimethoxy-*p*-quinol

3.4 Anthraquinone

ได้แก่ 2-methylanthraquinone พบในใบและต้นทองพันชั่ง (Wu, *et al.*, 1995)

3.5 Benzenoid

พบสารกลุ่มนี้ 6 ชนิด ได้แก่

p-hydroxy-benzaldehyde	พบในราก
methyl-vanillate	พบในราก
syringaldehyde	พบในราก
2-methoxy-4-propionyl-phenol	พบในใบและลำต้น
สารผสมระหว่าง syringic acid กับ vanillic acid	พบในใบและลำต้น

(Wu, *et al.*, 1995)

3.6 Triterpenoid

พบสารในกลุ่มนี้ 3 ชนิด ได้แก่

β-amyrin	พบในใบและลำต้นทองพันชั่ง
glutinol	พบในใบและลำต้นทองพันชั่ง
lupeol	พบในราก, ใบและลำต้นทองพันชั่ง

(Wu, *et al.*, 1995)

3.7 Coumarin

พบสารในกลุ่มนี้ 2 ชนิด ได้แก่

(+)-praeruptorin	พบในรากทองพันชั่ง
umbelliferone	พบในใบและลำต้นทองพันชั่ง

(Wu, *et al.*, 1995)

3.8 Flavonoid

พบสารกลุ่มนี้ 2 ชนิด ในรากทองพันชั่ง ได้แก่

wogonin

oroxylin

(Wu, *et al.*, 1998a)

3.9 Steroid

พบสารกลุ่มนี้ 4 ชนิด ในใบและต้นทองพันชั่ง ได้แก่

สารผสมระหว่าง stigmasteral กับ sitosterol

สารผสมระหว่าง stigmast-4-en-3-one กับ stigmasta-4-22-dien-3-one

สารผสมระหว่าง stigmast-22-en-3-one กับ stigmastan-3-one

สารผสมระหว่าง 6-β-hydroxystigmasta-4,22-dien-3-one กับ 6 β-hydroxystigmast-4-en-3-one

(Wu, *et al.*, 1995)

3.10 Glycoside

พบสารกลุ่มนี้ 4 ชนิด ในใบและลำต้นทองพันชั่ง ได้แก่

สารผสมระหว่าง stigmasterol-β-D-glucopyranoside กับ stigmasterol-β-D-glucopyranoside,

3,4-dimethoxyphenol-β-D-glucopyranoside,

3,4,5-trimethoxyphenol-β-D-glucopyranoside

(Wu, *et al.*, 1995)

3.11 Carbohydrate

ได้แก่ methyl-α-D-galactopyranoside พบในใบและลำต้นทองพันชั่ง (Wu, *et al.*, 1995)

3.12 Amide

ได้แก่ allantoin พบในรากทองพันชั่ง (Wu, *et al.*, 1998a)

3.13 Chlorophyll

ได้แก่ methyl pheophorbide-A พบในใบและลำต้นทองพันชั่ง (Wu, *et al.*, 1995)

3.14 Rutin

ได้แก่ quercetin-3-rutinoside พบในดอกของทองพันชั่ง (Wu, *et al.*, 1995)

ตารางที่ 1 คุณสมบัติต่างๆ ของสารควิโนนที่พบในทองพันชั่ง

สาร	สูตรโมเลกุล	MW	ลักษณะสาร	mp (^{o}C)	ส่วนที่พบ
Rhinacanthin-A	$C_{15}H_{14}O_4$	-	ผลึกรูปเข็มสีส้ม	186.5-187	ราก
Rhinacanthin-B	$C_{25}H_{28}O_5$	408.1960	ผลึกรูปเข็มสีเหลือง	78.8	ราก
Rhinacanthin-C	$C_{25}H_{30}O_5$	410.2903	น้ำมันสีเหลือง	-	ราก, ทั้งต้น
Rhinacanthin-D	$C_{23}H_{20}O_7$	408.1209	ผงสีเหลือง	-	ราก, ทั้งต้น
Rhinacanthin-E	$C_{23}H_{22}O_9$	442.1264	ผง	-	ทั้งต้น
Rhinacanthin-F	$C_{23}H_{24}O_9$	444.1420	ผง	-	ทั้งต้น
Rhinacanthin-G	$C_{25}H_{30}O_6$	426.2044	น้ำมันสีเหลือง	-	ราก
Rhinacanthin-H	$C_{25}H_{30}O_6$	426.2044	น้ำมันสีน้ำตาลแดง	-	ราก
Rhinacanthin-I	$C_{25}H_{30}O_6$	426.2044	น้ำมันสีน้ำตาลแดง	-	ราก
Rhinacanthin-J	$C_{25}H_{28}O_6$	424.1886	น้ำมันสีส้ม	-	ราก
Rhinacanthin-K	$C_{32}H_{25}O_7$	444.2148	น้ำมันสีแดง	-	ราก
Rhinacanthin-L	$C_{25}H_{32}O_8$	-	น้ำมันสีแดง	-	ราก
Rhinacanthin-M	$C_{22}H_{20}O_5$	364.1311	น้ำมันสีส้ม	-	ราก
Rhinacanthin-N	$C_{27}H_{24}O_7$	460.1522	ผลึกรูปเข็มสีส้ม	123-124	ราก
Rhinacanthin-O	$C_{25}H_{28}O_6$	424.1886	น้ำมันสีเหลือง	-	ราก
Rhinacanthin-P	$C_{25}H_{28}O_6$	424.1886	น้ำมันสีเหลือง	-	ราก
Rhinacanthin-Q	$C_{28}H_{26}O_7$	474.1684	ผลึกรูปเข็มสีส้ม	116-117	ราก
Rhinacanthone	$C_{15}H_{14}O_3$	242.0942	ผลึกรูปเข็มสีส้ม	151.5-152	ราก
p-quinone	$C_{15}H_{14}O_3$	242.0942	ผลึกรูปเข็มสีเหลืองสด	150.5-152	ราก
Quinol	$C_{11}H_{14}O_5$	226.0846	ผลึกรูปเข็ม	153-155	ใบ, ต้น

4. ฤทธิ์ทางชีวภาพของทองพันชั่ง

4.1 ฤทธิ์ลดความดันโลหิต (วรรณดี แต้โสตถิกุล, 2528)

จากรายงานการศึกษาโดยใช้สารสกัดใบทองพันชั่งด้วยน้ำ ทำการทดสอบในหนูขาวไม่จำกัดเพศ น้ำหนักตัวประมาณ 200-250 g โดยให้สารสกัดใบทองพันชั่งทาง external jugular vein ในขนาดต่างๆ กัน คือ 25, 50, 100, 200 และ 400 mg/kg พบว่าฤทธิ์ลดความดันโลหิตจะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มขนาดของสารสกัด ซึ่งจะลดความดันโลหิตมากที่สุดเมื่อใช้สารสกัดในขนาด 400 mg/kg และใช้เวลานานกว่า 60 นาที จึงจะทำให้ความดันโลหิตกลับคืนสู่ระดับปกติก่อนให้สารสกัด (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ผลของสารสกัดใบทองพันชั่งในการลดความดันโลหิตในหนูขาว

ขนาด (มก./กก. น้ำหนักตัว)	จำนวนหนูขาว (ตัว)	ความดันโลหิต* (MABP)			ระยะเวลาในการออกฤทธิ์ (นาที)
		ระยะ control (มม. ปรอท)	หลังจากให้สารสกัด (มม. ปรอท)	% ความดันโลหิตลด	
25	4	145.00 ± 3.33	101.50 ± 8.13	30.04 ±4.05***	~5
50	4	142.50 ±0.84	84.33 ± 5.18	40.84 ± 3.39***	~20
100	4	137.50 ± 4.12	75.00 ± 2.36	45.30 ± 2.50**	~25
200	4	131.67 ± 3.63	64.67 ± 4.62	51.50 ± 2.24**	~35
400	4	152.22 ±8.18	21.11 ± 1.74	86.07 ± 2.26**	>60

* ค่าที่แสดงเป็นค่า mean±S.E. MABP = mean arterial blood presure **P < 0.001 ***P < 0.005

4.2 ฤทธิ์ต้านเชื้อรา (Antifungal activity)

มีการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราของทองพันชั่ง ต่อเชื้อรา 6 ชนิด ได้แก่ *Microsporum gypseum, Trichophyton rubrum* (สาเหตุของโรคกลาก), *Epidermophyton floccosum*, *Candida albicans* (สาเหตุของการตกขาว), *Cryptococcus neoformans* และ Saccharomyces sp. ด้วยวิธี paper disc และวัดความกว้างของ clear zone เทียบกับ standard คือ griseofulvin และ nystatin โดยใช้สารสกัดจากกิ่งและใบทองพันชั่งซึ่งสกัดด้วยน้ำ แอลกอฮอล์ และคลอโรฟอร์ม พบว่าสารสกัดด้วยน้ำมีฤทธิ์น้อยมาก ส่วนสารสกัดด้วยแอลกอฮอล์ และคลอโรฟอร์ม มีฤทธิ์ต้านเชื้อราได้ดีพอสมควร (นันทวัน บุณยะประภัศร, 2530)

นอกจากนี้ยังมีการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของ rhinacanthone (*O*-quinone) ในการยับยั้ง spore germination ของ *Pyricularia oryzae* (เป็นตัวก่อให้เกิดโรคในข้าว) พบว่า rhinacanthone 10 ppm สามารถยับยั้งได้ 100 % ในขณะที่ ρ-quinone ไม่แสดงผลแม้จะใช้ในขนาด 1,000 ppm ก็ตาม (Kuwaharam, *et al.*, 1995)

4.3 ฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส (Antiviral activity)

ปี 1996 Sendl และคณะ ได้ทำการศึกษาการต้านเชื้อไวรัสของ rhinacanthin-C และ rhinacanthin -D (*in vitro*) ทำการทดสอบต่อเชื้อ cytomegalovirus ทั้งของหนู (mCMV) และมนุษย์ (hCMV), influenza virus type A (Flu-A), herpes simplex virus type 2 (HSV-2) และ respiratory syncytial virus (RSV) เทียบกับยาแผนปัจจุบัน คือ gancyclovir, amantadine, acyclovir, และ ribavirin พบว่า rhinacanthin-C และ rhinacanthin-D แสดงฤทธิ์ในการต้าน mCMV และ hCMV ได้ดีเมื่อเทียบกับยาแผน

ปัจจุบัน แต่ไม่แสดงผลในการต้านเชื้อ Flu-A, HSV-2, และ RSV (ตารางที่ 3) (Sendl, *et al.*, 1996)

ตารางที่ 3 ผลการต้านเชื้อไวรัสของ rhinacanthin-C และ rhinacanthin-D

Compound	virus	Assay	EC_{50}(μg/mL)[a]	IC_{50}(μg/mL)[b]	SI[c]	n
Rhinacanthin-C	mCMV[d]	CPE[e]	1.1 ±0.2	8.0 ± 3.0	7.3	4
	mCMV	Plaque[f]	0.57	2.6	4.6	1
	mCMV[g]	Plaque	0.02	0.56	28	1
	Flu-A[h]	HAI[i]	none	0.2 ± 0.2	NOSI	2
	HSV-2[j]	CPE	none	0.03	NOSI	1
	RSV[k]	CPE	none	0.3	NOSI	1
Rhinacanthin-D	mCMV	CPE	9.5 ± 1.6	49 ±4.8	5.2	4
	mCMV	Plaque	9.5	35	4	1
	hCMV	Plaque	0.22	0.75	3	1
	FluA	HAI	none	0.78	NOSI	2
	HSV-2	CPE	none	< 0.8	NOSI	1
Gancyclovir	mCMV	CPE	5.0 ±0.4	> 100	>20	20
	mCMV	Plaque	13.8 ±5.2	> 100	>7.2	2
	hCMV	plaque	3.4 ±1.1	> 1000	>290	4
Amantadine	Flu-A	HAI	0.054 ± 0.004	56 ±10	1040	12
Acyclovir	HSV-2	CPE	2.3 ± 0.3	> 10	> 4.3	14
Ribavirin	RSV	CPE	1.8 ±0.2	35 ± 4.6	19	23

[a]Antiviral activity. [b]Cytotoxicity. [c]Selective Index = IC/EC. [d]Murine CMV. [e]Cytopathic effect. [f]Plaque- neutralization. [g]Human CMV . [h]Influenza virus type A. [i]Hemadsorption inhibition. [j]Herpes simplex virus type 2. [k]Respiratory syncytial virus.

และจากการศึกษาของ Kernan และคณะในปี 1997 ถึงฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัสของ rhinacanthin-E และ rhinacanthin-F โดยทำการทดสอบแบบ *in vitro* กับเชื้อ Flu-A, และ HSV-2 พบว่าสารทั้ง 2 ชนิดมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ Flu-A แต่ไม่มีผลต่อเชื้อ HSV-2 (ตารางที่ 4) (Kernan, *et al.*, 1997)

จากการศึกษานี้เองทำให้ทราบว่า rhinacanthin-E และ rhinacanthin-F มีผลยับยั้งกระบวนการ influenza biosynthetic จึงมีฤทธิ์ต้านเฉพาะ Flu-A ซึ่งต่างจาก lignan ตัวอื่นๆ และ podophyllotoxin ที่มีผลยับยั้ง microtubule formation หรือ nucleic acid metabolism จึงป้องกันการ replication ของไวรัสได้ ทำให้สารดังกล่าวต้านเชื้อไวรัสได้หลายชนิด

ตารางที่ 4 ผลการต้านเชื้อไวรัสของ rhinacanthin-E และ rhinacanthin-F

Compound	virus	EC_{50} [a]	IC_{50} [b]	SI [c]	N [d]
Rhinacanthin-E	Flu-A [e]	1.7	44	26	1
	Flu-A [f]	7.4 ±2.0	102 ± 64	15	2
	HSV-2 [g]	none	17		1
Rhinacanthin-F	Flu_A [e]	< 0.94	17	>18	1
	Flu-A [f]	3.1	21	6.8	1
	HSV-2 [g]	none	4.4		1
Amantadine [h]	Flu-A [e]	0.054 ± 0.004	56 ±10	1000	12
Ribavirin [h]	Flu-A [f]	3.7 ±1.2	>200	>59	4
Acyclovir [h]	HSV-2 [g]	1.5 ± 0.2	>100	>60	2

[a] Antiviral activity , μg/mL , 50% effective concentration. [b] Cytotoxicity, μg/mL, 50% inhibitory concentration. [c] Selective index = IC_{50} / EC_{50}. [d] Number of assays. [e] Influenza virus type A, hemadsorption inhibition assay . [f] Influenza virus type A, cytopathic effect assay. [g] Herpes simplex virus type 2, CPE assay. [h] Antiviral reference controls.

4.4 Cytotoxicity

มีการศึกษาถึงความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารประกอบที่พบในทองพันชั่ง พบว่าสารกลุ่ม naphthoquinone หลายชนิดแสดงฤทธิ์ เป็นพิษต่อเซลล์

ปี 1988 Wu และคณะ ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งของ rhinacanthin-A และ B โดยใช้ KB tissue culture assay พบว่า rhinacanthin-B มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง โดยมีค่าED_{50} เท่ากับ 3.0 μg/ml ในขณะที่ rhinacanthin-A ไม่มีฤทธิ์ (Wu, *et al.*, 1988)

นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งของสารในกลุ่ม naphthoquinone และ flavonoid (wogonin) โดยใช้เซลล์มะเร็งชนิด KB, P-388, A-549, HT-29 และ HL-60 พบว่าสาร naphthoquinone ทุกชนิดที่ใช้ในการทดลอง มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งชนิด KB, P-388, A-549, HT-29, และ HL-60 (ตารางที่ 5) (Wu, *et al.*, 1998b)

ตารางที่ 5 ฤทธิ์ ต้านเซลล์มะเร็งของสารกลุ่ม naphthoquinone และ flavonoid

Compound	Cell lines ED_{50} (μg/mL)				
	KB	P-388	A-549	HT-29	HL-60
Rhinacanthin-A	6.75	0.72	3.06	2.17	1.16
Rhinacanthin-B	8.01	0.35	6.50	3.01	2.57
Rhinacanthin-C	6.26	0.26	0.35	0.68	0.68
Rhinacanthin-D	25.0	3.39	8.26	8.89	11.8
Rhinacanthin-G	4.45	0.14	0.75	0.57	1.14
Rhinacanthin-H	23.8	6.43	9.97	11.5	8.87
Rhinacanthin-I	13.2	4.88	7.18	6.30	5.12
Rhinacanthin-K	17.3	3.17	16.4	7.75	6.81
Rhinacanthin-M	19.2	3.95	8.90	10.1	19.9
Rhinacanthin-N	4.80	0.71	1.97	2.67	1.38
Rhinacanthin-Q	>50	0.61	3.61	7.60	8.90
Wogonin	4.46	1.70	4.14	3.35	4.66

4.5 ฤทธิ์ต้านการเกาะกลุ่มกันของเกร็ดเลือด (Antiplatelet aggregation)

จากการศึกษาของ Wu และคณะในปี 1998 ถึงฤทธิ์ต้านการเกาะกลุ่มกันของเกร็ดเลือดของสารกลุ่ม naphthoquinone และ flavonoid แบบ *in vitro* โดยใช้เลือดกระต่ายที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการเกาะกลุ่มกันของเกร็ดเลือด ด้วยสาร 4 ชนิดคือ thrombin (Thr), arachidonic acid (AA), collagen (Col) และ platelet activation factor (PAF) พบว่า rhinacanthin-A, -B. -C และ wogonin มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกร็ดเลือดที่ถูกเหนี่ยวนำโดย Collagen (72-100 %) และพบว่ามีเพียง rhinacanthin-B ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกร็ดเลือดที่ถูกเหนี่ยวนำโดย PAF แต่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกร็ดเลือดโดยการเหนี่ยวนำของ arachidonic acid ได้น้อยมาก ในขณะที่สารตัวอื่นมีฤทธิ์ค่อนข้างดี และจากการทดลองไม่มีสารตัวใดที่สารมารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกร็ดเลือดที่ถูกเหนี่ยวนำโดย thrombin ได้เลย (ตารางที่ 6) (Wu, *et al.*, 1998b)

ตารางที่ 6 ผลของสารในกลุ่ม naphthoquinone และ flavonoid ที่พบในทองพันชั่ง ต่อการเกาะกลุ่มของเกร็ดเลือดที่ถูกเหนี่ยวนำโดยวิธีการต่างๆ

Compound (μg/ml)	Induced inhibition (%)			
	Thr (0.1 U/ml)	AA (100 μM)	Col (10 μg/ml)	PAF (2 μg/ml)
Rhinacanthin-A (100)	2.30 ± 2.2	100 ± 1.1	100 ± 0.5**	13.1 ± 3.3
(50)		12.5 ±2.9	100 ±0.5**	
(20)		2.80 ± 2.8	29.0 ±2.4**	
(10)			2.30 ±1.6	
Rhinacanthin-B (100)	0.88 ± 1.6	7.45 ± 5.6**	100 ±0.5**	63.1 ±8.5
(50)		22.7 ±4.7#	87.8 ±4.8**	
(20)		0.24 ± 1.9	0.92 ±1.4**	
Rhinacanthin-C (100)	1.75 ±1.2	100 ±1.1	75.2 ±7.3**	8.50 ±2.2*
Rhinacanthin-G (100)	0.22 ±1.4	42.6 ± 8.9*	13.8 ±2.6#	10.7 ±2.1#
Rhinacanthin-H (100)	0.11 ± 1.3	54.8 ±4.4**	31.0 ± 3.9**	11.4 ±2.1#
Rhinacanthin-I (100)	0.66 ±1.5	54.9 ±8.2#	10.8 ±1.8#	22.2±3.9#
Rhinacanthin-K (100)	0.44 ±1.7	36.8 ±8.9*	17.0 ±1.6#	12.0 ± 2.2#
Rhinacanthin-M (100)	0.55 ±2.4	100 ±1.1**	5.40 ±1.3*	9.40 ±2.7*
Rhinacanthin-Q (100)	0.02 ±2.3	54.6 ± 11*	20.4 ±3.7#	6.88 ± 2.3
Wogonin (100)	0.66 ±2.3	100 ±1.1	72.5 ± 3.9	8.60 ±4.0

Plateles were preincubated with compound or DMSO (0.5%, control) at 37 C for 3 min; the inducer was added. Values are mean ± s.e.m. (n = 3-4). *P < 0.05 P <0.01 **P < 0.001 were compared with the respective control.

4.6 ฤทธิ์ในการดึงดูดแมลง (Insect sex attractant and signalling)

มีการศึกษาฤทธิ์ในการดึงดูดแมลงของสารสกัดรากทองพันชั่งด้วยอีเทอร์ พบว่าให้ผลต่อแมลง Mediterranean fruit fly ตัวผู้ แต่ให้ผลไม่แน่นอนใน *Aspiculurus tetraptera* melon fly ทั้งสองเพศ และให้ผลไม่แน่นอนในแมลงวันผลไม้ Oriantal fruit flies (*Dacusc dorsalis*) ทั้งสองเพศเช่นกัน

4.7 ฤทธิ์ในการเป็น juvenile hormone

มีการศึกษาฤทธิ์ในการเป็น juvenile hormone (ฮอร์โมนที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของตัวอ่อน) ของสารสกัดรากทองพันชั่งด้วยอีเทอร์ ในขนาด 500.00 μg/สัตว์ทดลอง พบว่าสารสกัดดังกล่าวมีฤทธิ์ทำให้ตัวอ่อนของตัวมวน (*Oncopeltus fasciatus*)ไม่เจริญเติบโต แต่เมื่อใช้ในขนาด 250.0 μg/สัตว์ทดลอง จะไม่ได้ผล

(นันทวัน บุณยะประภัศร, 2530)

5. ความเป็นพิษของทองพันชั่ง

มีการศึกษาความเป็นพิษแบบเฉียบพลัน (acute toxicity) ของทองพันชั่ง โดยป้อนสารสกัดทองพันชั่ง (50% EtOH) ให้หนูถีบจักร และการฉีดสารสกัดเข้าใต้ผิวหนังในขนาด 10g/kg (เทียบเป็น 3333 เท่าของขนาดที่ใช้ในตำรายา) พบว่าไม่แสดงอาการเป็นพิษในหนูถีบจักร
(นันทวัน บุณยะประภัศร, 2530; 2541)

ในเวียดนามทำการศึกษาโดยให้หนูกินใบทองพันชั่งในขนาด 0.5-1 g/kg น้ำหนักตัว (เทียบในมนุษย์จะเท่ากับการได้รับทองพันชั่ง 25 - 50 g หรือ 1 กำมือ) ไม่พบความเป็นพิษแต่อย่างใด
(โครงการสมุนไพรเพื่อการพึ่งตนเอง, 2530)

บทที่ 2
อุปกรณ์และสารเคมี

1. ตัวอย่างพืช

ต้นทองพันชั่ง ได้จากเรือนเพาะชำพืชสมุนไพร ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

2. เครื่องมือและอุปกรณ์

2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมอาหาร

- เครื่องชั่งชนิดความละเอียดในการชั่ง 3 และ 4 ตำแหน่ง
- pH meter
- magnetic stirrer and heater
- ชุดเครื่องแก้ว
- ขวดใส่อาหารเพาะเลี้ยงขนาดต่าง ๆ
- หม้อนึ่งไอน้ำความดันสูง (autoclave)

2.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

- ใบมีดมือผ่าตัด
- forceps
- petri-dish
- ตะเกียง FIREBOY plus®
- เครื่องเขย่า (shaker)
- laminar air flow cabinet

2.3 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดสาร

- vacuum chromatography
- Sephadex LH-20 column chromatography
- Erlenmeyer flask ขนาด 50 และ 125 ml
- rotary evaporator
- TLC Plate (Aluminium sheet silica gel F254)
- TLC tank
- ชุดอุปกรณ์ในการฉีดพ่น 20% NaOH
- ชุดอุปกรณ์การ reflux

2.4 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสาร

- volumetric flask
- pipette
- micropipette
- TLC densitometer (CAMAG TLC Evaluation Software)

3. สารเคมี

3.1 สารเคมีในการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

- Murashige-Skoog (MS) media
- B5 media
- sucrose
- agar
- น้ำกลั่น
- 1- naphthaleneacetic acid (NAA)
- indole - 3-acetic acid (IAA)
- 3 – indolebutyric acid (IBA)
- 2,4 – dichlorophenoxyacetic acid (2,4 – D)
- 6 – benzylaminopurine (BA)
- 70% ethanol
- 95% ethanol
- 10 % chlorine water

3.2 สารเคมีในการสกัดและตรวจวิเคราะห์สาร naphthquinone

- ethyl acetate
- chloroform
- methanol
- silica gel no. 9385
- Sephadex LH-20

4. อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

4.1 การเตรียม stock solution ของสูตรอาหาร MS และ B5

เตรียม stock solution ของอาหาร MS และ B5 ตามความเข้มข้นดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 stock solution ของสูตรอาหาร MS และ B5

สูตรอาหาร MS		สูตรอาหาร B5	
Stock 1a Macronutrients (x 20)	**g / 500 ml**	**Stock 1a Macronutrients (x 20)**	**g / 500 ml**
KNO_3	19.00	KNO_3	25.00
NH_4NO_3	16.50	$MgSO_4.7H_2O$	2.50
$MgSO_47H_2O$	3.70	$NaH_2PO_4H_2O$	1.50
KH_2PO_4	1.70	$(NH_4)_2SO_4$	1.34
Stock 1b Macronutrients (x 10^3)	**g / 100 ml**	**Stock 1b Macronutrients (x 10^3)**	**g / 100 ml**
$CaCl_22H_2O$	44.00	$CaCl_22H_2O$	15.00
Stock 2 Micronutrients (x 10^3)	**g / 100 ml**	**Stock 2 Micronutrients (x 10^3)**	**g / 100 ml**
H_3BO_3	0.62	H_3BO_3	0.30
$MnSO_4H_2O$	1.56	$MnSO_4H_2O$	1.00
$ZnSO_4.7H_2O$	0.86	$ZnSO_4.7H_2O$	0.20
$NaMoO_4.2H_2O$	0.025	$NaMoO_4.2H_2O$	0.025
$CuSO_4.5H_2O$	0.0025	$CuSO_4.5H_2O$	0.0025
$CoCl_2.6H_2O$	0.0025	$CoCl_2.6H_2O$	0.0025
Stock 3 KI* (x10^3)	**g / 100 ml**	**Stock 3 KI*(x 10^3)**	**g / 100 ml**
KI	0.083	KI	0.075
Stock 4 (Fe-EDTA)	**g / 500 ml**	**Stock 4 (Fe-EDTA)**	**g / 500 ml**
$FeSO_4.7H_2O$	2.78	$FeSO_47H_2O$	2.78
Na_2EDTA	3.72	Na_2EDTA	3.72
Stock 5 Vitamins (x100)**	**g / 100 ml**	**Stock 5 Vitamins** (x100)**	**g / 100 ml**
Thiamine hydrochloride	0.05	Thiamine hydrochloride	1.00
Pyridoxine hydrochloride	0.05	Pyridoxine hydrochloride	0.10
Nicotinic acid	0.05	Nicotinic acid	0.10
myo-Inositol	10.00	myo-Inositol	10.00
Plant growth regulators	**g / 100 ml**	**Plant growth regulators**	**g / 100 ml**
2,4-D stock solution	0.01	2,4-D stock solution	0.01
NAA stock solution	0.01	NAA stock solution	0.01
K stock solution	0.01	K stock solution	0.01
BA stock solution	0.01	BA stock solution	0.01

* ควรเก็บในขวดสีชา ** ควรเก็บในช่องแช่แข็ง

4.2 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1. ตวงน้ำกลั่นและ stock solution ตามปริมาณที่แสดงในตารางที่ 8 ผสมให้เข้ากัน
2. ตวง stock solution ของฮอร์โมนที่ต้องการใช้ในการทดลอง ผสมให้เข้ากัน
3. เติมน้ำตาล ตามปริมาณที่แสดงในตารางที่ 8 ผสมให้เข้ากัน
4. ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร
5. ปรับ pH ตามที่กำหนดของแต่ละสูตรโดยใช้ 1 N HCl หรือ 1 N NaOH
6. กรณีที่เตรียมเป็นอาหารแข็งให้นำอาหารที่ปรับ pH แล้วไปตั้งบน heater ค่อยๆ เติมวุ้น (0.6 - 0.8 %) ลงไป ให้ความร้อนและคนตลอดเวลาจนผงวุ้นละลายหมด (กรณีเตรียมอาหารเหลวไม่ต้องทำขั้นตอนนี้)
7. ถ่ายอาหารลงในภาชนะเพาะเลี้ยง ให้มีปริมาตร 1 ใน 5 ของภาชนะเพาะเลี้ยง ปิดฝาให้สนิทแล้วนำไปทำให้ปราศจากเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งไอน้ำความดันสูง ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที
8. นำอาหารที่เตรียมเสร็จแล้วเก็บไว้ในที่เย็นและสะอาด

ตารางที่ 8 ปริมาณ stock solution ที่ใช้เตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสูตร MS และB5

ส่วนประกอบ	ปริมาณ
น้ำกลั่น	800 ml
Stock 1a	50 ml
Stock 1b	1 ml
Stock 2	1 ml
Stock 3	1 ml
Stock 4	5 ml
Stock 5	1 ml
Sucrose	20[a] หรือ 30[b] กรัม
วุ้น	6-8 กรัม
ออกซิน	ตามต้องการ
ไซโตไคนิน	ตามต้องการ
pH	5.5[a] หรือ 5.8[b]
ปรับปริมาตรครั้งสุดท้าย	1000 ml

a สูตรอาหาร B5 b สูตรอาหาร MS

Central Library
Prince of Songkhla Unive

บทที่ 3

การทดลอง

1. สภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทองพันชั่ง

เนื้อเยื่อที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง (Explant) : ใบอ่อน และ ตาข้างของต้นทองพันชั่ง

อาหารมาตรฐานที่ใช้ : B5 หรือ MS

สภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง : อุณหภูมิ 24-25 °C ได้รับแสงวันละ 16 ชม.

ระยะเวลาในการถ่ายเนื้อเยื่อ (subculture) : 30 วัน

2. การทดลองหาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อทองพันชั่ง

2.1 การทำเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงคัลลัสของทองพันชั่ง

นำชิ้นส่วนเนื้อเยื่อพืชจากใบอ่อนของต้นทองพันชั่งมาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรอาหาร B5 และ MS เสริมด้วยส่วนผสมของฮอร์โมนออกซินและไซโตไคนินชนิดต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 9 จะได้อาหารเพาะเลี้ยงทั้งหมด 32 สูตร สังเกตการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืช และบันทึกผลเปรียบเทียบความสามารถในการเหนี่ยวนำให้เกิดคัลลัสและลักษณะของคัลลัสที่เกิดขึ้นในอาหารเพาะเลี้ยงแต่ละสูตร

ตารางที่ 9 สูตรอาหารมาตรฐาน B5 และ MS เสริมด้วยฮอร์โมนพืชชนิดต่างๆ

Cytokinin / Auxin (0.1 mg/l)	BA		Kinetin	
	(0.1 mg/l)	(1.0 mg/l)	(0.1 mg/l)	(1.0 mg/l)
IBA	A1	A2	A3	A4
IAA	B1	B2	B3	B4
NAA	C1	C2	C3	C4
2,4-D	D1	D2	D3	D4

2.2 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมที่ทำให้คัลลัสมีการเจริญเติบโตดี

ทำการเปลี่ยนแปรปริมาณของ 2,4-D และ kinetin ในสูตรอาหาร MS (สูตรอาหารที่ได้จากการทดลองข้อ 2.1) จะได้อาหารเพาะเลี้ยงทั้งหมด 9 สูตร(ตารางที่ 10) เพื่อใช้ทำการทดลองหาสูตรอาหารที่ทำให้คัลลัสเจริญเติบโตดี สังเกตการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืช และบันทึกผลเปรียบเทียบลักษณะการเจริญเติบโตของคัลลัสในอาหารเพาะเลี้ยงแต่ละสูตร

ตารางที่ 10 การเปลี่ยนแปลงปริมาณของ 2,4-D และ kinetin ในสูตรอาหาร MS

Kinetin (mg/l) / 2,4-D (mg/l)	(1.0 mg/l)	(2.0 mg/l)	(3.0 mg/l)
1.0	E1	E2	E3
2.0	E4	E5	E6
3.0	E7	E8	E9

2.3 การเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยงของทองพันชั่ง

นำคัลลัสที่ได้จากสูตรอาหารทั้งเก้าสูตร (ตารางที่ 10) มาเตรียมเป็นเซลล์เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารเดิมที่เลี้ยงคัลลัสนั้นๆ โดยทำการถ่ายเนื้อเยื่อคัลลัสน้ำหนักประมาณ 2 กรัม ลงในอาหารเหลว (50 ml/flask) และนำไปเลี้ยงบน shaker ที่หมุนด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที

2.4 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโตของเซลล์เพาะเลี้ยงกับเวลา

ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโตของเซลล์เพาะเลี้ยงกับเวลาโดยถ่ายเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงของทองพันชั่งที่เลี้ยงในสูตรอาหาร E3 และ E5 ที่มีอายุประมาณ 30 วัน โดยปิเปตปริมาตร 10 ml ลงในอาหารใหม่ (fresh medium) สูตรเดิม 50 ml จำนวน 20 flasks จากนั้นเริ่มเก็บเซลล์เพาะเลี้ยงในแต่ละสูตรอาหาร ตั้งแต่วันแรกและเก็บเซลล์ทุกๆ 3 - 4 วัน โดยการกรองเซลล์และนำเซลล์ที่ได้มาอบให้แห้งที่ 50°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และบันทึกน้ำหนักแห้ง นำน้ำหนักแห้งของเซลล์มา plot แสดงความสัมพันธ์กับเวลาที่เก็บเซลล์ (วัน)

2.5 การหาชนิดและความเข้มข้นของฮอร์โมนออกซินที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อตาข้าง

ศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของฮอร์โมนออกซิน ต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อตาข้างของทองพันชั่ง ในสูตรอาหาร B5 โดยใช้ฮอร์โมนไซโตไคนินในปริมาณคงที่ คือ BA 2 mg/l และทำการเปลี่ยนแปรชนิดและความเข้มข้นของฮอร์โมนออกซิน จะได้อาหารทั้งหมด 16 สูตร ดังแสดงในตารางที่ 11 สังเกตลักษณะการเจริญของเนื้อเยื่อตาข้างของทองพันชั่ง และบันทึกผล

2.6 การหาความเข้มข้นของไซโตไคนินที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อตาข้าง

ศึกษาความเข้มข้นของฮอร์โมนไซโตไคนินที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต โดยใช้ฮอร์โมนออกซินชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสม ที่ได้จากการทดลองในข้อ 2.5 (IAA 2 mg/l, IBA 2 mg/l, และ NAA 0.5 mg/l) และทำการเปลี่ยนแปรชนิดและความเข้มข้นของฮอร์โมน BA (ตารางที่ 12) ใน

สูตรอาหารทั้ง B5 และ MS ซึ่งจะได้อาหารเพาะเลี้ยงทั้งหมด 12 สูตร สังเกตลักษณะการเจริญของเนื้อเยื่อตาข้างของทองพันชั่ง และบันทึกผล

ตารางที่ 11 การเปลี่ยนแปรชนิดและความเข้มข้นของฮอร์โมนออกซินในสูตรอาหาร B5 ที่เสริมด้วย BA 2 mg/l ปริมาณคงที่

ความเข้มข้น (mg/l) / ชนิดของออกซิน	0.5	1	1.5	2
NAA	F1	F2	F3	F4
IAA	F5	F6	F7	F8
IBA	F9	F10	F11	F12
2,4-D	F13	F14	F15	F16

ตารางที่ 12 การเปลี่ยนแปรชนิดและความเข้มข้นของฮอร์โมนออกซินและไซโตไคนินในสูตรอาหาร B5 และ MS

ออกซิน (mg/l)	B5		MS	
	BA 1 mg/l	BA 2 mg/l	BA 1 mg/l	BA 2 mg/l
NAA 0.5	G1	G2	H1	H2
IAA 2.0	G3	G4	H3	H4
IBA 2.0	G5	G6	H5	H6

3. การสกัดและแยกสาร naphthoquinone จากใบทองพันชั่งในธรรมชาติ

ทำการสกัดสาร naphthoquinone จากใบทองพันชั่งเพื่อใช้เป็นสารมาตรฐานในการตรวจสอบการสร้างสาร naphthoquinone และการวิเคราะห์หาปริมาณสาร naphthoquinone จากเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงทองพันชั่ง โดยมีวิธีการสกัดแยกสารดังนี้

1. อบใบทองพันชั่งที่อุณหภูมิ 50 - 60 $^{\circ}$C เป็นเวลา 48 ชม.
2. บดใบทองพันชั่งที่อบแห้งแล้วจนละเอียด ชั่งน้ำหนักได้ 200 g
3. เติม ethyl acetate พอท่วม ทำการสกัดโดยการ reflux เป็นเวลา 1 ชม.
4. กรองสารสกัดที่ได้ด้วยกระดาษกรอง จากนั้นระเหยตัวทำละลายออกจนหมด
5. นำสารสกัดมาแยกโดย vacuum chromatography โดยใช้ silica gel เป็น stationary phase และ ใช้ chloroform เป็น mobile phase

6. นำสารสกัดที่แยกได้ใน fractions 9 - 12 มาแยกต่อโดย gel filtration chromatography 2 ครั้ง โดยใช้ Sephadex LH-20 เป็น stationary phase และใช้ methanol เป็น mobile phase จะได้สารบริสุทธิ์เป็นของเหลวสีเหลือง (Rn1)

4. การพิสูจน์เอกลักษณ์สาร Rn1

นำสาร Rn1 มาวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างโดยใช้เทคนิค NMR ได้ข้อมูลดังนี้

^{1}H NMR : 1.06 (6H), 1.56 (3H), 1.59 (3H), 1.80 (3H), 2.02 (2H), 2.17 (2H), 2.71 (2H), 3.90 (2H), 5.20 (H), 6.70 (H), 7.70 (H), 7.77 (H), 8.09 (H), 8.12 (H) ppm

^{13}C NMR : 72.9, 37.0, 32.2, 121.8, 184.0, 133.1, 126.1, 134.9, 132.9, 127.1, 129.2, 181.0, 154.3, 25.2 (x 2), 168.5, 127.7, 142.3, 27.2, 38.2, 134.5, 119.3, 13.3, 12.2, 15.5 ppm

5. การตรวจความสามารถในการสร้างสารและการวิเคราะห์ปริมาณสาร naphthoquinone ในเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงทองพันชั่ง

ทำการตรวจความสามารถในการสร้างสาร naphthoquinone ของเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงทองพันชั่งในอาหารสูตรต่างๆ ที่มีอายุ 1 และ 2 เดือน โดยมีขั้นตอนดังนี้

5.1 การสกัดสารจากเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงทองพันชั่ง

5.1.1. เก็บเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงที่มีอายุครบ 1 และ 2 เดือนนำมาอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 - 60 $^{\circ}$C เป็นเวลา 48 ชม.

5.1.2 บดเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงที่อบแห้งแล้วจนละเอียด ชั่งน้ำหนักมา 200 mg นำมาสกัดด้วย ethyl acetate 20 ml โดยการ reflux เป็นเวลา 1 ชม.

5.1.3 กรองสารสกัดที่ได้ด้วยกระดาษกรอง จากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายจนแห้ง

5.1.4 นำสารสกัดที่ได้มาเติม ethyl acetate 50 µl

5.2 การตรวจความสามารถในการสร้างสาร naphthoquinone

นำสารสกัดที่ได้ในข้อ 5.1.4 มาทำการตรวจความสามารถในการสร้างสาร naphthoquinone โดยใช้เทคนิค thin layer chromatography (TLC) โดย spot สารสกัดจากเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงลงบนแผ่น TLC spot ละ 20 µl แล้วนำมา develop ในระบบตัวทำละลาย chloroform : ethyl acetate (19.5:0.5) นำ TLC plate ที่ได้มาฉีดพ่นด้วย 20% NaOH เพื่อดูสีที่เกิดขึ้นเทียบกับสารมาตรฐาน (ผล positive คือ สีชมพูแดง)

5.3 การวิเคราะห์หาปริมาณสาร naphthoquinone ในเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง

3.3.1 การทำ calibration curve ของสารมาตรฐาน rhinacanthin C

- ชั่งสารมาตรฐาน rhinacanthin C 20 mg ละลายใน ethyl acetate ปรับปริมาตรจนครบ 10 ml

- ทำ half dilution 4 ครั้ง จะได้สารมาตรฐาน 5 ความเข้มข้น คือ 2, 1, 0.5, 0.25 และ 0.125 mg/ml
- นำสารละลายมาตรฐานที่เตรียมไว้แต่ละความเข้มข้น spot ลงบนแผ่น TLC spot ละ 10 µl และ develop ในระบบตัวทำละลาย chloroform : ethyl acetate (19.5:0.5)
- นำ TLC chromatogram ที่ได้ ไปตรวจวัดด้วยเครื่อง TLC densitometer แล้วนำ peak area ของแต่ละความเข้มข้นมาสร้าง calibration curve

5.3.2 การวิเคราะห์หาปริมาณสาร naphthoquinone ในเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง

- นำ TLC chromatogram ที่ได้จากข้อ 5.2 มาวิเคราะห์หาปริมาณสารโดยวิธี TLC densitometric method
- นำค่า peak area ที่ได้มาเทียบกับ calibration curve เพื่อคำนวณปริมาณสาร

5.4 การวิเคราะห์หาปริมาณสาร naphthoquinone จากใบทองพันชั่งในธรรมชาติ

5.4.1 การสกัดสารจากใบทองพันชั่ง

- นำใบทองพันชั่งมาอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 48 ชม.
- บดใบทองพันชั่งที่อบแห้งแล้วจนละเอียด ชั่งน้ำหนักมา 200 mg และนำมาสกัดด้วย ethyl acetate 20 ml โดยการ reflux เป็นเวลา 1 ชม.
- กรองสารสกัดที่ได้ด้วยกระดาษกรอง และนำไประเหยตัวทำละลายจนแห้ง เติม ethyl acetate 50 µl ลงในสารสกัด

5.4.2 การวิเคราะห์หาปริมาณสาร naphthoquinone

- spot สารสกัดจากใบทองพันชั่งและสารมาตรฐาน rhinachantin-C ลงบนแผ่น TLC spot ละ 5 µl
- นำแผ่น TLC มา develop ในระบบตัวทำละลาย chloroform : ethyl acetate (19.5:0.5)
- นำ TLC chromatogram ที่ได้ ไปตรวจวัดด้วยเครื่อง TLC densitometer แล้วนำ peak area
- นำค่า peak area ของ spot สารที่มีค่า Rf เท่ากับสารมาตรฐาน rhinachantin-C มาเทียบกับ calibration curve เพื่อคำนวณปริมาณสาร

5.5. Parameter ของเครื่อง TLC scanner

Plate size (width x height)	: 20 x 20 cm
Application position Y	: 10.0 mm
Position of solvent front	: 115.0 mm
Scan start position Y	: 15.0 mm
Scan end position Y	: 115.0 mm
Scan start position X	: 20.0 mm
Distance between track X	: 10.0 mm
Lamp	: Deuterium
Monochromator band width	: 20 nm
Wavelength	: 254 nm
Slit dimension	: 10.0 x 0.2 mm macro
Data step resolution	: 10 μm
Display scaling	: 1000 AU
Measurement mode	: Absorption / Reflection
Scanning speed	: 5 mm / sec
Optical filter	: second order
Zero adjust position	: 10.0 mm at track 1
Quick scan between	: 0.0 and 0.0 mm of all track
Analog offset	: 10 %
Sensitivity	: Automatic

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การทำ callus culture ของต้นทองพันชั่ง

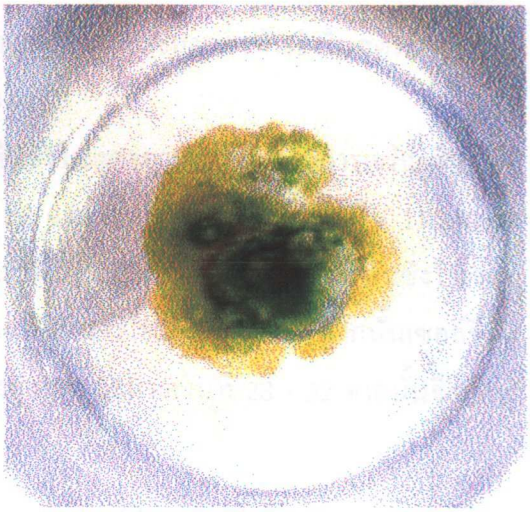
จากการนำชิ้นส่วนเนื้อเยื่อพืชจากใบอ่อนของต้นทองพันชั่งมาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรอาหาร B5 และ MS เสริมด้วยฮอร์โมนพืชชนิดต่างๆ (ตารางที่ 9) พบว่าสูตรอาหาร C4 (B5 เสริมด้วยฮอร์โมน NAA 0.1 mg/l และ kinetin 1.0 mg/l) และสูตรอาหาร D4 (MS เสริมด้วยฮอร์โมน 2,4-D 0.1 mg/l และ kinetin 1.0 mg/l) สามารถเหนี่ยวนำให้เนื้อเยื่อจากใบอ่อนของต้นทองพันชั่งเจริญเป็นคัลลัสได้ดี โดยคัลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารดังกล่าวมีสีเหลืองปนเขียว และมีการเจริญเติบโตดี (รูปที่ 6) แต่คัลลัสที่เลี้ยงในสูตรอาหาร D4 มีสีเขียวมากกว่าคัลลัสที่เลี้ยงในสูตรอาหาร C4 จึงเลือกคัลลัสจากสูตรอาหาร D4 มาทำการศึกษาต่อไป เนื่องจากมีรายงานว่า chloroplast ไม่เพียงแต่เป็นส่วนประกอบของเซลล์ที่มีหน้าที่ในการสังเคราะห์แสงของพืชอย่างเดียว แต่ยังทำหน้าที่ในการสังเคราะห์สารประกอบทุติยภูมิของพืชหลายชนิด (Constabel and Vasil, 1987) ดังนั้นจึงคาดว่าเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงที่มีการสร้างคลอโรฟิลได้น่าจะมีความสามารถในการสร้างสารทุติยภูมิได้ดีกว่า

จากการเปลี่ยนแปลงปริมาณของ 2,4-D และ kinetin ในสูตรอาหาร MS (ตารางที่ 10) เพื่อหาสูตรอาหารที่ทำให้คัลลัสเจริญเติบโตดี พบว่าคัลลัสที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่ใช้ในการทดลองมีความสามารถในการเจริญเติบโตได้ดีพอๆ กัน ยกเว้นคัลลัสที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร E2 (MS เสริมด้วย 2,4-D 1.0 mg/l และ kinetin 2.0 mg/l) E7 (MS เสริมด้วย 2,4-D 3.0 mg/l และ kinetin 1.0 mg/l) และ E8 (MS เสริมด้วย 2,4-D 3.0 mg/l และ kinetin 2.0 mg/l) มีการเจริญเติบโตไม่ดีนัก คัลลัสที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารทั้งเก้าสูตรจะมีลักษณะแตกต่างกัน โดยคัลลัสที่ได้จากสูตร E3 (MS เสริมด้วย 2,4-D 1.0 mg/l และ kinetin 3.0 mg/l) เป็นคัลลัสที่มีลักษณะร่วน (friable callus) มีสีเขียวปนเหลือง (รูปที่ 6) เหมาะที่จะใช้ในการเตรียมเป็นเซลล์เพาะเลี้ยง (cell suspension culture) มากที่สุด อย่างไรก็ตามคัลลัสที่ได้จากสูตรอาหารทั้งเก้าสูตรสามารถนำมาเตรียมเป็นเซลล์เพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณ cell mass ได้ จึงนำคัลลัสที่ได้จากแต่ละสูตรอาหารมาเตรียมเป็นเซลล์เพาะเลี้ยงในแต่ละสูตรอาหารเดิม

2. การเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยงของทองพันชั่ง

การนำคัลลัสที่ได้จากแต่ละสูตรอาหารมาเตรียมเป็นเซลล์เพาะเลี้ยงในแต่ละสูตรอาหารเดิม (ตารางที่ 10) พบว่า สามารถสร้างเซลล์เพาะเลี้ยงของทองพันชั่งในอาหารทั้งเก้าสูตร โดยเซลล์มีลักษณะการกระจายตัวเป็นกลุ่มเซลล์เล็กๆ สีเหลืองอ่อน คล้ายกันทุกสูตรอาหาร ยกเว้นในสูตรอาหาร E5 เซลล์เพาะเลี้ยงจะมีลักษณะเป็นกลุ่มเซลล์ขนาดใหญ่ และมีสีเหลืองอมส้ม เซลล์เพาะเลี้ยงในทุกสูตรอาหารมีการเจริญเติบโตดี โดยเฉพาะเซลล์เพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร E3

(A)



(B)

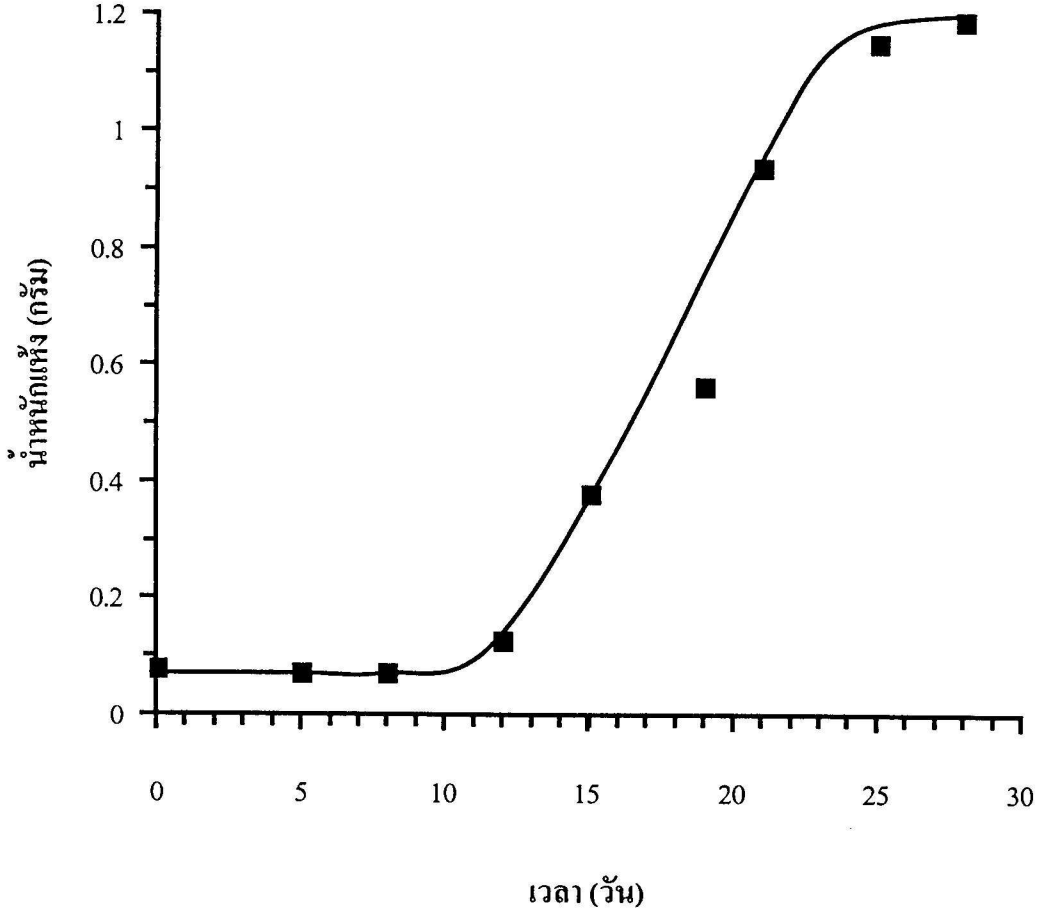
(C)

รูปที่ 6 คัลลัสของทองพันชั่งที่มีอายุประมาณ 30 วัน เลี้ยงในสูตรอาหาร (A) C4 (B5 เสริมด้วยฮอร์โมน NAA 0.1 mg/l และ kinetin 1.0 mg/l), (B) D4 (MS เสริมด้วยฮอร์โมน 2,4-D 0.1 mg/l และ kinetin 1.0 mg/l) และ(C) E3 (MS เสริมด้วย 2,4-D 1.0 mg/l และ kinetin 3.0 mg/l)

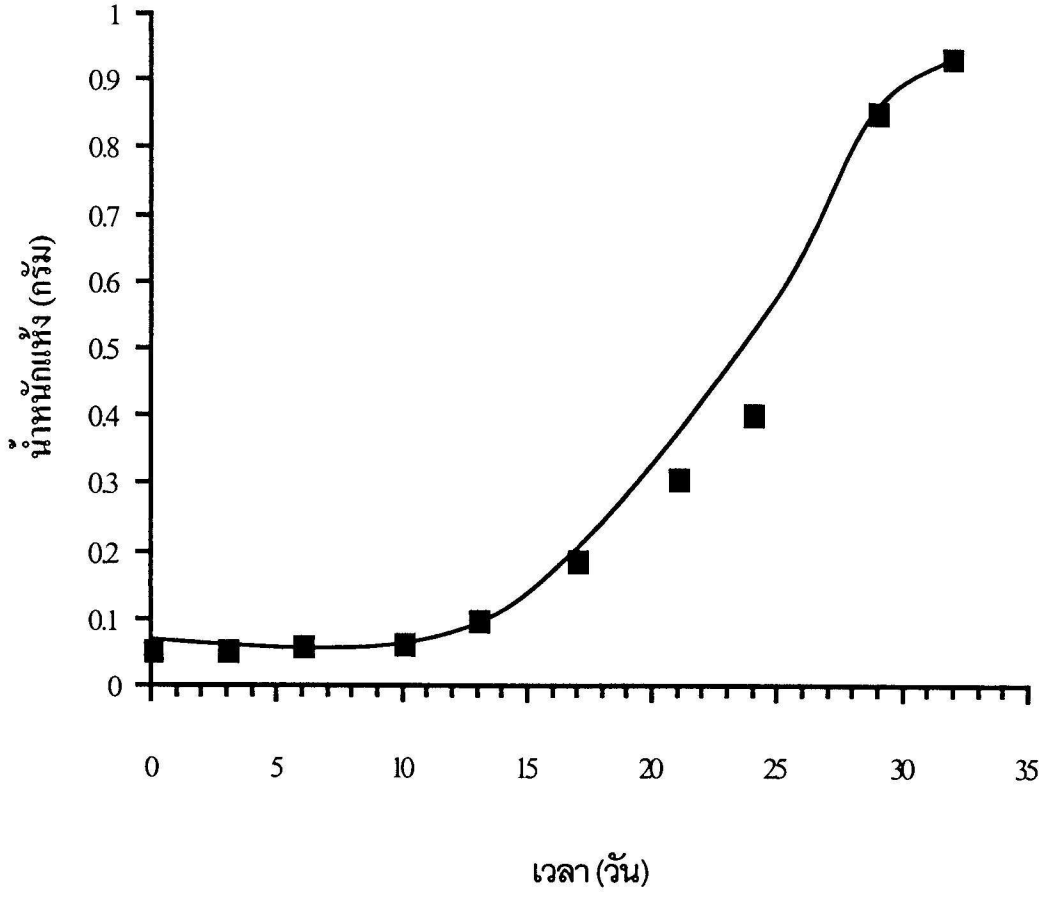
3. การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับการเจริญเติบโตของเซลล์เพาะเลี้ยงของทองพันชั่ง

เนื่องจากเซลล์เพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร E3 มีการเจริญเติบโตดี ส่วนเซลล์เพาะเลี้ยงในสูตร E5 มีการตรวจพบการสร้างสาร naphthoquinone จึงนำเซลล์เพาะเลี้ยงของทองพันชั่งในสูตรอาหารทั้งสองมาศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับการเจริญเติบโต

จากการศึกษาพบว่าเซลล์เพาะเลี้ยงของทองพันชั่งในสูตรอาหารทั้งสองมีการเจริญเติบโตดี โดยเซลล์เพาะเลี้ยงของทองพันชั่งที่เลี้ยงในสูตรอาหาร E3 และ E5 มีน้ำหนักเพิ่มขึ้นเป็น 15.18และ 15.48 เท่า ภายใน 28 และ 32 วัน ตามลำดับ (รูปที่ 7 และ 8) โดยเซลล์เพาะเลี้ยงของทองพันชั่งใช้เวลาประมาณ 8 - 10 ในการปรับตัวหลังจากมีการถ่ายเซลล์ลงในอาหารใหม่ (lag phase) จากนั้นเซลล์จึงมีการแบ่งตัวและเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว จนเจริญเติบโตสูงสุดประมาณวันที่ 28 - 32 จากนั้นจึงเข้าสู่ stationary stage



รูปที่ 7 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับการเจริญเติบโตของเซลล์เพาะเลี้ยงทองพันชั่งที่เลี้ยงในสูตรอาหาร E3 (MS เสริมด้วย 2,4-D 1.0 mg/l และ kinetin 3.0 mg/l)



รูปที่ 8 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับการเจริญเติบโตของเซลล์เพาะเลี้ยงของทองพันชั่งที่เลี้ยงในสูตรอาหาร E5 (MS เสริมด้วย 2,4-D 2.0 mg/l และ kinetin 2.0 mg/l)

4. การหาชนิดและความเข้มข้นของฮอร์โมนออกซินที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อตาข้าง

ในการทดลองเพื่อหาความเข้มข้นของฮอร์โมนออกซินที่เหมาะสม ได้ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทองพันชั่งในสูตรอาหาร MS ที่เสริมด้วยฮอร์โมนออกซินหลายชนิด (ตารางที่ 10) พบว่าสูตรอาหารที่ทำการทดลองทุกสูตรสามารถทำให้เนื้อเยื่อตาข้างของทองพันชั่งมีการเจริญเติบโตแตกต่างกันไป (ตารางที่ 13) แต่สูตรอาหารที่ทำให้เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงทองพันชั่งมีการเจริญเติบโตดี (มีการแตกยอด ความสูงของยอด และลักษณะของคัลลัสได้ดี) มี 3 สูตรอาหารได้แก่สูตรอาหาร MS ที่เสริมด้วยฮอร์โมนออกซินชนิดและความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้

1. ฮอร์โมน NAA ความเข้มข้น 0.5 mg/l
2. ฮอร์โมน IAA ความเข้มข้น 2.0 mg/l
3. ฮอร์โมน IBA ความเข้มข้น 2.0 mg/l

ตารางที่ 13 การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อตาข้างของทองพันชั่ง (อายุ 1 เดือน) ในสูตรอาหาร B5 เสริมด้วย BA 2 mg/lและฮอร์โมนออกซินชนิดและความเข้มข้นต่างๆ กัน

ออกซิน (mg/l)	อายุ (วัน)	ลักษณะการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อ			
		เจริญเป็นยอด		เจริญเป็นคัลลัส	
		ความยาว (cm)	ลักษณะ	เส้นผ่านศูนย์กลาง (cm)	ลักษณะ
2,4-D (0.5)	60	0.5	ไม่มีใบ	1.0	แข็ง, สีน้ำตาลเหลือง
(1.0)	60	-	ไม่มีใบ	1.0	แข็ง, สีน้ำตาลเหลือง
(1.5)	60	0.5	มีใบ 1 คู่	1.0	แข็ง, สีน้ำตาลเหลือง
(2.0)	60	0.5	มีใบ 1 คู่	0.5	แข็ง, สีน้ำตาลเหลือง
IAA (0.5)	60	0.5	มีใบ 3 คู่	1.5	ร่วน, สีเหลืองเขียว
(1.0)	60	0.4	มีใบ 1 คู่	1.5	ร่วน, สีเหลืองเขียว
(1.5)	60	1.0	มีใบ 4 คู่ มี 2 แขนง	1.5	ร่วน, สีน้ำตาลเขียว
(2.0)	60	1.0	มีใบ 4 คู่ มี 3 แขนง	2.0	ร่วน, สีน้ำตาลเขียว
IBA (0.5)	60	1.5	มีใบ 4 คู่ มี 1 แขนง	1.5	ร่วน, สีน้ำตาลเหลือง
(1.0)*	-	-	-	-	-
(1.5)*	-	-	-	-	-
(2.0)	60	1.5	มีใบ 5 คู่ มี 2 แขนง	1.5	แข็ง, สีน้ำตาลเหลือง
NAA (0.5)	60	2.0	มีใบ 6 คู่ มี 2 แขนง	1.5	แข็ง, สีน้ำตาลเหลือง
(1.0)	60	0.5	ไม่มีใบ	1.0	แข็ง, สีน้ำตาลเหลือง
(1.5)	60	0.5	ไม่มีใบ	1.0	แข็ง, สีน้ำตาลเหลือง
(2.0)	60	0.5	ไม่มีใบ	1.0	แข็ง, สีน้ำตาลเหลือง
no auxin	80	1.0	มีใบ 6 คู่ มี 3 แขนง	1.5	แข็ง, สีน้ำตาลเหลือง

* ไม่สามารถเก็บข้อมูลได้เนื่องจากเกิดการปนเปื้อนเชื้อ ทำให้ไม่เห็นการเจริญของเนื้อเยื่อทองพันชั่ง

5. การหาความเข้มข้นของไซโตไคนินที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อตาข้าง

ในการทดลองเพื่อหาปริมาณส่วนของฮอร์โมนไซโตไคนินที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตได้มีการปรับปรุงสูตรอาหารโดยการเปลี่ยนแปรความเข้มข้นของ BA (ตารางที่ 12) พบว่าสูตรอาหารที่ทำการทดลองทุกสูตรสามารถทำให้เนื้อเยื่อตาข้างของทองพันชั่งมีการเจริญเติบโตแตกต่างกันไป ดังแสดงในตารางที่ 14 และ 15

ตารางที่ 14 การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อตาข้างของทองพันชั่ง (อายุ 1 เดือน) ในสูตรอาหาร B5 และ MS ที่เสริมด้วย ฮอร์โมนชนิดและความเข้มข้นต่างๆ

สูตรอาหาร	ไซโตไคนิน (mg/l)	ออกซิน (mg/l)	ลักษณะการเจริญเติบโต			
			เจริญเป็นยอด			เจริญเป็นคัลลัส
			ความยาว (cm)	จำนวนใบ (คู่)	จำนวนแขนง	ลักษณะ
MS	BA (1.0)	NAA (0.5)	1.2 -3.0 (1.81)	1 - 5 (3.15)	0 - 2 (0.62)	ร่วน, สีเหลืองปนเขียว
		IAA (2.0)	0.5-3.0 (1.78)	0 - 5 (2.81)	0 - 2 (0.93)	ร่วน, สีเหลืองปนเขียว
		IBA (2.0)	0 - 4.0 (1.46)	0 - 6 (3.61)	0 - 2 (1.23)	ร่วน, สีเหลืองปนเขียว
MS	BA (2.0)	NAA (0.5)	0 - 2.0 (1.17)	0 - 5 (2.89)	0 - 2 (0.44)	ร่วน, สีเหลืองปนเขียว
		IAA (2.0)	0 - 2.7 (1.02)	0 - 4 (2.33)	0 - 2 (0.50)	ร่วน, สีเหลืองปนเขียว
		IBA (2.0)	0 - 3.8 (1.75)	0 - 5 (3.47)	0 - 3 (1.33)	ร่วน, สีเหลืองปนเขียว
B5	BA (1.0)	NAA (0.5)	0 - 1.2 (0.37)	0 - 4 (1.78)	0 (0)	ร่วน, สีเหลืองปนเขียว
		IAA (2.0)	0 - 1.2 (0.53)	0 - 4 (2.0)	0 - 2 (0.20)	ร่วน, สีเหลืองปนเขียว
		IBA (2.0)	0.3-0.7 (0.42)	1 - 4 (2.0)	0 (0)	ร่วน, สีเหลืองปนเขียว
B5	BA (2.0)	NAA (0.5)	0 - 0.3 (0.08)	0 - 1 (0.29)	0 (0)	ร่วน, สีเหลืองปนเขียว
		IAA (2.0)	0.3-0.5 (0.35)	2	0 (0)	ร่วน, สีเหลืองปนเขียว
		IBA (2.0)	0 - 0.7 (0.46)	0 - 3 (1.42)	0 - 1 (0.14)	ร่วน, สีเหลืองปนเขียว

หมายเหตุ : ค่าตัวเลขในวงเล็บเป็นค่าเฉลี่ยของข้อมูลหน้าวงเล็บ

ตารางที่ 15 การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อตาข้างของทองพันชั่ง (อายุ 2 เดือน) ในสูตรอาหาร B5 และ MS ที่เสริมด้วย ฮอร์โมนชนิดและความเข้มข้นต่างๆ

สูตรอาหาร	ไซโตไคนิน (mg/l)	ออกซิน (mg/l)	ลักษณะการเจริญเติบโต			
			เจริญเป็นยอด			เจริญเป็นคัลลัส
			ความยาว (cm)	จำนวนใบ (คู่)	จำนวนแขนง	ลักษณะ
MS	BA (1.0)	NAA (0.5)	1.7-2.5 (2.06)	2 - 7 (4.40)	0 - 3 (1.2)	ร่วน, สีน้ำตาลดำ
		IAA (2.0)	0.8-3.0 (2.03)	2 - 7 (3.90)	0 - 2 (0.93)	ร่วน, สีน้ำตาลดำ
		IBA (2.0)	0.8-5.2 (2.24)	2 - 8 (5.20)	0 - 2 (1.23)	ร่วน, สีน้ำตาลดำ
MS	BA (2.0)	NAA (0.5)	1.2-3.0 (1.74)	3 - 5 (4.00)	0 - 2 (0.44)	ร่วน, สีน้ำตาลดำ
		IAA (2.0)	0.7-2.5 (1.53)	3 - 5 (4.20)	0 - 2 (0.50)	ร่วน, สีน้ำตาลดำ
		IBA (2.0)	0.8-2.5 (1.78)	4 - 6 (5.00)	0 - 3 (1.33)	ร่วน, สีน้ำตาลดำ
B5	BA (1.0)	NAA (0.5)	0.5-1.4 (0.88)	2 - 4 (2.80)	0 (0)	ร่วน, สีน้ำตาลดำ
		IAA (2.0)	0.5-1.4 (0.88)	2 - 4 (3.20)	0 - 2 (0.20)	ร่วน, สีน้ำตาลดำ
		IBA (2.0)	0.3-0.8 (0.53)	2 - 4 (3.00)	0 (0)	ร่วน, สีน้ำตาลดำ
B5	BA (2.0)	NAA (0.5)	0.5 (0.5)	2.0 (2.0)	0 (0)	ร่วน, สีน้ำตาลดำ
		IAA (2.0)	0.5-1.5 (0.94)	0 - 5 (3.38)	0 (0)	ร่วน, สีน้ำตาลดำ
		IBA (2.0)	0 - 1.0 (0.56)	0 - 3 (1.42)	0 - 1 (0.14)	ร่วน, สีน้ำตาลดำ

หมายเหตุ : ค่าตัวเลขในวงเล็บเป็นค่าเฉลี่ยของข้อมูลหน้าวงเล็บ

จากตารางแสดงลักษณะของเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงทองพันชั่งในสูตรอาหารต่างๆพบว่า

- ทุกสูตรอาหารไม่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างรากได้เลย
- สูตรอาหารมาตรฐาน MS เหนี่ยวนำให้เกิดการเจริญของยอดและการแตกแขนง (รูปที่ 9) ได้ดีกว่าสูตรอาหารมาตรฐาน B5 ที่ความเข้มข้นและชนิดของฮอร์โมนเท่ากัน
- สูตรอาหารที่มีการเสริมด้วยฮอร์โมน BA 2.0 mg / l มีการเหนี่ยวนำให้เกิดการเจริญของคัลลัสได้ดีกว่าการเสริมด้วยฮอร์โมน BA 1.0 mg/l ทั้งในสูตรอาหารมาตรฐาน MS และ B5 (รูปที่ 10)

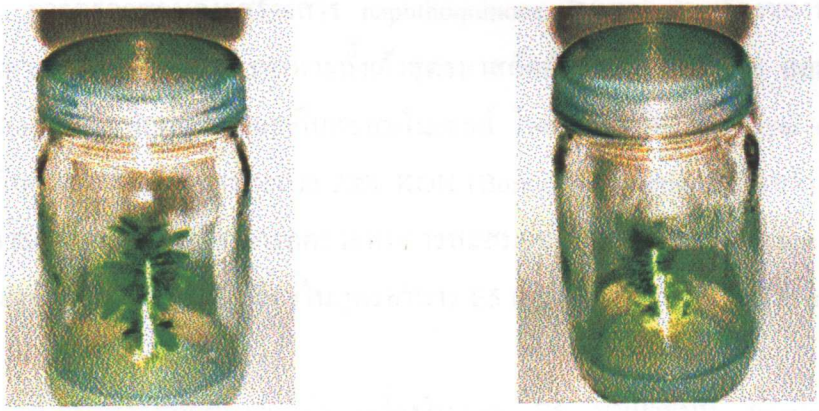
A B C

รูปที่ 9 การเจริญเป็นยอดของเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงทองพันชั่งในสูตรอาหาร MS ที่เสริมด้วยฮอร์โมน

A : BA 1 mg/l และ NAA 0.5 mg/l

B : BA 1 mg/l และ IAA 2.0 mg/l

C : BA 1 mg/l และ IBA 2.0 mg/l



A B

รูปที่ 10 การเกิดคัลลัสของเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงทองพันชั่งในสูตรอาหาร MS เสริมด้วยฮอร์โมน

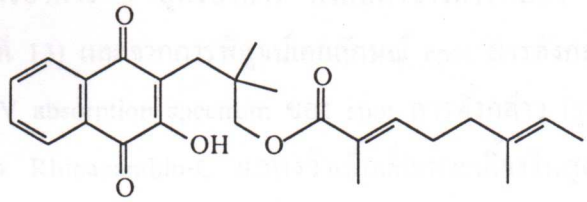
A : BA 1.0 mg/l และ IBA 2.0 mg/l

B : BA 2.0 mg/l และ IBA 2.0 mg/l

6. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของ RN1

จากการสกัดสาร naphthoquinone จากใบทองพันชั่งในธรรมชาติ และนำสารสกัดมาแยกโดย vacuum chromatography และ gel filtration chromatography จะได้สารบริสุทธิ์เป็นของเหลวสีเหลือง (Rn1)

เมื่อนำสาร Rn 1 ไปวิเคราะห์โดย NMR spectroscopy พบว่าสาร Rn1 คือสาร rhinacanthin-C (รูปที่ 11) โดยจาก TLC chromatogram ของสารสกัดใบทองพันชั่งพบว่า rhinacanthin-C เป็นสารประกอบหลักในใบทองพันชั่ง



รูปที่ 11 โครงสร้างของ Rhinacnthin-C

7. การตรวจหาการสร้างสาร naphthoquinone จากเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงทองพันชั่ง

7.1 การตรวจสอบความสามารถในการสร้างสาร naphthoquinone ของเซลล์เพาะเลี้ยง

การตรวจสอบการสร้างสาร naphthoquinone ในเซลล์เพาะเลี้ยงของทองพันชั่งพบว่าเมื่อนำเซลล์เพาะเลี้ยงที่เลี้ยงในสูตรอาหารทั้งก้าสูตรมาสกัดด้วย ethyl acetate และทำการตรวจหาสาร naphthoqinone ที่ถูกสร้างและเก็บสะสมในเซลล์ โดยใช้เทคนิค thin layer chromatography (TLC) ร่วมกับการฉีดพ่นด้วยสารละลาย 20% KOH (Borntrager reaction) พบว่ามีเซลล์เพาะเลี้ยงจากสูตรอาหารเดียวเท่านั้น ที่สามารถตรวจพบการสะสมของสาร naphthoquinone ในเซลล์ โดยเซลล์เพาะเลี้ยงดังกล่าวเป็นเซลล์ที่เลี้ยงในสูตรอาหาร E5 (MS เสริมด้วย 2,4-D 2.0 mg/l และ kinetin 2.0 mg/l)

เมื่อนำสารสกัดของเซลล์เพาะเลี้ยงในสูตร E5 มาแยกเป็น fraction โดยใช้ gel filtration chromatography (LH-20) และนำแต่ละ fraction มาตรวจหาสาร naphthoquinine โดยใช้เทคนิค TLC พบว่าสารสกัดจากเซลล์เพาะเลี้ยงใน fraction ที่ 3 มี spot ของสารที่มีค่า Rf (0.27) ใกล้เคียงกับค่า Rf ของ rhinacanthin-C (0.26) และให้ผลบวก (spot สีชมพู) เมื่อพ่นด้วยสารละลาย 20% KOH

อย่างไรก็ตามพบว่าในการ subculture เพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ไปเรื่อยๆ มีผลทำให้ความสามารถในการสร้างสาร naphthoquinone ของเซลล์เพาะเลี้ยงหายไป เนื่องจากความไม่คงตัวในการสร้างสารทุติยภูมิของเซลล์เพาะเลี้ยง ดังนั้นนอกจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ของทองพันชั่งแล้ว อาจต้อง

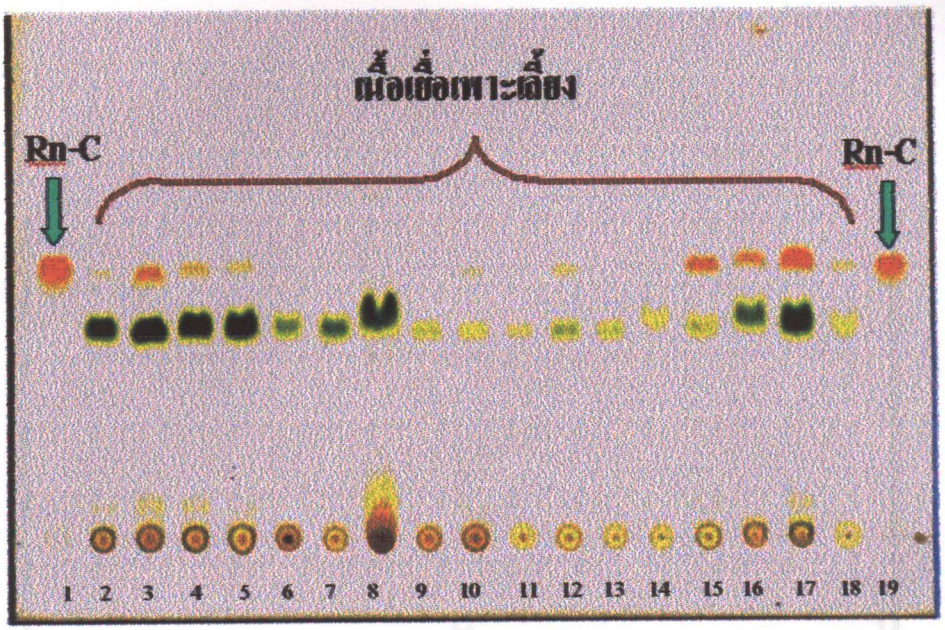
เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทองพันชั่งในลักษณะของ shoot culture หรือ root culture ด้วย ซึ่งการเพาะเลี้ยงในลักษณะ organ culture พบว่าเนื้อเยื่อจะมีศักยภาพในการสร้างสารทุติยภูมิได้มากเซลล์เพาะเลี้ยง (Charlwood and Rhodes, 1990)

7.2 การตรวจสอบความสามารถในการสร้างสาร naphthoquinone ของเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง

จากการทดลองตรวจหาการสร้างสาร naphthoquinone จากเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงทองพันชั่งที่มีอายุ 1 และ 2 เดือน ซึ่งเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารต่างๆ จำนวน 12 สูตร โดยใช้เทคนิค TLC พบว่าจาก chromatogram ของสารสกัดเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงทองพันชั่งที่ได้ (รูปที่ 12) มี spot สารในสารสกัดเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร 9 สูตรอาหาร ดังแสดงข้างล่าง มีค่า Rf ตรงกับสารมาตรฐาน Rhinachanthin-C (รูปที่ 13) และจากการพิสูจน์เอกลักษณ์ spot สารดังกล่าวโดยพ่นด้วยสารละลาย 20% KOH และวัด UV absorption spectrum ของ spot สารดังกล่าว (รูปที่ 12 และ 14) พบว่ามีลักษณะเหมือนกับของ Rhinacanthin-C แสดงว่าเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารดังกล่าวสามารถสร้างสาร Rhinacanthin-C ได้

สูตรอาหารที่พบว่าเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงทองพันชั่งสามารถสร้างสาร naphthoquinone ได้

1. MS เสริมด้วยฮอร์โมน BA 1.0 mg/l และ NAA 0.5 mg/l
2. MS เสริมด้วยฮอร์โมน BA 1.0 mg/l และ IAA 2.0 mg/l
3. MS เสริมด้วยฮอร์โมน BA 1.0 mg/l และ IBA 2.0 mg/l
4. MS เสริมด้วยฮอร์โมน BA 2.0 mg/l และ NAA 0.5 mg/l
5. B5 เสริมด้วยฮอร์โมน BA 1.0 mg/l และ IBA 2.0 mg/l
6. B5 เสริมด้วยฮอร์โมน BA 2.0 mg/l และ IAA 2.0 mg/l
7. B5 เสริมด้วยฮอร์โมน BA 2.0 mg/l และ IBA 0.5 mg/l
8. B5 เสริมด้วยฮอร์โมน BA 2.0 mg/l และ IAA 1.5 mg/l
9. B5 เสริมด้วยฮอร์โมน BA 2.0 mg/l และ IBA 2.0 mg/l



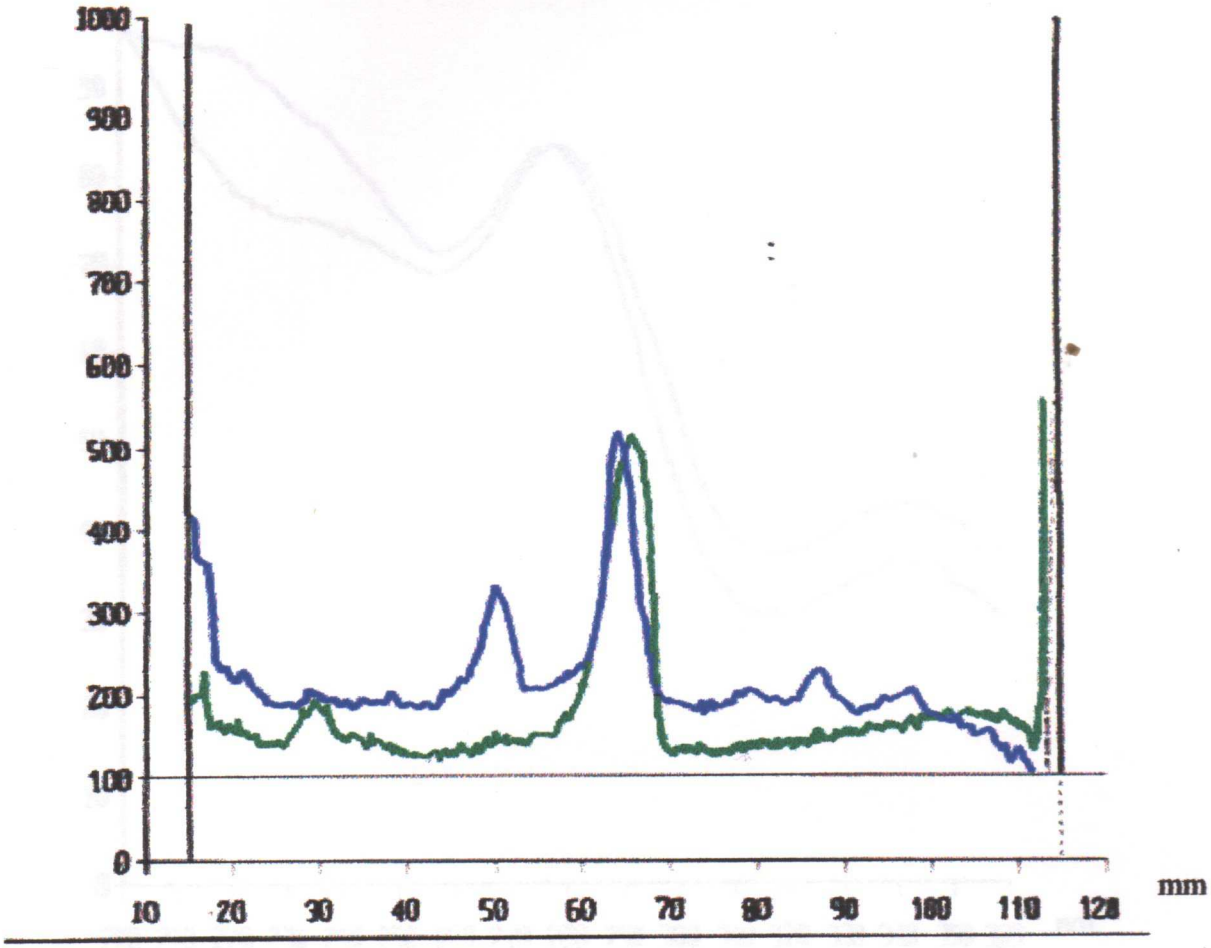
รูปที่ 12 TLC chromatogram ของสารสกัดจากเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงทองพันชั่งในสูตรอาหารต่างๆ เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Rhinacanthin-C (solvent system : $CHCl_3$/EtOAc 19.5 :0.5 ฉีดพ่น ด้วย 20 % NaOH)

หมายเลข 1. และ 19. คือสารมาตรฐาน Rhinacanthin-C

2. MS เสริมด้วยฮอร์โมน BA 1.0 mg/l และ NAA 0.5 mg/l
3. MS เสริมด้วยฮอร์โมน BA 1.0 mg/l และ IAA 2.0 mg/l
4. MS เสริมด้วยฮอร์โมน BA 1.0 mg/l และ IBA 2.0 mg/l
5. MS เสริมด้วยฮอร์โมน BA 2.0 mg/l และ NAA 0.5 mg/l
6. MS เสริมด้วยฮอร์โมน BA 2.0 mg/l และ IAA 2.0 mg/l
7. MS เสริมด้วยฮอร์โมน BA 2.0 mg/l และ IBA 2.0 mg/l
8. B5 เสริมด้วยฮอร์โมน BA 1.0 mg/l และ NAA 0.5 mg/l
9. B5 เสริมด้วยฮอร์โมน BA 1.0 mg/l และ IAA 0.5 mg/l
10. B5 เสริมด้วยฮอร์โมน BA 1.0 mg/l และ IBA 2.0 mg/l
11. B5 เสริมด้วยฮอร์โมน BA 2.0 mg/l และ NAA 0.5 mg/l
12. B5 เสริมด้วยฮอร์โมน BA 2.0 mg/l และ IAA 2.0 mg/l
13. B5 เสริมด้วยฮอร์โมน BA 2.0 mg/l และ IBA 2.0 mg/l
14. MS เสริมด้วยฮอร์โมน BA 2.0 mg/l
15. B5 เสริมด้วยฮอร์โมน BA 2.0 mg/l และ IBA 0.5 mg/l
16. B5 เสริมด้วยฮอร์โมน BA 2.0 mg/l และ IAA 1.5 mg/l
17. B5 เสริมด้วยฮอร์โมน BA 2.0 mg/l และ IAA 2.0 mg/l
18. B5 เสริมด้วยฮอร์โมน BA 2.0 mg/l และ IBA 2.0 mg/l

หมายเลข 2 – 13 ได้จากเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงอายุ 1 เดือน

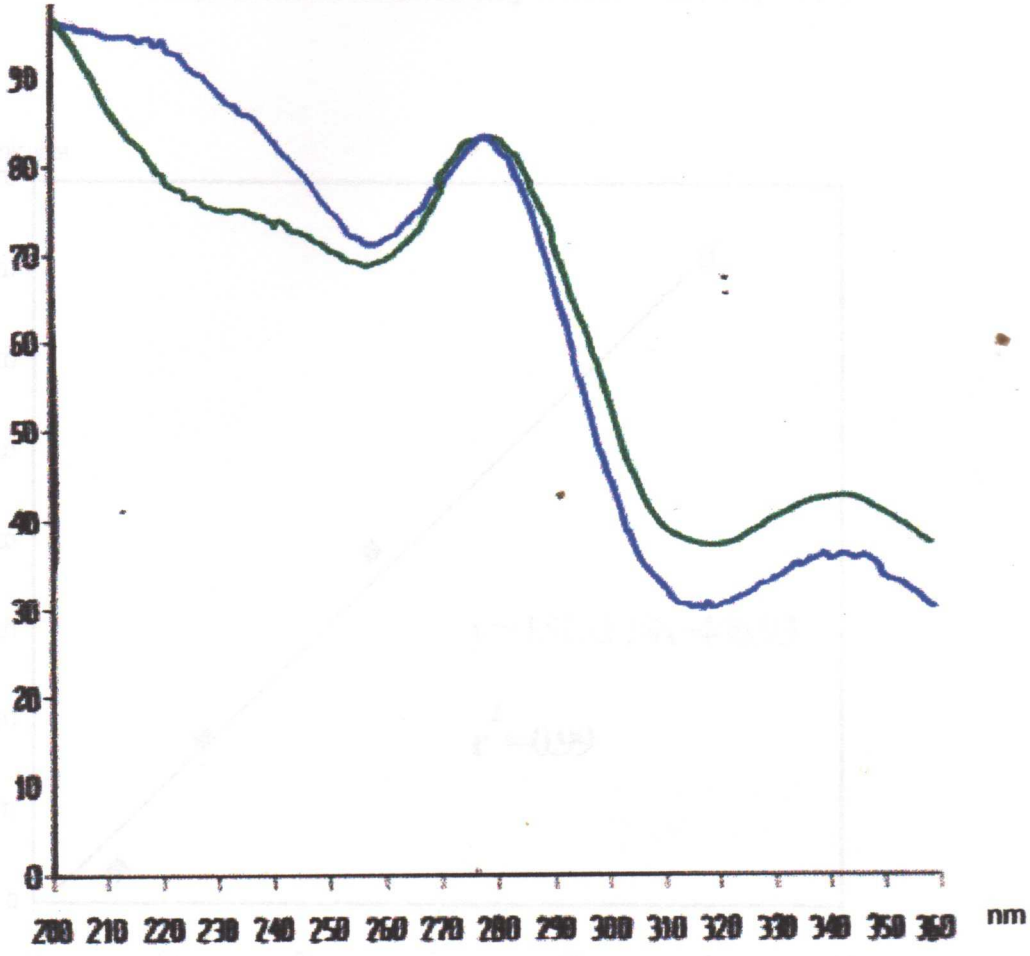
หมายเลข 14 – 18 ได้จากเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงอายุ 2 เดือน



รูปที่ 13 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงทองพันชั่งเปรียบเทียบเทียบกับสารมาตรฐาน rhinacanthin-C

เส้นสีน้ำเงิน คือ สารสกัดจากเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงทองพันชั่ง

เส้นสีเขียว คือ สารมาตรฐาน rhinacanthin-C



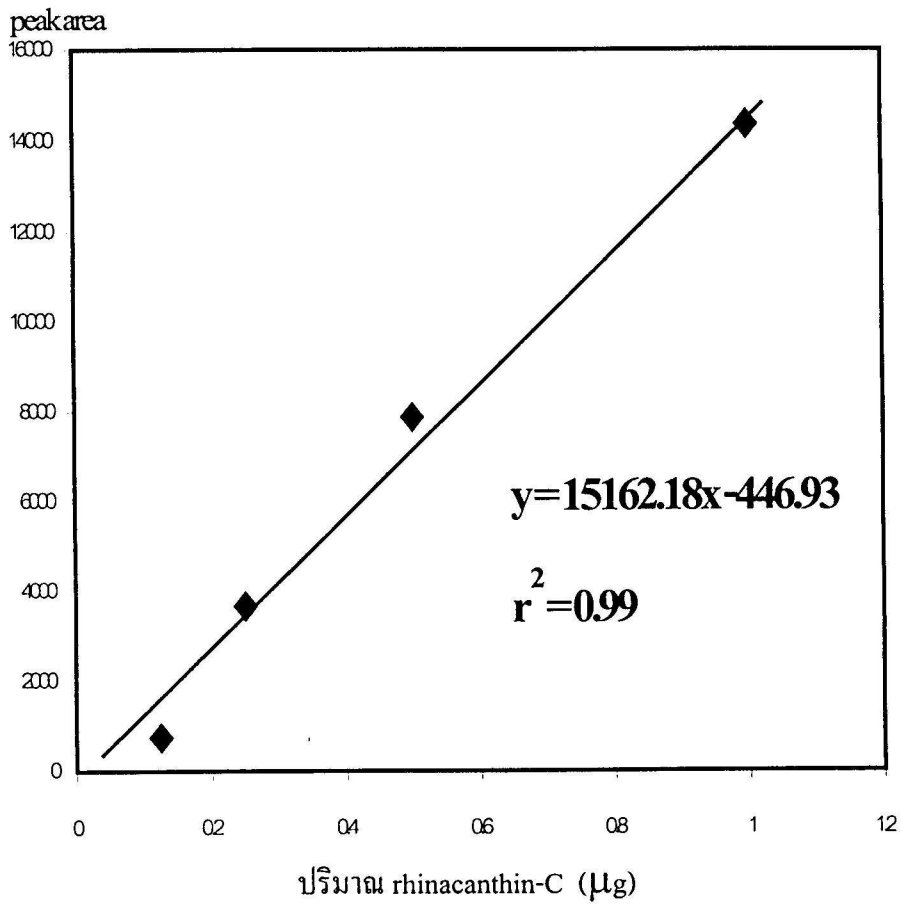
รูปที่ 14 UV absorption spectrum ของสารมาตรฐาน rhinacanthin-C เปรียบเทียบกับ spot สาร ใน สารสกัดจากเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงทองพันชั่งที่มีค่า Rf ใกล้เคียงกัน

เส้นสีน้ำเงิน คือ สารสกัดจากเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงทองพันชั่ง

เส้นสีเขียว คือ สารมาตรฐาน rhinacanthin-C

8. การวิเคราะห์หาปริมาณสาร rhinacanthin-C ในเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงทองพันชั่ง

ทำการวิเคราะห์หาปริมาณสาร rhinacanthin-C จากเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงทองพันชั่งโดยคำนวณหาปริมาณ rhinacanthin-C ในสารสกัด ตามสมการ $Y = 1516218X - 446.93$ ($r^2 = 0.99$) ซึ่งเป็นสมการเส้นตรงที่ได้จาก calibration curve ของสารมาตรฐาน rhinacanthin-C (รูปที่ 15)



รูปที่ 15 calibration curve ของสารมาตรฐาน rhinacanthin-C

จากการคำนวณหาปริมาณ rhinacanthin-C ในสารสกัดเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงทองพันชั่งที่มีอายุ 1 และ 2 เดือน และปริมาณ rhinacanthin-C ในใบของทองพันชั่งตามธรรมชาติพบว่าเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงทองพันชั่งที่เลี้ยงในสูตรอาหาร B5 เสริมด้วยฮอร์โมน BA 2.0 mg/l และ IAA 2.0 mg/l (มีอายุ 2 เดือน) มีการสร้างและเก็บสะสมสาร rhinacanthin-C ได้มากกว่าเนื้อเยื่อทองพันชั่งที่เลี้ยงในสูตรอาหารอื่นๆ (ตารางที่ 16) และโดยส่วนใหญ่การสร้างและเก็บสะสมสาร rhinacanthin-C ในเนื้อเยื่อทองพันชั่งมักเพิ่มตามอายุของเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง อย่างไรก็ตามปริมาณ rhinacanthin-C ที่ตรวจพบในเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงของทองพันชั่งยังน้อยกว่าปริมาณ rhinacanthin-C ที่มีในใบทองพันชั่งตามธรรมชาติ

(0.5194 %w/w) ซึ่งควรมีการศึกษาเพื่อเพิ่มปริมาณการสร้างสาร naphthoquinone ในเนื้อเยื่อทองพันชั่งโดยใช้เทคนิคทางเทคโนโลยีชีวภาพต่อไป

ตารางที่ 16 ปริมาณสาร Rhinacanthin-C ที่ตรวจพบในเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงทองพันชั่งและในใบทองพันชั่งตามธรรมชาติ

สูตรอาหาร	ฮอร์โมนพืช (mg/l)	ปริมาณ rhinacanthin-C (%w/w)	
		อายุ 1 เดือน	อายุ 2 เดือน
MS	BA (1.0) และ NAA (0.5)	0.0312	0.0466
	BA (1.0) และ IAA (2.0)	0.0992	0.1131
	BA (1.0) และ IBA (2.0)	0.0744	0.0844
	BA (2.0) และ NAA (0.5)	0.0536	0.0212
	BA (2.0) และ IAA (2.0)	n.d.	0.0163
	BA (2.0) และ IBA (2.0)	n.d.	0.0133
B5	BA (1.0) และ NAA (0.5)	n.d.	0.0187
	BA (1.0) และ IAA (2.0)	n.d.	0.0352
	BA (1.0) และ IBA (2.0)	0.0403	n.d.
	BA (2.0) และ NAA (0.5)	n.d.	n.d.
	BA (2.0) และ IAA (2.0)	0.0471	0.1446
	BA (2.0) และ IBA (2.0)	n.d.	0.0370
MS	BA (2.0)	-	n.d.
B5	BA (2.0) และ IBA (0.5)	-	0.1123
	BA (2.0) และ IAA (1.5)	-	0.0787

หมายเหตุ : " n.d. " หมายถึงไม่สามารถตรวจพบ

" - " หมายถึงไม่ได้ทำการทดลอง

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

1. สูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทองพันชั่งได้แก่
   1.1 MS เสริมด้วยฮอร์โมน 2,4-D 1.0 mg/l และ kinetin 3.0 mg/l สำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อคัลลัสและเซลล์
   1.2 MS เสริมด้วยฮอร์โมน IBA 2.0 mg/l และ BA 2.0 mg/l หรือ MS เสริมด้วยฮอร์โมน IBA 2.0 mg/l และ BA 1.0 mg/l สำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยอด (shoot culture)
2. สูตรอาหารที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำให้ยอดเพาะเลี้ยงของทองพันชั่งสร้างและเก็บสะสมสาร naphthoquinone ได้แก่ B5 เสริมด้วยฮอร์โมน BA 2.0 mg/l และ IAA 2.0 mg/l
3. เซลล์เพาะเลี้ยงของทองพันชั่งในสูตรอาหาร MS เสริมด้วยฮอร์โมน 2,4-D 2.0 mg/l และ kinetin 2.0 mg/l สามารถสร้างสาร naphthoquinone ได้ แต่เมื่อทำการ subculture เพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ไปเรื่อยๆ มีผลทำให้ความสามารถในการสร้างสาร naphthoquinone ของเซลล์เพาะเลี้ยงหายไป เนื่องจากความไม่คงตัวในการสร้างสารทุติยภูมิของเซลล์เพาะเลี้ยง
4. เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงของทองพันชั่งที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ สามารถสร้างสาร naphthoquinone ได้เพียงชนิดเดียวคือ rhinacanthin-C
5. ปริมาณ rhinacanthin-C ที่ตรวจพบในยอดเพาะเลี้ยงของทองพันชั่งยังน้อยกว่าปริมาณ rhinacanthin-C ที่พบในใบทองพันชั่งตามธรรมชาติ
6. ควรมีการพัฒนาสูตรอาหาร หรือใช้เทคนิคพิเศษอื่น เช่น Immobilization หรือ Elicitation มาใช้ในการเหนี่ยวนำให้เพิ่มการสร้างและเก็บสะสมสาร naphthoquinone ในเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงทองพันชั่ง

เอกสารอ้างอิง

โครงการสมุนไพรเพื่อการพึ่งตนเอง. 2531. ทองพันชั่ง : แก้กลาก เกลื้อน สังคัง. **ข่าวสารสมุนไพร** 32 : 32-35.

นันทวัน บุณยะประภัศร, บรรณาธิการ. 2530. **ก้าวไปกับสมุนไพร เล่ม 3** พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร:ธรรกมลการพิมพ์.

นันทวัน บุณยะประภัศร, บรรณาธิการ. 2541. **สมุนไพรไม้พื้นบ้าน เล่ม 2** พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร :โรงพิมพ์ประชาชน.

มาโนช วามานนท์ และเพ็ญนภา ทรัพย์เจริญ, บรรณาธิการ. 2530. **ยาสมุนไพร สำหรับงานสาธารณสุขมูลฐาน** พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร:โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก.

วรรณดี แต้โสตถิกุล. 2528. การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของพืชสมุนไพรที่ใช้ลดความดันโลหิต. **เชียงใหม่เภสัชสาร** 4 (1):23-30.

Charlwood, B. V. and Rhodes, M. J. C. 1990. Secondary production from plant tissue culture. Oxford:Clarendon Press.

Constabel, F. and Vasil, I. K. 1987. Cell culture and somatic cell genetics of plants. San Diego:Academic Press.

Kernan, M.R., Sendl, A., Chen, J.L., Jolad, S.D., Blanc, P., Murphy, J.T., Stoddart, C.A., Nanakorn, W., Balick, M.J., and Rozhon, E.J. 1997. Two new lignas with activity against influenza virus from the medicinal plant *Rhinacanthus nasutus*. **Journal of Natural Products** 60 (6) :635-637.

Kodama, O., Ichikawa, H., and Akatsuka, T. 1993. Isolation and identification of an antifungal naphtopyran derivative from *Rhinacanthus nasutus*. **Journal of Natural Products** 56 (2): 292-294.

Kuwahara, S., Awai, N., and Kodama, O. 1995. A revised structure for Rhinacanthone. **Journa of Natural Products** 58 (9): 1455-1458.

Sendl, A., Chen, J.L., Jolad, S.D., Stoddart, C., Rozhon, E., and Kernan, M. 1996. Two new naphthoquinones with antiviral activity from *Rhinacanthus nasutus*., **Journal of Natural Products** 59 (8) : 808-811.

Wu, T.S., Hsu, H.C., Wu, P.L., Leu, Y.L., Chan, Y. Y., Chern, C.Y., Yeh, M.Y., and Tien, H.J. 1998a. Napthoquinone esters from the root of *Rhinacanthus nasutus*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin** 46 (3):413-418.

Wu, T.S., Hsu, H.C., Wu, P.L., Teng, C.M., and Wu, Y.C. 1998b. Rhinacanthin-Q, a naphthoquinone from *Rhinacanthus nasutus* and its biological activity. **Phytochemistry** 49 (7) : 2001-2003.

Wu, T.S., Tien, J.J., Yeh, M.Y., and Lee, K.H. 1988. Isolation and cytotoxicity of rhinacanthin-A and - B, Two napthoquinones, from *Rhinacanthus nasutus*. **Phytochemistry** 27 (12) : 3787-3788.

Wu, T.S., Yang, C.C., Wu, PlL., and Liu, L.K. 1995. A quinol and steroids from the leaves and stems of Rhinacanthus nasutus. **Phytochemistry** 40 (4):1247-1249.