วารสารการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก Journal of Thai Traditional & Alternative Medicine
ปีที่ 9 ฉบับที่ 2 กันยายน-ธันวาคม 2554 Vol. 9 No. 2 September-December 2011

นิพนธ์ต้นฉบับ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเถาวัลย์เปรียง และปริมาณสารสำคัญ

ธัญญ์วัณณ์ มงคลชัยภักดิ์*
สรเพชร มาสุด*
ปภาวดี สุฉันทบุตร*

บทคัดย่อ

การศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเมล็ดเถาวัลย์เปรียงเพื่อให้เกิดแคลลัสโดยการทดลองใช้สูตรอาหาร 43, 43+C1, 43+C3, 43+C5 และสูตร 43+SA, 43+SA+C1, 43+SA+C3, 43+SA+C5 พบว่าสูตร 43+C1 เป็นสูตรที่เหมาะสมในการทำให้เกิดแคลลัสได้มากที่สุด แคลลัสมีขนาดความกว้าง ความยาวและความสูง 15.20 × 22.75 × 9.60 มิลลิเมตร (มม.) ที่ 1 เดือนและขนาด 18.65x24.35x11 มม. ที่ 2 เดือน เมื่อตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ เจนิสตีอิน (genistein) พบว่าแคลลัสสูตร43+C1 ที่ 1 เดือน มีปริมาณสารสำคัญสูงสุดเท่ากับ 8.00±0.44 มก./ก. (0.80%) รองลงมาคือแคลลัสสูตร 43+C3 ได้เท่ากับ 6.37±1.32 มก./ก. (0.64%) และแคลลัสสูตร 43+C5 ได้เท่ากับ 6.22±1.21 มก./ก. (0.62 %) ตามลำดับ จากผลการวิจัยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อให้เกิดแคลลัสที่มีสารสำคัญปริมาณสูงและการวิเคราะห์คุณภาพโดยใช้โครมาโทร-กราฟีสมรรถนะสูงหรือเอชพีเอลซี (High Performance Liquid Chromatography) สามารถนำมาพัฒนาการผลิตยาจากสมุนไพรจากการสร้างแคลลัสได้ในอนาคต เนื่องจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อให้เกิดแคลลัสจนสามารถสร้างสารสำคัญได้ปริมาณมากใช้ระยะเวลาอันสั้นเพียง 1-2 เดือน และสามารถเพิ่มปริมาณการผลิตโดยใช้ถังหมัก (Fermentor) ได้แต่เถาวัลย์เปรียงที่ขึ้นเองตามธรรมชาติจากป่าต้องใช้ระยะเวลานานในการเจริญเติบโตพร้อมที่จะนำมาทำยาเมื่อมีผู้ตัดใช้ทำเป็นยาจำนวนมาก เถาวัลย์เปรียงอาจหมดไปจากป่าเพราะไม่มีการปลูกทดแทนทำให้สูญพันธุ์ได้ อย่างไรก็ตามจากการศึกษาทางเคมีของเถาวัลย์เปรียงที่ใช้ลดการอักเสบ พบสารสำคัญเป็นพวกไอโซเฟลโวน (isoflavone) เช่น เจนิสตีอิน และอนุพันธุ์ มีรายงานฤทธิ์ต้านมะเร็งของไอโซเฟลโวนหลายชนิด รวมทั้งฤทธิ์ต้านการเคลื่อนที่ของเซลล์ ซึ่งจำเป็นต้องศึกษาสารออกฤทธิ์ของเถาวัลย์เปรียงต่อไป

คำสำคัญ : **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช, เถาวัลย์เปรียง, แคลลัส, เจนิสทีอีน**

ภูมิหลังและเหตุผล

เถาวัลย์เปรียงมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Derris scandens* (Rob.) Benth. วงศ์ Fabaccae - Papilionoideae[1] ชื่ออื่นๆ เช่น เถาตาปลา (นครราชสีมา), เครือเขาหนัง, เถาวัลย์เปรียง (ไทยภาคกลาง)[1] ย่านเหมาะ (นครศรีธรรมราช)[2] เถาวัลย์เปรียงเป็นไม้เถาขนาดใหญ่ ชอบเลื้อยพันตามต้นไม้ใหญ่ ขึ้นเองตามชายป่าและที่โล่งทั่วไป ใบเป็นใบประกอบแบบขนนก ใบย่อยรูปวงรี ดอกช่อห้อยลง ขนาดของดอกย่อยเล็กกว่าดอกสน ดอกสีชมพูอ่อนหรือสีขาว มีกลิ่นหอมอ่อน ๆ ผลเป็นฝักแบนเล็ก มีเมล็ด 2-4 เมล็ด[2] ขยายพันธุ์โดยการใช้เมล็ดและการปักชำ[2,3] ตามตำรายาโบราณเถารับประทานเป็นยาแก้ปวดเมื่อย แก้กษัย ถ่ายเสมหะลงสู่ทวารหนัก ถ่ายเส้นและกษัย ถ่ายเส้นเอ็น รักษาปัสสาวะพิการ ขับปัสสาวะ รักษาโรคบิด ไอหวัด รากใช้เบื่อปลา และฆ่าแมลง[3]

*สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

จากรายงานการวิจัย ลำต้นของเถาวัลย์เปรียงที่สกัดด้วย 50% เอทานอล มีฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันทั้งการศึกษาในหลอดทดลอง *(in vitro)* และในสัตว์ทดลอง *(in vivo)* เถาวัลย์เปรียงออกฤทธิ์เสริมภูมิคุ้มกัน[4] ฤทธิ์ต้านการอักเสบ[5,6] ต้านอนุมูลอิสระ[7] ลดความดันโลหิต[8] ต้านเชื้อรา[9] การศึกษาพิษเรื้อรังของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงด้วย 50% เอทานอลในหนูขาวโดยได้รับสารสกัดขนาด 6, 60 และ 600 มก./น้ำหนักตัว 1 กก./วัน หรือเทียบเท่าผงเถาวัลย์เปรียงแห้ง 0.03, 0.3 และ 3 ก./น้ำหนักตัว 1 กก./วัน หรือ 1, 10 และ 100 เท่าของขนาดใช้ในคนต่อวัน พบว่าไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของค่าโลหิตวิทยา ค่าทางชีวเคมีของซีรั่ม หรือจุลพยาธิสภาพของอวัยวะภายใน[10] สารสำคัญในเถาวัลย์เปรียงที่มีฤทธิ์ลดการอักเสบและต้านอนุมูลอิสระเป็นสารกลุ่มไอโซเฟลโวน (isoflavones) เช่น เจนิสตีอีน (genistein) และอนุพันธุ์ มีรายงานฤทธิ์ต้านมะเร็งของไอโซเฟลโอนหลายชนิด รวมทั้งฤทธิ์ต้านการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็ง[11]

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านอักเสบของเถาวัลย์เปรียง ทดลองทางคลินิกร่วมกับโรงพยาบาลศิริราชในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม[6] โดยเทียบกับยาต้านอักเสบนาโปรเซน (Naproxen) พบว่าเถาวัลย์เปรียงรักษาโรคข้อเข่าเสื่อมได้ดี และ มีแนวโน้มปลอดภัยกว่ายานาโปรเซน เพราะผู้ป่วยที่ได้รับยา นาโปรเซน มีอาการหิวบ่อย แสบท้อง จุกเสียดแน่นท้อง ในขณะที่ผู้ป่วยที่ได้รับสารสกัดเถาวัลย์เปรียงไม่มีอาการข้างเคียงดังกล่าว[12]

การศึกษาวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชของเถาวัลย์เปรียงเพื่อให้เกิดแคลลัสและหาปริมาณสารสำคัญในแคลลัสสำหรับการพัฒนาเป็นยาสมุนไพรและสามารถเพิ่มปริมาณการผลิตแคลลัสโดยใช้ Fermentor[13] ในอนาคต เนื่องจากเถาวัลย์เปรียงต้องใช้ระยะเวลาปลูกนานหลายปี จึงนำมาใช้เป็นยาได้อาจทำให้มีปัญหาเรื่องวัตถุดิบในอนาคต

ระเบียบวิธีศึกษา

สถานที่ทดลอง

1. ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

2. ห้องปฏิบัติการเภสัชวิทยา สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

วัสดุและสารเคมี

1. การเพาะเลี้ยงแคลลัสเถาวัลย์เปรียง

1.1 เมล็ดเถาวัลย์เปรียง จากมหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา

1.2 คลอร็อกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์

1.3 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ

1.4 เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง

1.5 ตู้ปลอดเชื้อ

1.6 มีด

1.7 คีม (forceps)

1.8 ตะเกียงแอลกอฮอล์

1.9 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารสูตรเอ็มเอส (MS : Murashige and Skooge)[14]

1.10 ไคเนติน (Kinetin)

1.11 2,4 D (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid)

1.12 กรดซิตริก (citric acid)

1.13 ไซโตซาน (chitosan)

1.14 กรดซาลิกไซลิก (salicylic acid)

2. การวิเคราะห์ปริมาณ genistein ของแคลลัสเถาวัลย์เปรียง

2.1 แคลลัสเถาวัลย์เปรียงบดละเอียดจำนวน 0.50 กรัมต่อตัวอย่าง

2.2 กระดาษกรองเบอร์ 4

2.3 ไนลอนเมมเบรนฟิลเตอร์ (nylon membrane filter) 0.2 ไมโครเมตร

2.4 สารมาตรฐานเจนิสตีอิน (genistein) (4',5,7 - trihydro-xyisoflavone) ของบริษัท Sigma

2.5 อะซีโตไนไตรล์ (acetonitrile) เกรด HPLC ของบริษัท Merck

2.6 เอทานอล เกรดวิเคราะห์ของบริษัท Merck

2.7 น้ำบริสุทธิ์จากการกรองเอาอนุภาคที่มีประจุออก (deionized water)

2.8 เครื่องโครมาโทรกราฟีสมรรถนะสูง (HPLC) ยี่ห้อ Waters 600 Pump รุ่น Waters 600 Detector รุ่น

Waters 996

2.9 โปรแกรมวิเคราะห์ Empower

2.10 คอลัมน์ Phenomenex® Kinetex C18 ขนาด 100x4.60 มิลลิเมตร 100 Å 2.6 ไมโครเมตร

2.11 เครื่องปั่นเหวี่ยง (SORVALL® RT7)

วิธีการ

1. การเพาะเลี้ยงแคลลัสเถาวัลย์เปรียง

1.1 นำเมล็ดเถาวัลย์เปรียงมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอร็อกซ์ 10 % นาน 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง

1.2 นำเมล็ดที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS[14] เมื่อเกิดยอดอ่อนนำยอดอ่อนมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS43 ซึ่งประกอบด้วย kinetin 3 มิลลิกรัม/ลิตร (มก./ล.) และ 2,4-D 1 มก./ล. เพิ่มธาตุเหล็กเท่าตัวรวมกับ citric acid 150 มก./ล. salicylic acid 150 มก./ล. และรวมกับ chitosan 0.1 % ความเข้มข้น 0, 1, 3 และ 5 มก./ล. จำนวน 4 สูตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1-2 เดือน คือ

1.2.1 MS 43 ประกอบด้วยอาหารสูตร MS รวมกับ kinetin 3 มก./ล., 2,4-D 1 มก./ล., เหล็กเท่าตัวและ citric acid 150 มก./ล.

1.2.2 MS43+C1 ประกอบด้วย อาหารสูตร MS รวมกับ kinetin 3 มก./ล., 2,4-D 1 มก./ล., เหล็กเท่าตัว, citric acid 150 มก./ล. และ chitosan 0.1 % ความเข้มข้น 1 มก./ล.

1.2.3 MS43+C3 ประกอบด้วยอาหารสูตร MS รวมกับ kinetin 3 มก./ล., 2,4-D 1 มก./ล., เหล็กเท่าตัว, citric acid 150 มก./ล. และ chitosan 0.1 % ความเข้มข้น 3 มก./ล.

1.2.4 MS43+C5 ประกอบด้วยอาหารสูตร MS รวมกับ kinetin 3 มก./ล., 2,4-D 1 มก./ล., เหล็กเท่าตัว, citric acid 150 มก./ล. และ chitosan 0.1 % ความเข้มข้น 5 มก./ล.

1.3 อีกการทดลองหนึ่งทำการทดลองโดยใช้สูตรเช่นเดียวกับข้อ 2 แต่ใส่ salicylic acid (SA) 150 มก./ล. ทุกสูตร

1.4 เก็บข้อมูลการเจริญเติบโตของยอดอ่อนเถาวัลย์เปรียง ซึ่งได้แก่ รูปร่างลักษณะของแคลลัส ขนาดของแคลลัส ลักษณะการเกิดสี และการเกิดราก

2. การวิเคราะห์หาปริมาณ genistein ของแคลลัสเถาวัลย์เปรียง

2.1 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

ชั่งตัวอย่างแคลลัส 0.50 กรัม แล้วเติม 50% เอทานอลจำนวน 20 มิลลิลิตร นำสารที่ได้ไปสลายด้วยคลื่นเสียง (sonicate) นาน 20 นาที แล้วปรับปริมาตรด้วย 50% เอทานอลจนได้ปริมาตร 25 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายไปปั่นเหวี่ยง 3,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที กรองสารละลายผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 และกรองผ่าน nylon membrane filter 0.2 ไมโครเมตร ดูดสารละลายที่ได้มา 1 มิลลิลิตรใส่ใน tube ขนาด 1 มิลลิลิตร

2.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

ละลายสารมาตรฐาน genistein (4',5,7-trihydroxyisoflavone) ปริมาณ 1.2 มิลลิกรัม ใน 50 % เอทานอล 5 มิลลิลิตร ปรับความเข้มข้นของสารมาตรฐานให้เหมาะสมกับปริมาณสารที่ได้จากตัวอย่าง จะได้กราฟมาตรฐาน ดังรูปที่ 1 และ 2

2.3 น้ำยาแยก

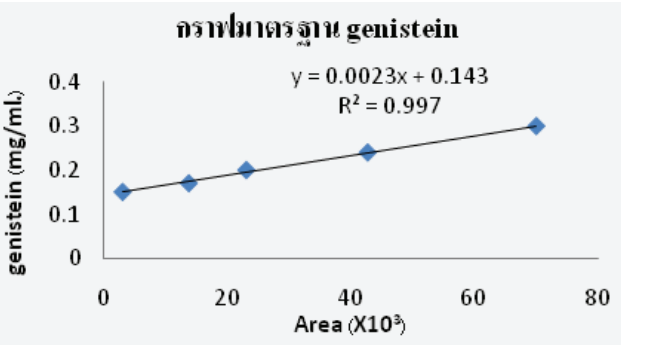
ใช้น้ำกลั่นผสมกับอะซิโตไนไตรล์ ผสมกันแบบวัฏภาคเคลื่อน (gradient) โดยใช้น้ำ:อะซีโตไนไตรล์ ที่เวลา 0 นาที (70:30), 6 นาที (60:40) และ 12 นาที (70:30)

2.4 อัตราเร็วของน้ำยาแยก

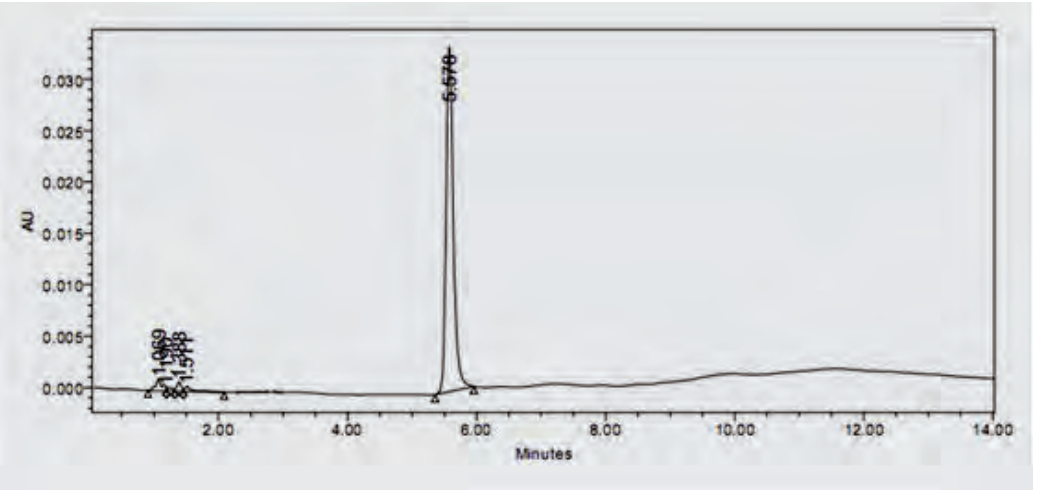
1 มิลลิลิตร/นาที

2.5 ปริมาณสารที่ใช้ในการฉีด

ใช้สารละลายตัวอย่างและสารละลายมาตรฐานชนิดละ



รูปที่ 1 กราฟมาตรฐานปริมาณสาร genistein



รูปที่ 2 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน genistein โดยใช้วิธี HPLC โดยใช้น้ำ:อะซีโตไนไตรล์ ที่เวลา 0 นาที (70:30), 6 นาที (60:40) และ 12 นาที (70:30) peak ขึ้นที่เวลา 5.67 นาที

20 ไมโครลิตร

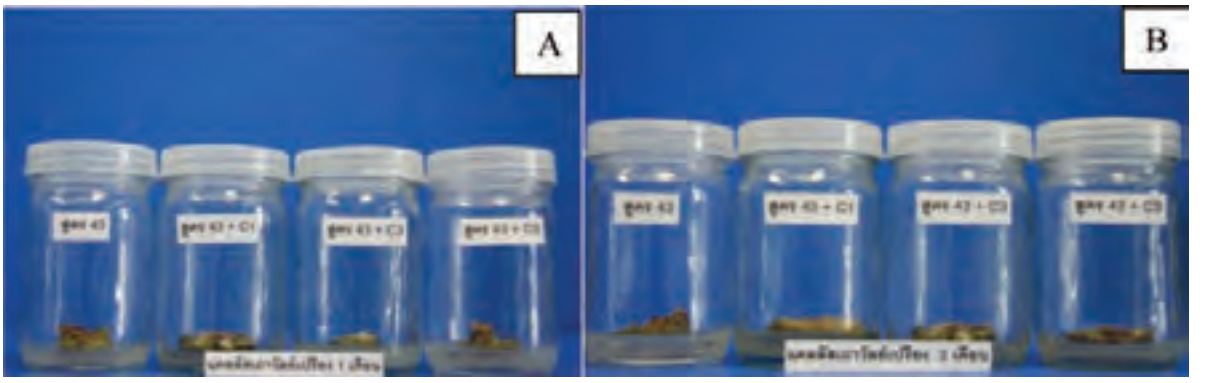
2.6 การตรวจสอบ

ใช้ตัวตรวจวัดชนิดโฟโตไดโอดแอเรย์ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร สังเกต peak ที่เกิดขึ้นในโครมาโทแกรม รูปที่ 2

ผลการศึกษา

1. การเพาะเลี้ยงแคลลัสเถาวัลย์เปรียง

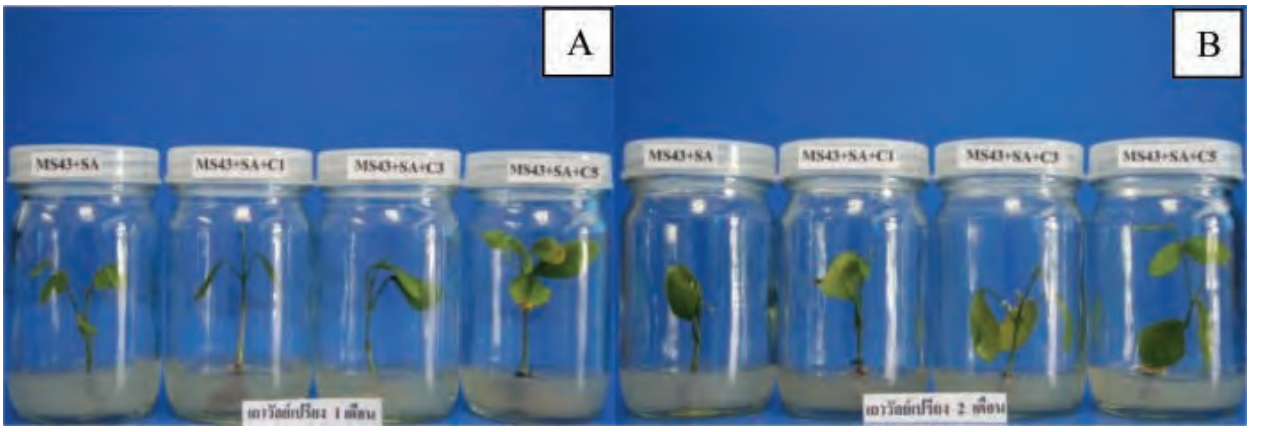
การใช้อาหารสูตร 43 และสูตร 43 ที่มี chitosan 0.1 % ขนาดความเข้มข้น 1, 3 และ 5 มิลลิกรัม/ลิตร (มก./ล.) ทำให้เกิดแคลลัสเพียงอย่างเดียว (รูปที่ 3 และตารางที่ 1) โดยแคลลัส มีลักษณะฟูแน่นสีเขียวปนสีน้ำตาลเข้ม ซึ่งแคลลัสที่อายุ 1 เดือน ของอาหารสูตร 43, 43+C1, 43+C3 และ 43+C5 มีขนาดแคลลัสเฉลี่ย กว้าง×ยาว×สูง เท่ากับ 10.20×20.95×7.35, 15.20×22.75×9.60, 12.80×21.70×8.90 และ 11×21.15×8.65 มิลลิเมตร (มม.) ตามลำดับ ในขณะที่แคลลัสอายุ 2 เดือน มีขนาดเฉลี่ยกว้าง×ยาว×สูง เท่ากับ 14.42×23.70×7.45, 18.65×24.35×11, 16.15×22.50×8.95 และ 15.55×22.35×8.90 มม. ตามลำดับ และจะเกิดแคลลัสได้ดีขึ้น เมื่อมี chitosan 0.1 % ขนาดความเข้มข้น 1 มก./ล. การเพิ่ม salicylic acid ขนาดความเข้มข้น 150 มก./ล. ในอาหารสูตร 43 เพียงอย่างเดียวหรือมี chitosan 0.1 % ขนาดความเข้มข้น 1, 3 และ 5 มก./ล. รวม 4 สูตรทำให้เกิดแคลลัสได้เพียงเล็กน้อยแต่เกิดยอดและรากได้ด้วย (รูปที่ 4 และตารางที่ 2, 3) โดยแคลลัสมีลักษณะแน่นสีน้ำตาลเข้มปนสีเขียวและมีรากสีน้ำตาลยาวประมาณ 1-2 เซนติเมตร และ



รูปที่ 3 แสดงการเกิดแคลลัสของเถาวัลย์เปรียงบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตร 43, 43+C1, 43+C3, 43+C5 เป็นเวลา 1 เดือน (A) และ 2 เดือน (B)

ตารางที่ 1 แสดงลักษณะ สี ความยาว ความกว้าง และความสูงของแคลลัสเถาวัลย์เปรียง เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร 43, 43+C1, 43+C3 และ 43+C5 เป็นเวลา 1 และ 2 เดือน

สูตรอาหาร	ลักษณะแคลลัส	สีแคลลัส	ความกว้างของแคลลัสเฉลี่ย (มม.)	ความยาวของแคลลัสเฉลี่ย (มม.)	ความสูงของแคลลัสเฉลี่ย (มม.)
		แคลลัส อายุ 1 เดือน			
MS 43	แน่น	สีเขียวปนสีน้ำตาลเข้ม	10.20	20.95	7.35
MS 43+C1	ฟู, แน่น	สีเขียวปนสีน้ำตาลเข้ม	15.20	22.75	9.60
MS 43+C3	ฟู, แน่น	สีเขียวปนสีน้ำตาลเข้ม	12.80	21.70	8.90
MS 43+C5	แน่น	สีเขียวปนสีน้ำตาลเข้ม	11	21.15	8.65
		แคลลัส อายุ 2 เดือน			
MS 43	แน่น	สีเขียวปนสีน้ำตาลเข้ม	14.42	23.70	7.45
MS 43+C1	ฟู, แน่น	สีเขียวปนสีน้ำตาลเข้ม	18.65	24.35	11
MS 43+C3	ฟู, แน่น	สีเขียวปนสีน้ำตาลเข้ม	16.15	22.50	8.95
MS 43+C5	แน่น	สีเขียวปนสีน้ำตาลเข้ม	15.55	22.35	8.90



รูปที่ 4 แสดงการเกิดแคลลัส ยอด และรากของเถาวัลย์เปรียงบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS43+SA, MS43+SA+C1, MS43+SA+C3, MS43+SA+C5 เป็นเวลา 1 เดือน (A) และ 2 เดือน (B)

เกิดยอดเดียวต่อหนึ่งต้น

2. การตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ genistein ในแคลลัสเถาวัลย์เปรียง

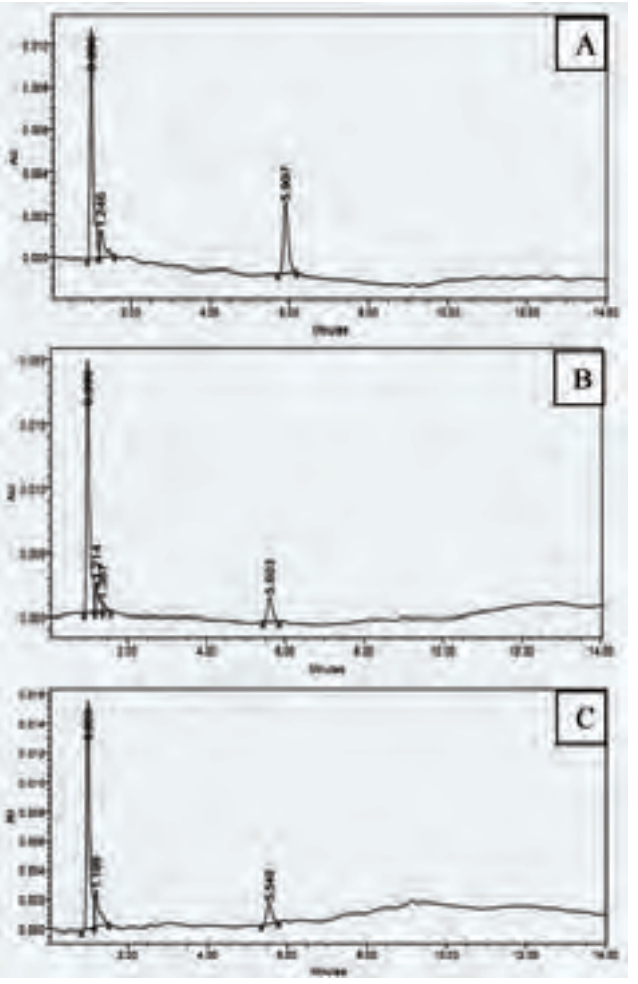
การวิเคราะห์หาปริมาณ genistein ในแคลลัส พบว่าในแคลลัสที่นำมาสกัดจากการเลี้ยงแคลลัสด้วยอาหารทั้ง 3 สูตร พบปริมาณ genistein โดยแคลลัสจากอาหารสูตร 43+C1 มีปริมาณ genistein มากที่สุด รองลงมาคืออาหารสูตร 43+C3 และอาหารสูตร 43+C5 พบปริมาณ genistein เท่ากับ 8.00±0.44 มก./ก. (0.80 %), 6.37±1.32 มก./ก. (0.64 %) และ 6.22±1.21 มก./ก. (0.62 %) ที่ 1 เดือนตามลำดับ (รูปที่ 5, ตารางที่ 4)

ตารางที่ 2 แสดงลักษณะการเกิดยอด ราก จำนวนราก สีของแคลลัส ลักษณะของแคลลัส ความยาว ความกว้าง และความสูงของเถาวัลย์เปรียง เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS43+SA, MS43+SA+C1, MS43+SA+C3 และ MS43+SA+C5 เป็นเวลา 1 เดือน

สูตรอาหาร	ลักษณะการเกิดยอด	ลักษณะของราก	จำนวนราก/ต้นเฉลี่ย	ลักษณะของแคลลัส	สีของแคลลัส	ความกว้างแคลลัสเฉลี่ย (มม.)	ความยาวแคลลัสเฉลี่ย (มม.)	ความสูงแคลลัสเฉลี่ย (มม.)
MS43+SA	เกิดยอดเดียวต่อหนึ่งต้น	รากสีน้ำตาลและมีความยาวประมาณ 1-2 ซม.	0.5	แน่น	สีน้ำตาลเข้มปนสีเขียว	1.65	1.60	1.40
MS43+SA+C1	เกิดยอดยอดเดียวต่อหนึ่งต้น	รากสีน้ำตาลและมีความยาวประมาณ 1-2 ซม.	2.6	แน่น	สีน้ำตาลเข้มปนสีเขียว	3.6	2.8	2.55
MS43+SA+C3	เกิดยอดยอดเดียวต่อหนึ่งต้น	รากสีน้ำตาลและมีความยาวประมาณ 1-2 ซม.	0.85	แน่น	สีน้ำตาลเข้มปนสีเขียว	2.15	2.95	1.60
MS43+SA+C5	เกิดยอดยอดเดียวต่อหนึ่งต้น	รากสีน้ำตาลและมีความยาวประมาณ 1-2 ซม.	1.05	แน่น	สีน้ำตาลเข้มปนสีเขียว	2.45	2.40	1.25

ตารางที่ 3 แสดงลักษณะการเกิดยอด ราก จำนวนราก สีของแคลลัส ลักษณะของแคลลัส ความยาว ความกว้าง และความสูงของเถาวัลย์เปรียง เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS43+SA, MS43+SA+ C1, MS43+SA+C3 และ MS43+SA+C5 เป็นเวลา 2 เดือน

สูตรอาหาร	ลักษณะการเกิดยอด	ลักษณะของราก	จำนวนราก/ต้นเฉลี่ย	ลักษณะของแคลลัส	สีของแคลลัส	ความกว้างแคลลัสเฉลี่ย (มม.)	ความยาวแคลลัสเฉลี่ย (มม.)	ความสูงแคลลัสเฉลี่ย (มม.)
MS43+SA	เกิดยอดเดียวต่อหนึ่งต้น	รากสีน้ำตาลมีความยาวประมาณ 1-2 ซม.	0.75	แน่น	สีน้ำตาลเข้มปนสีเขียว	0.85	0.65	0.5
MS43+SA+C1	เกิดยอดเดียวต่อหนึ่งต้น	รากสีน้ำตาลมีความยาวประมาณ 1-2 ซม.	2.05	แน่น	สีน้ำตาลเข้มปนสีเขียว	2.1	1.9	1.7
MS43+SA+C3	เกิดยอดเดียวต่อหนึ่งต้น	รากสีน้ำตาลและมีความยาวประมาณ 1-2 ซม.	0.95	แน่น	สีน้ำตาลเข้มปนสีเขียว	1.65	1.30	0.6
MS43+SA+C5	เกิดยอดเดียวต่อหนึ่งต้น	รากสีน้ำตาลและมีความยาวประมาณ 1-2 ซม.	1.3	แน่น	สีน้ำตาลเข้มปนสีเขียว	2.15	2.05	1.60



รูปที่ 5 โครมาโทแกรมแสดงสาร genistein ที่ได้จากแคลลัสเถาวัลย์เปรียงโดยการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS43+C1 (A), MS43+C3 (B) และ MS43+C5 (C)

ตารางที่ 4 แสดงปริมาณ genistein ของแคลลัสเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร 43+C1, 43+C3 และ 43+C5 เป็นเวลา 1 เดือน

สูตรอาหาร	ปริมาณ genistein เฉลี่ย (มก./ก.)	จำนวนตัวอย่าง
MS 43+C1	8.00±0.44	4
MS 43+C3	6.37±1.32	4
MS 43+C5	6.22±1.21	4

วิจารณ์

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสูตร 43+C1 เป็นสูตรอาหารที่สามารถสร้างแคลลัสได้สูงสุด และมีปริมาณ genistein สูงถึง 8.00±0.44 มก./ก. (0.80 %) ซึ่งสูงกว่าสูตร 43+C3 และสูตร 43+C5 เนื่องจากปริมาณ chitosan ที่ใช้ 0.1% ความเข้มข้น 1 มก./ล. เป็นปริมาณที่เหมาะสม เมื่อปรับปริมาณเข้มข้นไปเป็น 3 และ 5 มก./ล. จะทำให้เกิดแคลลัสลดลง และเกิดการปล่อยสารสีน้ำตาลในอาหารเพิ่มขึ้นการเพิ่ม salicylic acid ขนาดความเข้มข้น 150 มก./ล. ในอาหารสูตร 43 เพียงอย่างเดียวหรือมี chitosan 0.1 % ขนาดความเข้มข้น 1, 3 และ 5 มก./ล. รวม 4 สูตรทำให้เกิดแคลลัสได้เพียงเล็กน้อย แต่เกิดยอดและรากได้ดี ซึ่งการสร้าง genistein ในแคลลัส สูตร 43+C1 มีปริมาณ 8.00±0.44 มก./ก. (0.80 %) ในขณะที่ผลการวิจัยในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้ตรวจหาปริมาณ genistein ในธรรมชาติจำนวน 19 แหล่ง พบปริมาณสาร genistein อยู่ในช่วง 6.29-53.92 มก./ก. (0.63-5.40 %)[15] ซึ่งผลการทดลองดังกล่าว มีโอกาสในการผลิตยาจากการสร้างแคลลัสได้ในอนาคต เนื่องจากการทำให้เกิดแคลลัสใช้เวลา 1-2 เดือน แต่การใช้เถาวัลย์เปรียงจากธรรมชาติใช้เวลาปลูกนานหลายปี จึงจะนำมาใช้เป็นยาได้

สรุป

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชของเถาวัลย์เปรียงเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสทดลองโดยใช้อาหารสูตร 43, สูตร 43+C1, สูตร 43+C3 และสูตร 43+C5 พบว่าสูตร 43+C1 ทำให้เกิดแคลลัสได้มากที่สุดที่ 1 เดือนและ 2 เดือน เมื่อทดลองใส่ salicylic acid ลงไปทั้ง 4 สูตร จะเกิดแคลลัสไม่ดีแต่เกิดยอดแทน เมื่อนำแคลลัสสูตร 43+C1 สูตร 43+C3 และสูตร 43+C5 มาวิเคราะห์หาปริมาณ genistein จะมีค่าเท่ากับ 8.00_0.44 มก./ก. (0.80 %), 6.37±1.32 มก./ก. (0.64 %) และ 6.22±1.21 มก./ก. (0.62 %) ตามลำดับ

เอกสารอ้างอิง

1. เต็ม สมิตินันทน์. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย. ฉบับแก้ไขเพิ่มเติม พ.ศ. 2544. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: บริษัท ประชาชน จำกัด; 2554. หน้า 184.
2. พเยาว์ เหมือนวงศ์ญาติ. สมุนไพรก้าวใหม่ (แก้ไขปรับปรุงใหม่จากตำราวิทยาศาสตร์สมุนไพร). พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: บริษัท ที.พี. พริ้นท์ จำกัด; 2537. หน้า 86-7.
3. วิทย์ เที่ยงบูรณธรรม. พจนานุกรมสมุนไพรไทย. กรุงเทพฯ: โอเอสพริ้นติ้ง เฮ้าส์; 2531. หน้า 349-50.
4. Chuthaputhi A, Chavalittumrong C. Immunomodulating activity of *Derris scandens* Benth. Thai J Pharm Sci 1998;22:137-48.

5. Laupattarakasem P, Houghton PJ, Hoult JR, Inharat A. An evaluation of the activity related to inflammation of four plants used in Thailand to treat arthritis. J Ethnopharmacol 2003;85:207-13.
6. กัลยา อนุลักขณาปกรณ์, บรรจง ชาวไร่, ยุวดี เมตตาเมธา, ประไพ วงศ์สินคงมั่น, อภิรักษ์ ศักดิ์เพ็ชร, จารีย์ บันสิทธิ์, ปราณี ชวลิตธำรง. ฤทธิ์ต้านอักเสบของผักคาวตอง (*Houttluynia cordata* Thunb.) และเถาวัลย์เปรียง (*Derris scandens* Benth.). สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข [สืบค้น 7 กันยายน 2554]. Available from http://www.dtam.moph.go.th/alternative/
7. ฐิติพร ทับทิมทอง, กัลยา อนุลักขณาปกรณ์, จิรานุช มิ่งเมือง, อภิรักษ์ ศักดิ์เพ็ชร, จารีย์ บันสิทธิ์. ฤทธิ์การต้านออกซิเดชันของเถาวัลย์เปรียง, รางจืด, ผักคาวตอง, ปัญจขันธ์ และบัวบก. [สืบค้น 18 พฤศจิกายน 2554]. Available from http://www.dtam.moph.go.th/alternative/viewstory.php?id=494
8. Jansakul C, Srichanbarn A, Saelee A. Some pharmacological studies of a hypotensive fraction from *Derris Scandens*. J Sci Soc Thailand 1997;23:323-34.
9. Sekine T, Inagaki M, Koseki T, Murakoshi I, Fuji Y, Yamamoto K, Ruangrungsi N, Ikegami F. Antifungal constituents of Thai medicinal plants, *Derris scandens* and *Rauwolfia verticillata*. Current advances in natural Product research. The Third NRCT-JSPS Joint Seminar. Bangkok, Thailand. 1996;229-35.
10. Chavalittumrong P, Chivapat S, Chuthaputti A, Rattanajarasroj S, Panyamang S. Chronic toxicity study of *Derris scandens*. Songklanakarin J Sci Technol 1999;21:426-33.
11. พิสมัย เหล่าภัทรเกษม, บรรจบ ศรีภา, วิรุฬห์ เหล่าภัทรเกษม. ฤทธิ์ต้านการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งของเถาวัลย์เปรียงต่อเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี. ศรีนครินทร์เวชสาร 2550;22:339-45.
12. Kuptniratsaikul V, Pinthong T, Bunjob M, Thanakhumtorn S, Chinswangwatanakul P, Thamlikitkul V. Efficacy and safety of *Derris scandens* Benth. extracts in patients with knee osteoarthritis. J Altern Complement Med 2011;17:147-53.
13. Stanbury PF, Whitakser A, Hall SJ. Principles of Fermentation Technology. Oxford: Pergamon Press; 1995.
14. Murashige T, Skooge T. A revised medium for rapid growth bioassays with tobacco tissue culture. Physiol Plantarum 1962;15:473-93.
15. ธัญญ์วัณณ์ มงคลชัยภักดิ์, สรเพชร มาสุด, ปภาวดี สุฉันทบุตร. การศึกษา DNA Fingerprint และคุณภาพทางเคมีของเถาวัลย์เปรียงจากแหล่งต่างๆ และแคลลัส. ใน เอกสารการประชุมรายงานติดตามความก้าวหน้าและประเมินโครงการวิจัย สถาบันวิจัยสมุนไพร ประจำปีงบประมาณ 2554: 22 สิงหาคม 2554; ณ ห้องประชุม 806 อาคาร 8 กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นนทบุรี; 2554. 18 หน้า.

Abstract

Tissue Culture of *Derris scandens* Benth. and Its Component Contents

Thanyawan Mongkolchaipak*, Sorrapetch Marsud*, Paparvadee Suchantaboot*

**Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Nonthaburi Province*

This study on tissue culture of the seed of *Derris scandens* Benth. for callus formation was performed in various MS43 medium formulations: 43, 43+C1, 43+C3, 43+C5 and 43+SA, 43+SA+C1, 43+SA+C3, 43+SA+C5. It was found that medium 43+C1 was the most appropriate formulation for callus initiation by measuring its width, length and height at one and two months as 15.20 × 22.75 × 9.60 mm and 18.65 × 24.35 × 11.00 mm, respectively. Genistein, an important chemical constituent, was determined by high performance liquid chromatography (HPLC) in 43+C1, 43+C3 and 43+C5 media for calli at 1 month of age and the amount of genestein was found to be 8.00 ± 0.44 mg/g (0.80%), 6.37 ± 1.32 mg/g (0.64%) and 6.22 ± 1.21 mg/g (0.62%), respectively. The results showed that callus formation by tissue culture technique has the potential to be developed to enhance genistein production in a few months. Besides, a fermentor could also help increase its production at the same time. *D. scandens* naturally grown in the forest takes many years for genistein formation and the plants might become extinct if they are collected in large amounts for medicinal purposes. Isoflavones, genistein and derivatives have been reported to relieve inflammation and possess anti-cancer activity. Further active ingredient study is needed.

Key words: **tissue culture, *Derris scandens* Benth., callus, genistein**