

การชักนำแคลลัสและการผลิตสาร Rosmarinic acid ของโปบิต

สรเพชร มาสุต*, ทิพวรรณ ปรีกमानนท์, เสกขตกร บัวเบา, กชพร โชติมนิธรรม,
ปภาวดี สุฉันทบุตร, กรวิชญ์ สมคิด, ศิริวรรณ ชัยสมบุรณ์พันธ์

สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ตำบลตลาดขวัญ อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี 11000

* ผู้รับผิดชอบบทความ: Sorrapetch.m@dmsc.mail.go.th

บทคัดย่อ

บทนำและวัตถุประสงค์: โปบิต (*Helicteres isora* L.) เป็นพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลากหลาย มีสารต้านอนุมูลอิสระ ด้านมะเร็ง ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ และฤทธิ์ลดไขมันในเลือด การเพาะปลูกโปบิตมีปริมาณสารออกฤทธิ์ไม่สม่ำเสมอเนื่องจากปัจจัยหลายประการ ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาอาหารเลี้ยงเซลล์ของโปบิตที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำให้เกิดสาร Rosmarinic acid (RA) ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

วิธีการศึกษา: นำตาข้างที่ปราศจากเชื้อของโปบิตมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร Marashige และ Skoog (MS) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตไโคอะซุรอน (TDZ) และกรดแนฟทาเลินอะซิติก (NAA) เป็นระยะเวลา 45 วัน จนเกิดแคลลัส หลังจากนั้นหาค่า RA ในแคลลัส เปรียบเทียบกับผลโปบิตที่เก็บจากแหล่งธรรมชาติและแหล่งปลูก ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

ผลการศึกษา: จากผลการศึกษาพบว่า ตาข้างของโปบิตสามารถสร้างแคลลัสได้ดีในอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 45 วัน โดยสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสของโปบิตมีเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 2.9 ± 0.58 เซนติเมตร ความเข้มข้นของสาร RA ที่วัดได้จากแคลลัสของโปบิตอยู่ที่ร้อยละ 0.3939 ของน้ำหนักแห้ง และสูงกว่าจากแหล่งธรรมชาติประมาณ 4.5 เท่า

อภิปรายผล: การเพาะเลี้ยงแคลลัสสามารถเพิ่มประสิทธิภาพ และประสิทธิผลในการสร้างสารสำคัญในพืชสมุนไพรที่ต้องการได้ นอกจากนี้ยังช่วยลดปัจจัยต่าง ๆ ที่เกิดจากการสกัดสารจากพืชโดยตรง เช่น ร่นระยะเวลา ต้นทุนต่าง ๆ รวมถึงการปนเปื้อนสารเคมี โลหะหนัก และเชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ ดังนั้นสารที่ได้จากกระบวนการนี้จึงมีคุณภาพ และเหมาะสมต่อขยายไปใช้ทางการแพทย์ และทางอุตสาหกรรมสารสกัดพืชสมุนไพรต่อไป

ข้อสรุป และข้อเสนอแนะ: สูตรอาหารนี้มีความเหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงแคลลัสในการผลิตสาร RA อย่างไรก็ดีตาม การศึกษานี้จัดทำขึ้นเฉพาะเทคนิคการเพาะเลี้ยงแคลลัสพื้นฐานเท่านั้น การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตสาร RA สามารถทำได้โดยการเติมสารกระตุ้นอื่น ๆ

คำสำคัญ: โปบิต, แคลลัส, เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

Callus Induction and Rosmarinic Acid Production of *Helicteres isora* L.

Sorrapetch Marsud*, Tippawan Prakmanon, Sekrachatakorn Buabao, kotchaporn Chotmanotham, Paparvadee Suchantaboot, Korravit Somkid, Siriwan Chaisomboonpan

Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Talat Khwan Sub-District, Muang District, Nonthaburi 11000, Thailand

*Corresponding author: Sorrapetch.m@dmsc.mail.go.th

Abstract

Introduction and Objective: *Helicteres isora* L. is a medicinal plant (known in Thai as *po bit*) that exhibits numerous pharmacological properties such as antioxidant, anticancer, antibacterial and hypolipidemic activities. The cultivation of *H. isora* has inconsistent amounts of active substances due to many factors. Therefore, the objective of this study was to develop a suitable medium to induce rosmarinic acid (RA) substance from *H. isora* callus using a plant tissue culture system.

Methods: Firstly, the sterile lateral bud of *H. isora* was used and cultured on Marashige and Skoog (MS) medium which contains plant growth regulator, thidiazuron (TDZ) and naphthaleneacetic acid (NAA) for 45 days. The RA was determined in callus using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) technique.

Results: The treatment of lateral bud with MS medium containing 0.4 mg/L TDZ and 0.3 mg/L NAA for 45 days could induce *H. isora* callus at 2.9 ± 0.58 cm in diameter. The RA concentration was 0.3939% in dry weight and showed approximately 4.5 times higher than those of the natural sources.

Discussion: Callus culture can increase the efficiency and effectiveness of the desired active compounds in the herbal plant. In addition, it can reduce various factors that are caused by extracting substances directly from plants, such as reduced time, cost, including the contamination of chemicals, heavy metals, and various microorganisms. Therefore, the substances obtained from this process are of high quality and suitable for further use in both the medical and the herbal plant extract industry.

Conclusion and Recommendation: This suitable medium is for callus culture of RA production. However, this study was based on the basic callus culture technique only. Increasing the efficiency of RA production can be done by adding other stimulants.

Key words: *Helicteres isora* L., callus, plant tissue culture

บทนำและวัตถุประสงค์

ปอบิด มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Helicteres isora* L. เป็นพืชในวงศ์ Malvaceae^[1] เป็นพืชที่ขึ้นเองตามริมป่าเบญจพรรณ ป่าเต็งรัง ที่รกร้าง พบได้ทั่วไปทั้งในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ จีน และอินเดีย ลักษณะเป็นไม้พุ่ม สูงไม่มากประมาณ 1-2 เมตร ใบเดี่ยว รูปไข่กว้าง ขอบใบหยัก ออกดอกปีละครั้ง

กลีบดอกสีส้มอิฐ เป็นหลอด เมื่อติดฝัก เป็นฝักยาว 3-4 เซนติเมตร บิดเป็นเกลียวเมื่อแก่จะแตกเป็นมีสีน้ำตาลดำ^[2] การแพทย์พื้นบ้านไทยมีการใช้ปอบิดเป็นยาบำรุงธาตุ แก้ปวดท้อง ท้องอืด ท้องเสีย ขับลม แก้บิด ขับเสมหะ รักษาอาการกระเพาะอาหารเป็นแผลหรืออักเสบเรื้อรัง^[3] นอกจากนี้ มีรายงานวิจัยในสรรพคุณลดระดับน้ำตาลและไขมันในเลือด รวมถึง

การวิจัยในหลอดทดลองพบว่ามีสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ เช่น *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella abony*, *Proteus vulgaris*, *Micrococcus luteus*, *Aspergillus niger* และ *Candida albican*^[4-6] จากรายงานการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของปอบิต พบว่า มีสารกลุ่ม glycosides, phytosterol, saponins และ flavonoids เช่น rosmarinic acid, 4'-O- β -D-glucopyranosyl-rosmarinic acid, helisterculins A, helisterculin B, helisoringallic acid, coumaric acid, β -sitosterol, betulinic acid, oleanolic acid, daucosterol, cucurbitacin B, isocucurbitacin B, sanguinarine, berberine chloride และ muscimol เป็นต้น^[7-11] สาร rosmarinic acid (RA) ถูกนำมาใช้ในอาหารและเครื่องสำอาง^[12] มีการศึกษาทางเภสัชวิทยาพบว่าช่วยต้านเชื้อไวรัส^[13] ต้านเชื้อ HIV-1^[14] ต้านเชื้อแบคทีเรีย ต้านการอักเสบ และมะเร็ง^[15] เป็นต้น นอกจากนี้มีผู้ศึกษาพบว่ามีฤทธิ์ต่อต้านอนุมูลอิสระดีกว่าวิตามินอีหรืออนุพันธ์ของวิตามินอี (Trolox)^[16] แสดงให้เห็นว่าสารสำคัญในปอบิตมีศักยภาพในการนำไปใช้ประโยชน์ อย่างไรก็ตามแหล่งวัตถุดิบที่ได้จากธรรมชาติอาจให้สารสำคัญที่ไม่สม่ำเสมอ จากปัจจัยทางด้านสายพันธุ์ สภาพภูมิอากาศ ลักษณะภูมิประเทศ รวมถึงวิธีการปลูก ทำให้ได้วัตถุดิบมีสารสำคัญต่ำ การใช้วิธีทางห้องปฏิบัติการด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในรูปของแคลลัส (callus culture) นับว่าเป็นวิธีหนึ่งที่น่าสนใจนำมาใช้เป็นแหล่งผลิตสารทุติยภูมิทดแทนการสร้างสารดังกล่าวที่ได้จากตามธรรมชาติ เทคนิคดังกล่าวสามารถควบคุมสภาวะในห้องทดลองได้ สามารถผลิตสารได้ต่อเนื่องโดยไม่ขึ้นกับสภาพแวดล้อม

ฤดูกาล เป็นต้น

ดังนั้น การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการชักนำแคลลัสและการผลิตสาร Rosmarinic acid ของปอบิตเพื่อเป็นแหล่งวัตถุดิบที่มีคุณภาพทดแทนแหล่งที่ได้จากธรรมชาติเพื่อนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ เพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจเชิงพาณิชย์ต่อไป

ระเบียบวิธีศึกษา

1. วัสดุ

1.1 พืชสมุนไพร

ทำการเก็บตัวอย่างต้นปอบิต *Helicteres isora* L. จากจังหวัดตาก ตัวอย่างดังกล่าวผ่านการพิสูจน์ชื่อทางวิทยาศาสตร์นำมาเก็บไว้เป็นแหล่งอ้างอิงพรรณไม้ในห้องพิพิธภัณฑ์พืช ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ รหัส DMSC 5270 นำฝักปอบิตมาแยกเอาเมล็ดออก เมล็ดจะมีลักษณะสีน้ำตาล นำเมล็ดที่ได้แช่น้ำทิ้งไว้ 1 คืน จากนั้นนำไปเพาะลงในกระบะปลูก ต้นกล้าจะเริ่มงอกใช้ระยะเวลาประมาณ 3-4 เดือน จากนั้นนำต้นกล้าไปปลูกลงในแปลงปลูกของสถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จังหวัดนนทบุรี (Figure 1) เมื่ออายุต้นได้ 3 เดือน ตัดส่วนตาข้างไปเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และเมื่อต้นปอบิตอายุได้ 1 ปี 3 เดือน เก็บส่วนฝักเพื่อใช้ในการตรวจหาปริมาณสารสำคัญต่อไป

1.2 เครื่องมือ

เครื่องชั่งไฟฟ้าความละเอียด 0.1-0.01 มิลลิกรัม (Sartorius รุ่น AX224) เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (GonDO รุ่น PL-700 PCS) เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อแบบオートเคลฟ (Zealway รุ่น FD 80 R) ตู้ปราศจากเชื้อแบบ ClassII (BIOBASE รุ่น BSC-

1300IIA-X) เตาอบร้อน (Mettler รุ่น UNE 600) ตู้เย็น (refrigerator) เครื่อง HPLC (Shimadzu รุ่น Nexera LC-40)

1.3 เครื่องแก้วและวัสดุวิทยาศาสตร์

โกรงบดยา (medicine grinder) เครื่องแก้ว (glassware) มีดผ่าตัด (scalpel) ปากคีบจับเนื้อเยื่อ (forceps) คอลัมน์ชนิด C18 ขนาด 4.6×150 มิลลิเมตร 5 ไมครอน การ์ดคอลัมน์ 4.0×10 มิลลิเมตร, PVDF membrane filter 0.2 ไมครเมตร, membrane filter 0.45 ไมครเมตร, nylon filter syringe 0.2 ไมครเมตร, กระดาษกรองเบอร์

1.4 สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog)^[17], ไฮเตอร์®, 6% w/w (6% Sodium hypochlorite w/w), แอลกอฮอล์

95%, BAP (6-Benzylaminopurine), NAA (1-Naphthaleneacetic acid), IBA (Indole-3-butyric acid), IAA (Indole-3-acetic acid), KN (Kinetin), TDZ (Thidiazuron), น้ำตาลซูโครส, ผงวุ้น (PhytoTech Labs), ปุ๋ยสูตร 15-15-15 และ ปุ๋ยสูตร 46-0-0

2. วิธีการศึกษา

2.1 การเตรียมชิ้นส่วนพืช

ใช้ส่วนตาข้างของปอปิดข้อที่ 1-4 นับจากยอด ที่มีความสมบูรณ์ ไม่มีการเข้าทำลายของโรค และแมลง จากต้นปอปิดอายุ 3 เดือน ที่ปลูกในสถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จังหวัดนนทบุรี นำมาฟอกให้ปลอดเชื้อ (Figure 1)

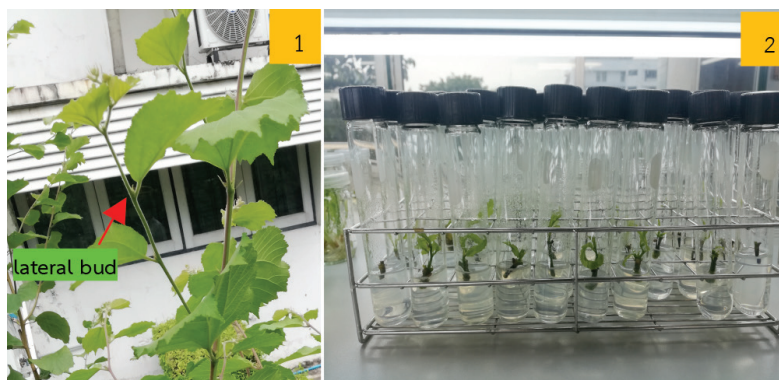


Figure 1 Tissue selection of *H. isora*; (1) lateral bud, and (2) lateral bud surface sterilization on MS medium

2.2 การศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนของต้นปอปิด

นำชิ้นส่วนของตาข้างต้นปอปิดที่ไม่แก่หรืออ่อนจนเกินไปมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปาเสร็จแล้วนำมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรต์

(ไฮเตอร์®) หนึ่งครั้งและสองครั้งที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ จำนวน 5 กรรมวิธี (treatment) (T1-T5) โดยเฉพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของข้อลงบนอาหารสูตร MS ในหลอดทดลอง หลอดละ 1 ชิ้นส่วน จำนวน 20 ขั้วต่อกรรมวิธี นำมาเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะการให้แสง

ด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ ที่อุณหภูมิ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ เป็นระยะเวลา 2 เดือน

1. ฟอกด้วยไฮเตอร์® ที่ความเข้มข้นร้อยละ 15 นาน 10 นาที และไฮเตอร์® ร้อยละ 15 นาน 10 นาที (T1)

2. ฟอกด้วยไฮเตอร์® ที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 นาน 15 นาที และไฮเตอร์® ร้อยละ 10 นาน 10 นาที (T2)

3. ฟอกด้วยไฮเตอร์® ที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 นาน 20 นาที และไฮเตอร์® ร้อยละ 10 นาน 5 นาที (T3)

4. ฟอกด้วยไฮเตอร์® ที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 นาน 20 นาที และไฮเตอร์® ร้อยละ 10 นาน 10 นาที (T4)

5. ฟอกด้วยไฮเตอร์® ที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 นาน 20 นาที และไฮเตอร์® ร้อยละ 10 นาน 7 นาที (T5)

2.3 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส

ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส โดยนำเนื้อเยื่อส่วนยอดที่ปลอดเชื้อมา subculture นำมาทดลองเพาะเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตสูตรชักนำแคลลัสที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ อาหารสูตร IBA 1-5 มิลลิกรัมต่อลิตร (mg/l) 1.25MS+IBA 1-5 mg/l KN 1-5 mg/l TDZ 0.2-1.5 mg/l และ TDZ 0.2-1.5 mg/l ร่วมกับ NAA 0.1-1 mg/l รวมจำนวน 26 สูตรเลี้ยงในห้องปลอดเชื้อที่ควบคุมสภาพแวดล้อม โดยมีอุณหภูมิ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ จาก

หลอดฟลูออเรสเซนต์ ตั้งเวลาการให้แสงเท่ากับ 16 ชั่วโมงต่อวัน ด้วยเครื่องตั้งเวลาเปิด-ปิดอัตโนมัติ (Timer) วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized block Design : CRD) ทำการทดลอง 15 ซ้ำ แต่ละซ้ำมี 1 ชั้น (1 ชั้นต่อขวด) เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลา 2 เดือน ทำการบันทึกผลการเกิดแคลลัส สีของแคลลัส ในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน

2.4 การศึกษาการเจริญเติบโตของแคลลัสในอาหารสูตรที่เหมาะสม

ทำการคัดเลือกอาหารสูตรที่เหมาะสมสำหรับการชักนำแคลลัส โดยดูจากขนาดของแคลลัส ตั้งแต่เกิดแคลลัสปานกลางและเริ่มเกาะตัวกัน (คะแนน ++) และเกิดแคลลัสมากและเกาะตัวอย่างหนาแน่น (คะแนน +++) เลือกแคลลัสที่เกิดสีเขียวหรือสีเขียวปนเหลือง เพื่อนำมา subculture ลงบนอาหารสูตรเดิมอีกครั้ง เลี้ยงในห้องปลอดเชื้อที่ควบคุมสภาพแวดล้อม โดยมีอุณหภูมิ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ จากหลอดฟลูออเรสเซนต์ ตั้งเวลาการให้แสงเท่ากับ 16 ชั่วโมงต่อวัน วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized block Design : CRD) ทำการทดลอง 15 ซ้ำ แต่ละซ้ำมี 4 ชั้น (4 ชั้นต่อขวด) เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลา 45 วัน บันทึกน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งต่อขวด

2.5 การศึกษาสาร rosmarinic acid ของปอบิดด้วย High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

2.5.1 การเตรียมตัวอย่างพืชสำหรับการตรวจวิเคราะห์

ผักปอบิด - นำผักปอบิดจากจังหวัดตาก (แหล่งธรรมชาติ) จำนวน 3 ตัวอย่าง และผักปอบิด

จากการปลูกในสถาบันวิจัยสมุนไพร จังหวัดนนทบุรี จำนวน 3 ตัวอย่าง นำมาล้างทำความสะอาดผิંગให้ สะเด็ดน้ำ แล้วนำมาหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ตากให้แห้งจาก นั้นนำมาอบในตู้อบร้อนที่อุณหภูมิ 50 °ซ เป็นเวลา วันละ 8 ชั่วโมงติดต่อกัน 2 วัน แล้วนำไปบดให้ ละเอียดโดยใช้เครื่องปั่น จากนั้นนำมาบดด้วยโกร่งอีกครั้งจนละเอียด นำไปบรรจุในถุงเก็บตัวอย่างปิดปาก ถุงให้สนิท

แคลลัสปอบิด - นำแคลลัสมาผึ่งลม ประมาณ 2-3 ชั่วโมง จากนั้นนำมาอบในตู้อบร้อนที่ อุณหภูมิ 50 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปบด ให้ละเอียดโดยใช้โกร่ง เมื่อละเอียดแล้วนำไปบรรจุใน ถุงเก็บตัวอย่างปิดปากถุงให้สนิท

2.5.2 การเตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ ด้วย HPLC

นำสมุนไพรปอบิด 500 มิลลิกรัม ต้มกับ 1% กรดไฮโดรคลอริกในน้ำ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที นำมากรอง จากนั้นนำมา partition กับไดเอทิลอีเทอร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง นำชั้นไดเอทิลอีเทอร์ มาระเหยแห้ง จากนั้นสกัด ด้วยเมทานอล 2 มิลลิลิตร กรองด้วย nylon syringe filter 0.45 ไมครอน สำหรับการนำไปฉีด HPLC

2.5.3 การเตรียมสารมาตรฐาน

ชั่งสารมาตรฐาน rosmarinic acid ปริมาณ 5 มิลลิกรัม ปรับปริมาตรด้วยเมทานอล ใน volumetric flask ขนาด 5 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ pipette ใน volumetric flask ขนาด 2 มิลลิลิตร ใน ปริมาตร 2000, 1000, 500, 250, 125 ไมโครลิตร ปรับ ปริมาตรให้ได้สารละลายมาตรฐาน rosmarinic acid ความเข้มข้น 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 มิลลิกรัม/

มิลลิลิตร ตามลำดับ

ระบบโครมาโทกราฟี

คอลัมน์	Shimadzu Shim-pack GIST C18 4.6 × 150 mm 5 micron with Guard Column 4.0 × 10 mm
---------	--

วัฏภาคเคลื่อนที่	A: 0.1% Trifluoroacetic acid ในน้ำ
------------------	---------------------------------------

B: Acetonitrile; Isocratic

ปริมาตรวิเคราะห์ 10 ไมโครลิตร

2.6 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม SPSS version 16.0 ทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.01

ผลการศึกษา

1. การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนของต้นปอบิด

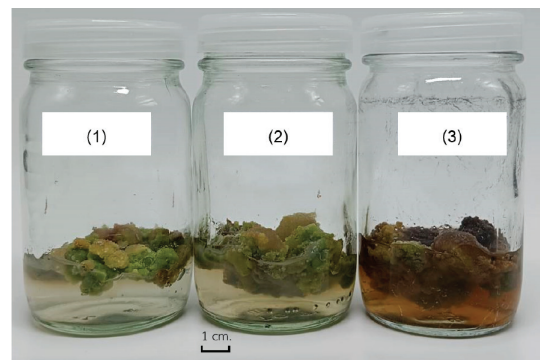
จากการฟอกชิ้นส่วนข้อปอบิดที่ฆ่าเชื้อด้วย โซเดียมไฮโปคลอไรต์ 5 ความเข้มข้น นำมาเลี้ยงบน อาหารสูตร MS พบว่าการฟอกโดยใช้ไฮเตอร์ครั้งแรกร้อยละ 10 เป็นเวลา 20 นาที และฟอกครั้งที่ 2 ใช้ไฮเตอร์ร้อยละ 10 เป็นเวลา 10 นาที มีการปลด เชื้อสูงสุดในช่วงระยะเวลา 14 วัน มีค่าเท่ากับ ร้อยละ 80.5 รองลงมาคือ การฟอกโดยใช้ไฮเตอร์ครั้งแรก ร้อยละ 10 เป็นเวลา 20 นาที และฟอกครั้งที่ 2 ใช้ ไฮเตอร์ร้อยละ 10 เป็นเวลา 5 นาที ความเข้มข้นที่น้อยกว่านี้ทำให้การปลดเชื้อลดลง (Table 1) เมื่อนำมา เลี้ยงต่อเป็นระยะเวลา 20 วัน พบว่าปอบิดมีการเจริญ เติบโตในส่วนของยอดและใบที่ดี

Table 1 Percentage of survival in nodal explants after sterilization using various concentrations of sodium hypochlorite at different times duration.

Surface sterilization				Survival (%) in nodal explants on 2 weeks
1 st		2 nd		
NaOCl (%)	times (min)	NaOCl (%)	times (min)	
0.9	10	0.9	10	29.3
0.6	15	0.6	10	25
0.6	20	0.6	5	65.7
0.6	20	0.6	10	80.5
0.6	20	0.6	7	58.1

2. การศึกษาอาหารสูตรที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส

จากการศึกษาอาหารสูตรเพาะเลี้ยงแคลลัสจำนวน 26 สูตร ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ต่างกัน พบว่าเมื่อเลี้ยงแคลลัสเป็นระยะเวลา 30 วัน อาหารสูตร TDZ 0.4+NAA 0.3, TDZ 0.8+NAA 0.5, TDZ 1+NAA 0.7 และ TDZ 1.5+NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสมีการเจริญเติบโตที่ดีเกิดแคลลัสปานกลางและเริ่มเกาะตัวกัน มีสีเขียวและสีเขียวปนเหลือง เมื่อเลี้ยงต่อไปเป็นระยะเวลา 45 วัน มีการเกิดแคลลัสมากขึ้นและเกาะตัวอย่างหนาแน่น มีสีเขียวและสีเขียวปนเหลือง เมื่อแคลลัสอายุ 60 วัน จะมีสีน้ำตาลเข้มและหยุดการเจริญเติบโต (Figure 2) จึงเลือกใช้แคลลัสที่อายุ 45 วัน ในการศึกษาวิจัยหาปริมาณสาร RA ต่อไป ในขณะที่อาหารสูตร MS ไม่เกิดแคลลัส ส่วนในอาหารกลุ่มที่เติม IBA ที่ความเข้มข้น 1-5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 30 และ 45 วัน เกิดแคลลัสขนาดเล็กมีสีน้ำตาลเป็นส่วนใหญ่ เมื่อเลี้ยงต่อไปเป็นระยะเวลา 60 วัน แคลลัสมีสีน้ำตาลปนดำและหยุดการเจริญเติบโต ส่วนในอาหาร 1.25 MS ร่วมกับ IBA 1-5 มิลลิกรัมต่อลิตร และในกลุ่ม

**Figure 2** *H. isora* callus induction at different time on MS+TDZ 0.4 + NAA 0.3 ml/g, (1) 30 days, (2) 45 days, and (3) 60 days.

ที่เติม KN 1-5 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิดแคลลัสขนาดเล็กสีเขียวปนน้ำตาล ที่อายุ 30 วัน และที่อายุ 45 วัน เกิดแคลลัสขนาดเล็กสีน้ำตาล และเมื่อเลี้ยงต่อไปเป็นระยะเวลา 60 วัน แคลลัสมีสีน้ำตาลปนดำและหยุดการเจริญเติบโต ส่วนในกลุ่มที่เติม TDZ 0.2-1.5 เกิดแคลลัสขนาดเล็กมีสีเขียวปนเหลือง และเขียวปนน้ำตาลที่อายุ 30 วัน ส่วนอายุ 45 วัน เกิดแคลลัสปานกลางและเริ่มเกาะตัวกัน แคลลัสมีสีเขียวปนน้ำตาล เมื่อเลี้ยงต่อไปเป็นระยะเวลา 60 วัน แคลลัสมีสีน้ำตาลและหยุดการเจริญเติบโต (Table 2)

Table 2 Effects of plant growth regulators on *H. isora* callus induction culture after treatment with six various kinds of mediums for 30, 45, and 60 days

Medium	Morphology of callus					
	30 days		45 days		60 days	
	Callus Type	Color	Callus Type	Color	Callus Type	Color
MS	-	-	-	-	-	-
IBA 1	+	yellow	+	yellow	+	brown
IBA 2	+	green	+	brown	+	darkish brown
IBA 3	+	green	+	brown	+	darkish brown
IBA 4	+	green	+	brown	+	darkish brown
IBA 5	+	green	+	brown	+	darkish brown
1.25 MS+IBA 1	+	Greenish brown	+	brown	+	darkish brown
1.25 MS+IBA 2	+	Greenish brown	+	brown	+	darkish brown
1.25 MS+IBA 3	+	green	+	brown	+	darkish brown
1.25 MS+IBA 4	+	Greenish brown	+	brown	+	darkish brown
1.25 MS+IBA 5	+	Greenish brown	+	brown	+	darkish brown
KN 1	+	green	+	brown	+	darkish brown
KN 2	+	green	+	brown	+	darkish brown
KN 3	+	brown	+	brown	+	darkish brown
KN 4	+	Greenish brown	+	brown	+	darkish brown
KN 5	+	brownish green	+	brown	+	darkish brown
TDZ 0.2	+	Greenish brown	++	Greenish brown	++	brown
TDZ 0.4	+	brownish green	++	Greenish brown	++	brown
TDZ 0.8	+	green	++	Greenish brown	++	brown
TDZ 1.0	+	green	++	Greenish brown	++	brown
TDZ 1.5	+	Greenish brown	++	Greenish brown	++	brown
TDZ 0.2+NAA 0.1	+	green	++	green	++	brown
TDZ 0.4+NAA 0.3	++	green	+++	green	+++	brown
TDZ 0.8+NAA 0.5	++	green	+++	green	+++	brown
TDZ 1+NAA 0.7	++	Greenish yellow	+++	Greenish yellow	+++	brown
TDZ 1.5+NAA 1	++	Greenish yellow	+++	Greenish yellow	+++	brown

Note : - None callus

+ Less callus

++ Moderate and initially stick callus

+++ A large number and densely stick callus

3. การศึกษาการเจริญเติบโตและปริมาณสาร rosmarinic acid (RA) ของแคลลัสและผักปอบิด

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของแคลลัสในอาหารสูตรต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 45 วัน พบว่าขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของแคลลัส มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยพบว่าอาหารสูตร TDZ 0.4 + NAA 0.3 จะมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางมากที่สุดมีค่าเท่ากับ 2.9 ± 0.58 เซนติเมตร รองลงมาคือ TDZ 0.8 + NAA 0.5 มีค่าเท่ากับ 2.6 ± 0.56

เซนติเมตร เมื่อนำมาซึ่งหาน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งพบว่าทุกสูตรอาหารมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยอาหารสูตร TDZ 0.4 + NAA 0.3 มีน้ำหนักสดมากที่สุดมีค่าเท่ากับ 7.56 ± 0.88 กรัม รองลงมาคือ TDZ 1.0 + NAA 0.7 มีค่าเท่ากับ 7.38 ± 1.85 กรัม ในขณะที่น้ำหนักแห้งทุกสูตรอาหารมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติโดยอาหารสูตร TDZ 1.5 + NAA 1.0 มีน้ำหนักแห้งมากที่สุดมีค่าเท่ากับ 0.47 ± 0.21 กรัม รองลงมาคืออาหารสูตร TDZ 0.2 + NAA 0.1 มีน้ำหนักแห้งเท่ากับ 0.43 ± 0.11 กรัม (Figure 3, Table 3)

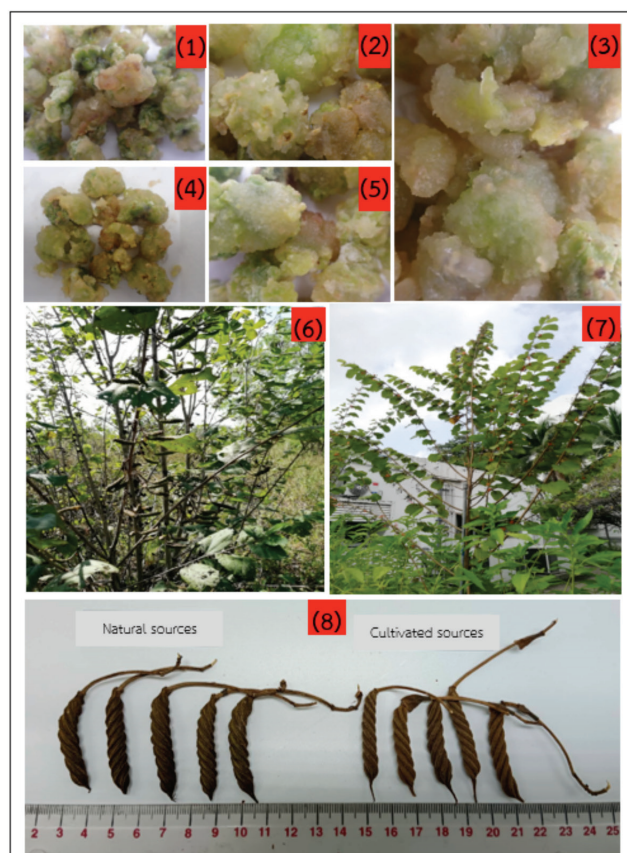


Figure 3 The different sources of *H. isora* from callus culture, cultivation, and natural sources: *H. isora* callus in different culture medium concentration for 45 days: (1) MS + TDZ 0.2 + NAA 0.1, (2) MS + TDZ 0.4 + NAA 0.3, (3) MS + TDZ 0.8 + NAA 0.5, (4) MS + TDZ 1 + NAA 0.7, and (5) MS + TDZ 1.5 + NAA. *H. isora* tree and fruit; (6) natural sources, (7) cultivated sources, and (8) fruit from natural sources (left) and fruit from cultivated sources (right)

Table 3 Rosmarinic acid content of *H. isora* from natural sources, cultivated sources, and callus growth on MS medium supplemented with different concentration of TDZ and NAA for 45 days.

Medium	Callus diameter (cm.)	Fresh weight (g)	Dry weight (g)	Rosmarinic acid (% dry weight)
TDZ 0.2 + NAA 0.1	1.80 ± 0.581 /	6.08 ± 0.69	0.43 ± 0.11	0.3568 ± 0.0006 ^b
TDZ 0.4 + NAA 0.3	2.90 ± 0.58	7.56 ± 0.88	0.36 ± 0.01	0.3939 ± 0.0007 ^a
TDZ 0.8 + NAA 0.5	2.60 ± 0.56	6.57 ± 2.17	0.41 ± 0.18	0.1851 ± 0.0140 ^c
TDZ 1.0 + NAA 0.7	2.10 ± 0.38	7.38 ± 1.85	0.37 ± 0.04	0.3572 ± 0.0007 ^b
TDZ 1.5 + NAA 1.0	1.90 ± 0.57	4.46 ± 1.25	0.47 ± 0.21	0.3532 ± 0.0005 ^b
Natural sources	-	-	-	0.0877 ± 0.0017 ^d
Cultivated sources	-	-	-	0.0127 ± 0.0004 ^e
F-test	ns	ns	ns	**

1/Values are mean ± SD Means with common superscript within each column are significantly different at $p \leq 0.01$ according to Duncan's multiple range test (DMRT)

เมื่อนำตัวอย่างที่ได้มาหาปริมาณ RA พบว่าจากการทำกราฟสารมาตรฐาน (standard curve) เทียบกับความเข้มข้นของ RA ได้สมการเส้นตรง $y = 31570846.95x + 235169$ เมื่อ y = พื้นที่ใต้กราฟ x = ค่าความเข้มข้น โดยมีค่า $R^2 = 0.9988$ จากนั้นวิเคราะห์หาปริมาณ RA จากการทดลองพบโครมาโตแกรมของกราฟมาตรฐานขึ้นที่เวลา (retention time) ที่ 7.0 ส่วนโครมาโตแกรมของตัวอย่างขึ้นที่เวลา 7.0 เช่นเดียวกัน เมื่อเปรียบเทียบ UV spectrum ของสารมาตรฐาน RA กับ peak ที่พบในตัวอย่าง พบว่ามี spectrum ที่คล้ายกัน (Figure 4) เมื่อนำตัวอย่างจากแคลลัสในอาหารสูตรต่าง ๆ ฝักปอบิตที่ปลูกในจังหวัดนนทบุรี และฝักปอบิตที่เก็บมาจากธรรมชาติจากจังหวัดตาก มาวิเคราะห์หาปริมาณ RA พบว่าอาหารสูตร TDZ 0.4 + NAA 0.3 มีปริมาณสาร RA สูงที่สุด มีค่าเท่ากับร้อยละ 0.3939 โดยน้ำหนักแห้ง

แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99% กับอาหารสูตร TDZ 1.0 + NAA 0.7 TDZ 0.2 + NAA 0.1 TDZ 1.5 + NAA 1.0 และ TDZ 0.8 + NAA 0.5 ซึ่งมีปริมาณสาร RA เท่ากับร้อยละ 0.3572, 0.3568, 0.3532 และ 0.1851 โดยน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบอาหารสูตรเพาะเลี้ยงแคลลัสทั้ง 5 สูตร กับฝักปอบิต 2 แหล่ง พบว่าปริมาณสาร RA มีค่าแตกต่างกันทางสถิติ โดยฝักปอบิตจากแหล่งธรรมชาติที่ได้จากจังหวัดตากและฝักปอบิตจากแหล่งปลูกในจังหวัดนนทบุรี มีปริมาณสาร RA เท่ากับร้อยละ 0.0877 และ 0.0127 โดยน้ำหนักแห้งตามลำดับ เมื่อคิดสัดส่วนของปริมาณสาร RA ที่ได้จากแคลลัสจะมีมากกว่าแหล่งที่เก็บจากธรรมชาติประมาณ 4.5 เท่า และจากแหล่งเพาะปลูกประมาณ 31 เท่า

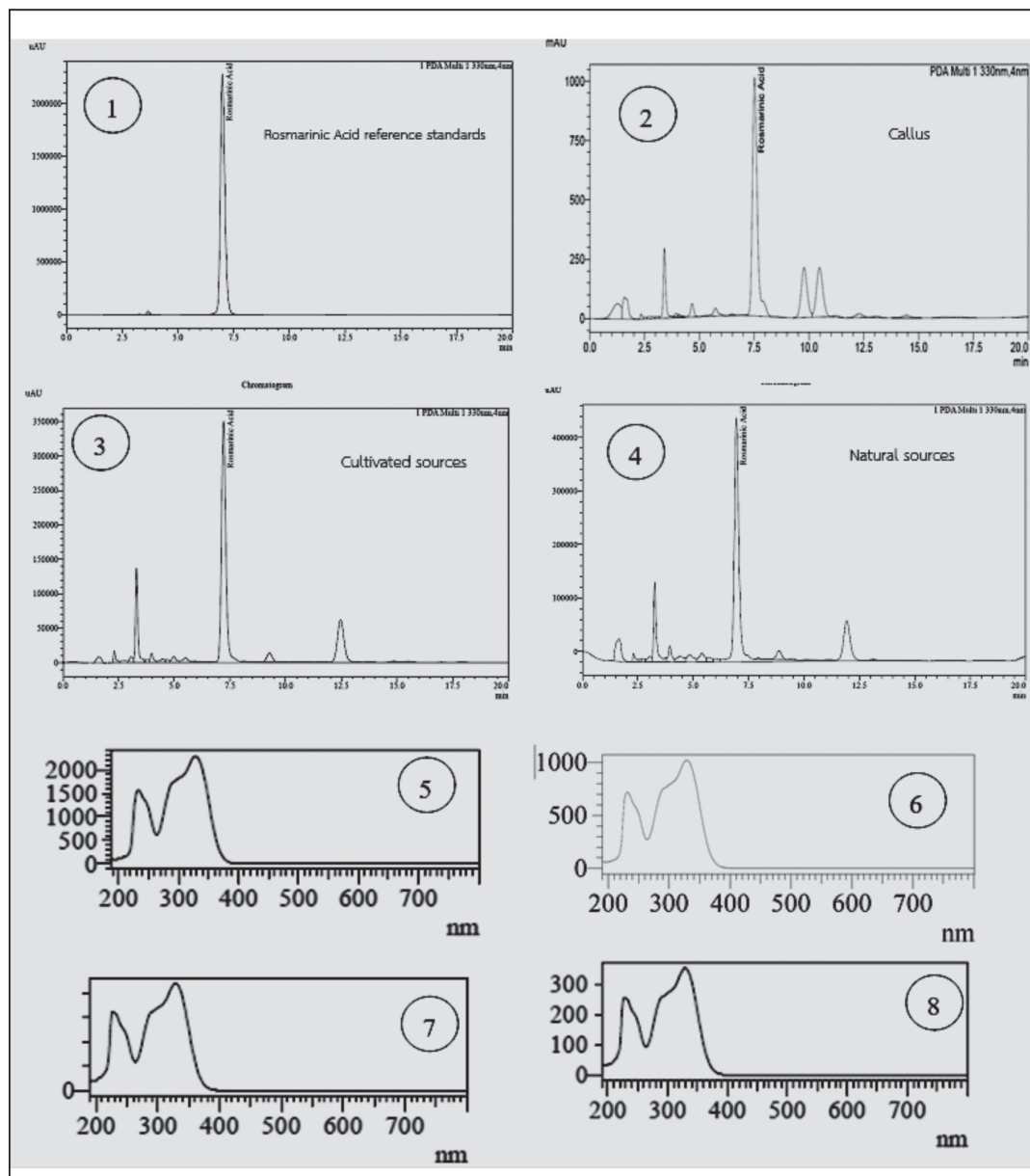


Figure 4 HPLC chromatogram of Rosmarinic acid (RA) detection; (1) RA reference standard, (2) Callus, (3) *H. isora* fruit from cultivated sources, (4) *H. isora* fruit from natural sources, and UV spectrum of RA detection; (5) RA reference standard, (6) Callus, (7) *H. isora* fruit from cultivated sources, (8) *H. isora* fruit from natural sources

อภิปรายผล

จากการฟอกชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อเจริญส่วนของข้อบอบิดโดยใช้ไฮเตอร์ซึ่งเป็นชื่อทางการค้า โดยฟอกครั้งแรกใช้ความเข้มข้นของไฮเตอร์ร้อยละ 10 เป็นเวลา 20 นาที และฟอกครั้งที่ 2 ใช้ไฮเตอร์ร้อยละ 10 เป็นเวลา 10 นาที มีการปลดเชื้อสูงสุดร้อยละ 80.5 ซึ่งเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการฟอก เนื่องจากไฮเตอร์-มีโซเดียมไฮโปโครไรท์เป็นส่วนประกอบร้อยละ 6 มีราคาถูกสามารถหาซื้อได้โดยทั่วไป ไม่เป็นอันตรายต่อเนื้อเยื่อพืชรวมถึงความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการฟอกระยะเวลา และชนิดของเนื้อเยื่อพืช มีส่วนสำคัญที่ทำให้การฟอกฆ่าเชื้อประสบความสำเร็จได้

การศึกษาอาหารสูตรเพาะเลี้ยงแคลลัสจำนวน 26 สูตร เป็นระยะเวลา 30, 45 และ 60 วัน สูตรอาหารในกลุ่มของ TDZ 0.2-0.8 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.1-0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเกิดแคลลัสได้ดี โดยเฉพาะอาหารสูตร TDZ 0.4 ร่วมกับ NAA 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงเป็นระยะเวลา 45 วัน แคลลัสมีการเจริญเติบโตที่ดี มีสีเขียว มีแคลลัสมากและเกาะตัวกันอย่างหนาแน่น มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของแคลลัส น้ำหนักสดมากที่สุด และมีน้ำหนักแห้งค่อนข้างดี เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงแคลลัส สามารถย้ายลงในอาหารเพื่อเพิ่มปริมาณได้ ในขณะที่การใช้ TDZ เพียงอย่างเดียวก็สามารถเกิดแคลลัสได้แต่แคลลัสจะมีขนาดเล็กกว่าเมื่อเทียบกับอาหารสูตร TDZ ร่วมกับ NAA สอดคล้องกับการศึกษาส่วนตาข้างของมะรุมที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ TDZ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีอัตราการเกิดแคลลัสร้อยละ 100 มีน้ำหนักแคลลัสสดเฉลี่ยสูงสุด 5.35 กรัม แคลลัสมีสีขาวและเกาะกันอย่างหลวม ๆ^[18] ใน

ขณะที่การศึกษาวิจัยการใช้ TDZ เพียงอย่างเดียวที่ความเข้มข้น 0.1-0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้เกิดการพัฒนาของแคลลัสได้ดี เช่น ต้นชะเอมเทศ^[19] ส่วนอาหารสูตรอื่น ๆ ได้แก่ MS 1.25 MS IBA และ KN ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ แคลลัสจะเจริญเติบโตได้ไม่ดี แสดงให้เห็นว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์พืชเป็นอย่างมาก ซึ่ง TDZ เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ทำงานคล้ายกับกลุ่มไซโตไคนิน ในขณะที่ NAA จะอยู่ในกลุ่มของออกซิน การเกิดแคลลัสโดยทั่วไปแล้วขึ้นอยู่กับสมดุลของสารควบคุมการเจริญเติบโตของไซโตไคนินและออกซิน โดยถ้าออกซินสูงกว่าไซโตไคนินเซลล์พืชจะพัฒนาไปเป็นราก ถ้าออกซินต่ำกว่าไซโตไคนินจะพัฒนาไปเป็นยอดหรือลำต้น และถ้าหากออกซินเท่ากับไซโตไคนินจะพัฒนาเป็นแคลลัส ซึ่งอาหารสูตร TDZ 0.4 ร่วมกับ NAA 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่นำมาเลี้ยงบอบิดมีสัดส่วนใกล้เคียงกัน อาหารสูตรดังกล่าวจึงสามารถชักนำเป็นแคลลัสได้ค่อนข้างดี ทั้งนี้การเกิดแคลลัสขึ้นกับชนิดพืช ส่วนต่าง ๆ ที่นำมาเพาะเลี้ยง และระยะการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน

จากการศึกษาหาปริมาณสาร RA อาหารสูตร TDZ 0.4 + NAA 0.3 มีปริมาณสาร RA สูงที่สุด มีค่าเท่ากับร้อยละ 0.3939 โดยน้ำหนักแห้ง เป็นอาหารสูตรที่เหมาะสมสำหรับการชักนำให้เกิดการสร้าง RA ได้ดี สูงกว่าฝักบอบิดที่มีตามธรรมชาติประมาณ 4.5 เท่า และสูงกว่าฝักบอบิดที่ได้จากการปลูกประมาณ 31 เท่า ถึงแม้ว่ายอดบอบิดที่นำมาฟอกให้เกิดแคลลัสจะได้มาจากแหล่งเดียวกันกับที่ปลูกก็ตาม ซึ่งจากการปลูกบอบิดในแปลงปลูกนั้นจะเห็นได้ว่าบอบิดสามารถออกดอกได้ตลอดทั้งปี โดย

ใน 1 รอบปี จะมีการออกดอกและติดฝักได้ไม่น้อยกว่า 3 ชุด ซึ่งตามปกติแล้วจากการสำรวจในแหล่งธรรมชาติพบว่าปอบิดให้ผลผลิตเพียงปีละหนึ่งครั้งเท่านั้น นอกจากนั้นอายุของต้นอาจส่งผลต่อปริมาณสาร RA ที่แตกต่างกัน โดยต้นที่ปลูกมีอายุ 1 ปี 3 เดือน ในขณะที่ต้นจากธรรมชาติน่าจะมียู่มากกว่า 2 ปีขึ้นไป เนื่องจากมีลำต้นและทรงพุ่มขนาดใหญ่ จึงทำให้ปอบิดจากแหล่งปลูกและแหล่งธรรมชาติให้สาร RA ที่มีความแตกต่างกันมากถึง 6 เท่า แสดงให้เห็นว่าวิธีการปลูกปอบิดมีผลต่อการสร้างสารสำคัญเช่นเดียวกัน ซึ่งการปลูกพืชตามธรรมชาติโดยส่วนใหญ่จะพบปัญหาทางด้านคุณภาพ ผลผลิต และการผลิตสารสำคัญที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา โดยมีปัจจัยต่าง ๆ ประกอบด้วย 2 ปัจจัย คือ ปัจจัยภายใน ได้แก่ พันธุกรรมพืช หรือสายพันธุ์ ซึ่งจากการเฝ้าการศึกษาพันธุ์ของกัญชาที่มีผลต่อปริมาณสารแคนนาบินอยด์ในใบ พบว่าพันธุ์กัญชาต่างสายพันธุ์จะมีการสร้างสาร Tetrahydrocannabinol (THC), Cannabinol (CBN) และ Cannabidiol (CBD) ที่แตกต่างกัน^[20] แสดงให้เห็นว่าแม้จะเป็นพืชชนิดเดียวกันแต่มีความแตกต่างของสายพันธุ์ก็มีผลต่อการสร้างสารสำคัญที่แตกต่างกัน ส่วนปัจจัยภายนอก ได้แก่ ธาตุอาหารในดิน, อุณหภูมิ, ความสูงของพื้นที่, ความชื้น, การบำรุงรักษา หรือวิธีการจัดการที่แตกต่างกันย่อมให้ผลที่แตกต่างกัน ซึ่งจากการศึกษาปริมาณสาร Diosgenin ของปอบิดที่แตกต่างกันจำนวน 7 แหล่ง พบว่าแต่ละแหล่งมีปริมาณสาร Diosgenin ที่แตกต่างกัน^[21] นอกจากนั้นวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ต่างกันให้สารสำคัญที่ต่างกัน ซึ่งจากการศึกษาสาร RA ในพืชชนิด *Eryngium planum* โดยวิธีการเพาะเลี้ยงยอด แคลลัส เซลล์แขวนลอย และการเพาะเลี้ยงราก

พบว่าให้สาร RA ที่มีค่าแตกต่างกัน มีค่าเท่ากับ 2.59, 16.24, 3.91 และ 6.3 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ^[22] สาร RA พบในพืชสมุนไพรหลายชนิด แต่ละชนิดให้สาร RA ที่แตกต่างกัน และจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสมุนไพรที่มีการผลิตเชิงพาณิชย์ในการผลิตสาร RA จากพืชชนิด *Coleus blumei* โดยบริษัท Nattermann ประเทศเยอรมนี เป็นผู้ผลิตใช้ประโยชน์จากสาร RA จากพืชในการต้านการอักเสบ^[23] ในขณะปัจจุบันโรคโควิด-19 เป็นโรคระบาดที่เกิดขึ้นทั่วโลก มีสาเหตุจากการติดเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 จึงมีผู้ศึกษาการใช้สาร RA ซึ่งเป็นสารพฤษเคมีชนิดหนึ่งในสมุนไพรแมงลักคาและปอบิด พบว่ามีฤทธิ์ต้านไวรัสที่ ร้อยละ 94.49 และยับยั้งเอนไซม์ ACE2 สูงสุดร้อยละ 70.25 ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่ง RA ลดการแสดงออกของยีน ACE2 และ TMPRSS2 แต่ไม่ลดการแสดงออกของ PIKfyve หรือ cathepsin L ใน Calu-3 cells แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากแมงลักคาปอบิด และ RA มีฤทธิ์ต้าน SARS-CoV-2 ซึ่ง R A ในสมุนไพรอาจลดการแพร่กระจายไวรัสในระยะแรกของการติดเชื้อได้^[24] การศึกษาจึงต้องการพัฒนาการสร้างสาร RA จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสมุนไพร โดยศึกษาส่วนของแคลลัสเปรียบเทียบกับผลผลิตที่ได้จากธรรมชาติและการปลูกเท่านั้น ยังมีวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเซลล์พืชโดยวิธีการต่าง ๆ ที่สามารถเพิ่มสารทุติยภูมิให้ได้มากขึ้น เช่น การใช้กระตุ้น Methyl jasmonate Salicylic acid Chitosan สารสกัดจากยีสต์ เชื้อรา และแบคทีเรีย จากการศึกษการใช้ *Agrobacterium* 4 สายพันธุ์ในการชักนำให้เกิดรากลอย (hairy root) ของต้นปอบิดทำให้มีปริมาณสาร diosgenin และ proline สูงกว่าแคลลัสและชิ้นส่วนที่ไม่ได้ทำการเหนี่ยวนำ^[21] จึงเป็นวิธีการหนึ่งที่น่า

สนใจในการพัฒนาเพิ่มปริมาณสาร RA ให้เพิ่มขึ้นได้ การใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์สกร นอกจากจะเพิ่มสาร RA ได้แล้ว ยังลดขั้นตอนการปลูกพืชจากธรรมชาติ ไม่จำเป็นต้องใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืช ลดการปนเปื้อนโลหะหนักจากในดิน และลดการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ ที่ปะปนมากับวัตถุดิบจากภายนอก จึงเป็นวิธีการหนึ่งที่ได้วัตถุดิบที่มีคุณภาพนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ เพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจต่อไปในอนาคต

ข้อสรุป

สารละลายที่เหมาะสมในการฟอกตาข้างปอบิด ให้ปลอดเชื้อคือใช้โซเดียมไฮโปคลอไรต์ (ไฮเตอร์®) ร้อยละ 10 เป็นเวลา 20 นาที และร้อยละ 10 เป็นเวลา 10 นาที อาหารสูตร MS ที่เติม Thidiazuron (TDZ) 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ naphthaleneacetic acid (NAA) 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสำหรับการชักนำแคลลัสมากที่สุด สามารถผลิตสาร Rosmarinic acid สูงกว่าอาหารสูตรอื่น ๆ และสูงกว่าผักปอบิดที่มีตามธรรมชาติประมาณ 4.5 เท่า และสูงกว่าผักปอบิดที่ได้จากการปลูกประมาณ 31 เท่า จึงมีแนวโน้มในการพัฒนาแคลลัสผลิตเป็นวัตถุดิบในการผลิตสาร Rosmarinic acid เพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณผู้ร่วมวิจัยทุกท่านในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ให้เงินงบประมาณสนับสนุนในงานวิจัยนี้ ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการพิษวิทยาพืชที่ช่วยพิสูจน์ชื่อทางวิทยาศาสตร์ของพืชนำมาเก็บไว้เป็นแหล่งอ้างอิงพรรณไม้

References

1. The plant list. Malvaceae [Internet]. 2013. [cited 2023 Aug 16]; Available from: <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-2843218>
2. Seepen S, Phengklai C. Thai plant in Suanluang RAMA IX (Vol.2). Bangkok: Amarin Printing and Publishing Public Company Limited; 1999. 152 p. (in Thai)
3. Subcharoen P, Reuanglangsi N, Deewiset K. Thai herbs in central national park. 2nd ed. Thai traditional medicine development foundation; 2006. 164 p. (in Thai)
4. Varghese E, Pappachen KL, Narayanan SS. Isolation and evaluation of antimicrobial properties of isolated phytoconstituents of fruits of *Helicteres isora* Linn. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. 2012;3(3):959-64.
5. Tambekar DH, Khante BS, Panzade BK, Dahikar SB, Banginwar YS. Evaluation of phytochemical and antibacterial potential of *Helicteres isora* L. fruits against enteric bacterial pathogens. African Journal of Traditional Complementary and Alternative Medicines. 2008;5(3):290-3.
6. Venkatesh S, Sailaxmi K, Reddy BM, Mullangi R. Antimicrobial activity of *Helicteres isora* root. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences. 2007;69(5):687-9.
7. Dayal R, Singh A, Ojha RP, Mishra KP. Possible therapeutic potential of *Helicteres isora* (L.) and its mechanism of action in diseases. Journal of Medicinal Plants Studies. 2015;3(2):95-100.
8. Kamiya K, Saiki Y, Hama T, Fujimoto Y, Endang H, Umar M, Satake T. Flavonoid glucuronides from *Helicteres isora*. Phytochemistry. 2001;57:297-301.
9. Vennila S, Bupesh G, Saravanamurali K, Kumar VS, Raja RS, Saran N, Magesh S. *In silico* docking study of compounds elucidated from *Helicteres isora* fruits with ampkase-insulin receptor. Bioinformation. 2014;10(5):263-6.
10. Satake T, Kamiya K, Saiki Y, Hama T, Fujimoto Y, Kitanaoka S, Kimura Y, Uzawa J, Endang H, Umar M. Studies on the constituents of fruits of *Helicteres isora* L. Chemical and Pharmaceutical Bulletin. 1999;47(10):1444-7.
11. Chandirasegaran G, Elanchezhian C, Ghosh K, Sethupathy S. Determination of antidiabetic compounds from *Helicteres isora* fruits by oral glucose tolerance test. Journal of Applied Pharmaceutical Science. 2016;6(2):172-4.
12. Shekarchi M, Hajimehdipoor H, Saeidnia S, Gohari A.R,

- Hamedani M.P. Comparative study of rosmarinic acid content in some plants of Labiatae family. *Pharmacogn Mag.* 2012;8(29):37-41.
13. Swarup V, Ghosh J, Ghosh S, Saxena A, Basu A. Antiviral and anti-inflammatory effects of rosmarinic acid in an experimental murine model of Japanese encephalitis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51:3367-70.
14. Hooker CW, Lott WB, Harrich D. Inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase target distinct phases of early reverse transcription. *J Virol.* 2001;75:3095-104.
15. Huang SS, Zheng RL. Rosmarinic acid inhibits angiogenesis and its mechanism of action *in vitro*. *Cancer Lett.* 2006;239:271-80.
16. Lu Y, Foo LY. Polyphenolics of Salvia- A review. *Phytochemistry.* 2002;75:197-202.
17. Murashige T, Skoog T. A revised medium for rapid growth bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plantarum.* 1962;15:473-93.
18. Sanguansemri M, Phimsen N, Wongsawad P, Bud-dharaksa P. Effect of NAA and TDZ combinations on callus induction of drumstick (*Moringa oleifera* Lam.). Naresuan Phayao J. 2014;7:242-51. (in Thai).
19. Wongwicha W, Tanaka H, Shoyama Y, Tuvshintogtokh I, Putalun W. Production of glycyrrhizin in licorice callus cultures. *Z Naturforsch C.* 2008;63:413-7.
20. Marsud S, Thongchin T, somkid K, Poolsab P, Papar-vadee S, Kotchaporn C, Phrugmanon, T, Pranakhon R, Pinta W, Banyati P, Chaisomboonpan S. The cannabi-noid contents in different growth stages of thai *cannabis sativa* L. leaves. *Bull Dept Med Sci.* 2021;63(3):524-40. (in Thai)
21. Kumar V, Desai D, Shriram V. Hairy root induction in *Helicteres isora* L. and production of diosgenin in hairy roots. *Nat. Prod. Bioprospect.* 2014;4:107-12.
22. Kikowska M, Budzianowski J, Krawczyk A, Thiem B. Accumulation of rosmarinic, chlorogenic and caffeic acids in vitro cultures of *Eryngium planum* L. *Acta Physiol Plant.* 2012;34:2425-33.
23. Ekiert H, Kwiecien I, Szopa A. Rosmarinic acid pro-duction in plant *in vitro* cultures. *Pol J Cosmetol.* 2013;16(1):49-58.
24. Radapong S, Sahad T, Harnkit N, Suppajariyawat P, Akkpaiboon O.P, Meechalad W, Sincharoenpokai P, Niumsukul S, Buaboa S, Ontong S, Kenneth J.R, Chai-somboonpan S. Anti-SARS-CoV-2 activity screening of the selected Thai medicinal plants and potential host-target molecules. *Bull Dept Med Sci.* 2022;64(2):93-105. (in Thai)