

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของการวิจัย

ปัจจุบันสรีรวิทยาศาสตร์ (เคมี) ได้เข้ามามีบทบาทในชีวิตประจำวันมากขึ้นและก่อให้เกิดมลภาวะอันเนื่องจากการใช้สีย้อมดังกล่าว และเป็นผลกระทบต่อสุขภาพและสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้มลภาวะเป็นพิษอันเนื่องมาจากสาเหตุอื่นๆที่เพิ่มพูนทุกๆนาที่ในสิ่งแวดล้อมรอบๆตัวเราด้วยเหตุนี้จึงมีผู้สนใจและตระหนักถึงคุณค่าของสีย้อมธรรมชาติกันมากขึ้นเพราะสีย้อมธรรมชาติมีจุดเด่นหลายๆจุดที่น่าติดตาม อาทิ สีย้อมธรรมชาติเป็นสีที่มีลักษณะพิเศษมีเส้นหรืออยู่ในตัวมีโทนสีที่นุ่มนวลแล้วสลายตา การย้อมสีย้อมธรรมชาติมีแบบฉบับที่มีเอกลักษณ์และเป็นภูมิปัญญาท้องถิ่นที่สั่งสมกันมาหลายชั่วอายุคน เคล็ดลับและวิธีการตลอดจนวัตถุดิบในแหล่งที่ใช้ในการผลิตที่สืบทอดกันมาตั้งแต่โบราณกำลังจะเลือนหายไป หากไม่ได้รับการเก็บรวบรวม อนุรักษ์ ภูมิปัญญาเหล่านี้จะถูกกลบเลือนไปได้ในที่สุดซึ่งจะเป็นที่น่าเสียดายเป็นอย่างยิ่ง การย้อมสีย้อมธรรมชาติถ้าได้รับการสนับสนุนและปรับปรุงพัฒนาอย่างถูกทางแล้วก็จะมีศักยภาพที่จะเป็นมรดกทางวัฒนธรรมอันทรงคุณค่าและสามารถพัฒนาเป็นอาชีพที่หารายได้เป็นกอบเป็นกำสู่คนในชาติได้

ในการย้อมสีย้อมชาตินั้น วัตถุดิบจากธรรมชาติที่ให้สีและที่ทำให้สีติดมีมากมายทั้งที่เป็นสีหลักสามสี (น้ำเงิน เหลือง แดง) สีเปลือกไม้ สีดำ และอื่นๆ ตัวอย่าง เช่น สีเหลือง อาจใช้ขมิ้น ดอกดาวเรือง ดอกคำฝอย แก่นไม้ขนุน ผลมะตูม เป็นต้น สีแดง อาจใช้ครั่ง รากยอ ป่า สิ่งเหล่านี้มีตามฤดูกาลและมีไม่เพียงพอที่จะใช้ย้อมผ้าในปริมาณมากๆได้ ทำให้มีขีดจำกัดในการผลิตสีย้อม ต้องมีการส่งเสริมการปลูกหรือขยายพันธุ์ โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ผลิตสารให้สีหรือหาพืชชนิดอื่นๆ ที่ให้สีแบบเดียวกันแต่มีในฤดูกาลที่ต่างออกไปและในปริมาณมาก นอกจากนี้ความคงทนของสียังไม่อยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน มักจะซีดขาวเมื่อเก็บไว้นานๆ หรือโดยการขัดถู ในแง่การกักตุนวัตถุดิบที่ให้สีเพื่อหมุนเวียนใช้ได้ตลอดปีทำได้โดยหาวิธีสกัดและแปรรูปสารที่ให้สีและสารที่ช่วยให้สีติดให้อยู่ในรูปที่ใช้ได้ง่ายแบบสีสังเคราะห์และสามารถกำหนดสัดส่วนของสีและน้ำในการย้อมเส้นใยในปริมาณที่ต้องการแล้วได้สีออกมาคงที่ และมีความคงทนต่อการขัดถู ซักล้าง แสง และความร้อนอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน เส้นใยต่างๆ เช่น ผ้าฝ้าย ลินิน ไหม ปัจจุบันมีราคาแพงเพราะมีการปลูกและเลี้ยงกันน้อยลงควรมีการส่งเสริมทางด้านนี้ด้วยในขณะเดียวกัน จากการศึกษาค้นคว้าเบื้องต้นเกี่ยวกับสีย้อมธรรมชาติในการย้อมผ้าและไหมจากผ้า

โบราณของ อำเภอแม่แจ่ม จอมทอง และฮอดซึ่งมีพื้นที่ติดต่อกันพบว่ามรดกทางวัฒนธรรมที่ร่วมกันของชุมชนแถบนี้มีเอกลักษณ์ที่สืบเนื่องมายาวนานคือผ้าขึ้นตีนจก ซึ่งมีเชิงขึ้นสีแดงกล่ำสวยสด ติดทนนาน (สังเกตจากเชิงขึ้นจกบางผืนอายุมากกว่าร้อยปีแล้วสีก็ยังสดอยู่) นอกจากนี้แถบสีแดงกว้างประมาณ 22 นิ้ว ยาว 30 นิ้ว ที่ใช้ในพิธีกรรมสำคัญของชุมชนกลุ่มนี้ก็เป็นสีแดงที่ย้อมแบบเดียวกัน สีแดงที่ว่าเป็นสีที่ย้อมยากเมื่อเทียบกับสีย้อมธรรมชาติอื่นๆ สีแดงดังกล่าวนี้ย้อมด้วยรากยอป่า ซึ่งเป็นรากไม้ที่แผ่สาขากว้างขวางรอบต้น ชาวบ้านจะเลือกตัดบางส่วนนำมาทุบและต้มจนได้น้ำย้อมสีแดง ซึ่งต้องนำมาผสมกับน้ำมันที่ได้จากพืชอีก 5 ชนิด คือ มะหาง ก่าน มะเคาะ มะแตก สบู่ดำ และละหุ่ง ขบวนการย้อมมีวิธีการที่สลับซับซ้อนและเคล็ดลับที่เกิดจากภูมิปัญญาชาวบ้านที่ถ่ายทอดกันมาหลายชั่วอายุคน นอกจากนี้ชาวไทยภูเขาหลายแหล่งที่ย้อมสีธรรมชาติก็ใช้รากยอป่าในการย้อมสีแดง สีส้ม และน้ำตาลแดง โดยเทคนิคการย้อมสีแดงต่างกันออกไป ต้นยอป่าที่ว่ามีชื่อพื้นเมืองอื่นๆเป็น สลักป่า สลักหลวง คุย โคะ และชื่อทางพฤกษศาสตร์เป็น *Morinda coreia* Ham. อยู่ในวงศ์ Rubiaceae เป็นไม้พุ่มขนาดเล็ก ใบเป็นใบเดี่ยวออกตรงข้ามกัน ใบเรียวยาวใหญ่หนาและแข็ง ดอกออกเป็นช่อที่ซอกใบ ลักษณะคล้ายยอบ้านสีขาว ผลเป็นผลรวม รูปทรงโป้นเป็นปุ่ม เปลือกสีน้ำตาลแดง เนื้อในรากเป็นสีเหลืองเปลือกสีน้ำตาลแดง morindin รากยอป่า (เปลือกสีน้ำตาลแดง – เนื้อในราก) ใช้ย้อมผ้าให้มีสีส้ม โดยนิยมย้อมผ้าฝ้าย ผ้าไหม และผ้าขนสัตว์ เมื่อเต็มเกล็ดของโลหะบางชนิดลงไปจะทำให้ได้สีแตกต่างกันออกไปและสีจะติดแน่นคงทน เช่นสีจากรากยอป่าผสมเกล็ดของอลูมิเนียม จะให้สีชมพูแดง สีจากรากยอป่าผสมเกล็ดของแมกนีเซียมจะให้สีม่วงแดง และสีจากรากยอป่าผสมเกล็ดของโครเมียมจะให้สีน้ำตาล เป็นต้น

ปัจจุบันต้นยอป่าที่พบในประเทศไทยมีไม่พอที่จะใช้ในการส่งเสริมให้เกิดผลิตภัณฑ์สีย้อมธรรมชาติในระดับอุตสาหกรรมได้และมีปริมาณน้อยลงทุกที ผู้วิจัยจึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาวิจัยเพื่อเพิ่มการผลิตสารให้สีจากรากยอป่า โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากรากยอป่าที่ผลิตสารให้สีดังกล่าวควบคู่กับขบวนการหมัก

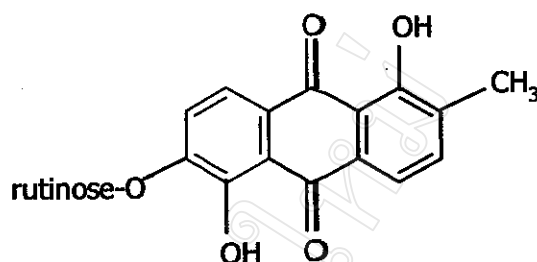
มีพืชอยู่ในวงศ์ Rubiaceae หลายชนิดถูกใช้เป็นสีย้อมและเป็นพืชสมุนไพรมาเป็นเวลานาน มีการศึกษาวิจัยมากมายทั้งทางด้านเภสัชวิทยาและองค์ประกอบทางเคมีของพืชที่อยู่ในวงศ์ Rubiaceae รวมทั้งที่อยู่ในสกุล *Morinda* ซึ่งอยู่ในวงศ์ Coffeoideae ที่แตกสายมาจากวงศ์ Rubiaceae พืชในสกุล *Morinda* สามารถพบได้ในเขตร้อนของทวีปเอเชีย (Perry 1980)¹ ไปจนถึง Polynesia ตามรายงานของการศึกษาพบว่ามีพืชวงศ์ *Morinda* ถึง 150 ชนิดและมี 11 ชนิด เป็นพืชดั้งเดิมที่พบในประเทศไทยและมีหลายชนิดที่รู้จักในด้านพืชให้สีย้อมมาตั้งแต่สมัย

โบราณ ในประเทศอินเดีย ฝ่าย ขนสัตว์ และหมอย้อมด้วยสารสีจากรากพืชสกุล *Morinda* และที่เป็นพืชหลักในการย้อมดังกล่าวคือ *Morinda coreia* Ham. หรือสลักป่า สลักหลวง ยอบ้า คุย หรือ คุ และ *M. citrifolia* Linn หรือ ยอบ้าน ยอ มะตาเสือ แะใหญ่ (เรียกโดยชาวกระเหรี่ยงแม่ฮ่องสอน) หรือ *M. angustifolia* Roxb. Var. *scabridula* Craib. หรือ ยอบ้า พืชหลักทั้งสามชนิดพบในประเทศไทยเช่นกัน

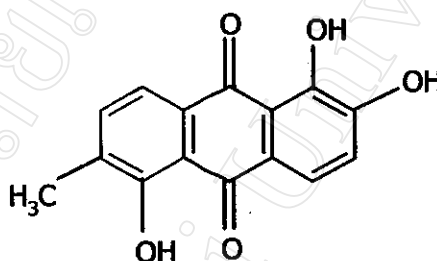
1.2 การศึกษาการเจริญของรากพืชในสกุล *Morinda* และการสร้างสารให้สี

พืชในสกุล *Morinda* นี้จะผลิตสารที่ใช้เป็นสีย้อมที่มีสีแดง ม่วง และน้ำตาล เมื่อย้อมฝ้ายไหม ขนสัตว์ที่เดิมเกลือบางชนิดลงไป สีที่ได้จะแตกต่างกันตามชนิดของเกลือบางชนิดที่เดิม แต่สีย้อมนี้จะซีดจางเมื่อซักล้างด้วยสบู่ สีดังกล่าวพบมากที่เปลือกรากและจะมีการเพิ่มปริมาณขึ้นหลังจากที่พืชเจริญใน 2 – 3 ปีแรกของการปลูก องค์ประกอบทางเคมีเป็นสารประกอบประเภท anthraquinone ที่พบในการเพาะเลี้ยง แคลลัส (callus) ของ *Cinchona ledgeriana* Moens (Rubiaceae) (Wijnsma *et.al.*, 1984)² ในเปลือก (bark) ของ *Ploiarium alternifolium* Melch. (Bonnetiaceae) พบ anthraquinone 2 ชนิด (Bennett G.J. *et.al.*, 1991)³ ในรากของ *Rhamnus formosana* (Rhamnaceae) พบ anthraquinone 6 ชนิด (Lin. C. N. *et.al.*, 1990)⁴ ในรากของ *Rubia oncotricha* L. (Rubiaceae) พบ anthraquinone 6 ชนิด (Itokawa H. *et.al.*, 1991)⁵ ในรากของ *R. akane* Nakai (Rubiaceae) พบ anthraquinone 2 ชนิด (Okuyama E. *et.al.*, 1990)⁶ ในรากของ *R. tinctorum* และ *M. citrifolia* (Rubiaceae) (Poulsen C. *et.al.*, 1991)⁷ ในรากของ *Cassia pudibunda* M. (Leguminosae) พบ anthraquinone 3 ชนิด (Messana. *et.al.* 1991)⁸ และในรากของ *R. tinctorum* Linn. (Madder) สามารถพบ anthraquinone ถึง 20 ชนิด ที่เปลือกราก (root bark) ของยอบ้า *M. coreia* Ham. จะพบ anthraquinone ชนิด morindin ซึ่งเป็นสารให้สีแดงซึ่งมีสูตรโครงสร้างทางเคมีดังรูป 1.1 เปลือกราก (root bark) ของยอบ้า *Morinda angustifolia* Roxb. var. *scabridula* Craib. จะพบ anthraquinone ชนิด morindone ซึ่งเป็นสารให้สีแดง และมีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็น morindone ซึ่งมีสูตรโครงสร้างตามรูป 1.2

จากการศึกษาการสังเคราะห์สารประกอบ anthraquinone ทางชีวภาพพบว่าวิถีการสังเคราะห์จัดเป็น secondary metabolism ซึ่งเป็นการสังเคราะห์จากสารตัวกลางหลักๆ สองสามชนิดคือ อะซิเตท (acetate) ชิคิเมท (shikimate) และเมวาโลเนท (mevalonate) โดยลำดับของปฏิกิริยา อะซิเตท ชิคิเมท จะสังเคราะห์โคริสเมท (chorismate) จากนั้นก็จะสังเคราะห์

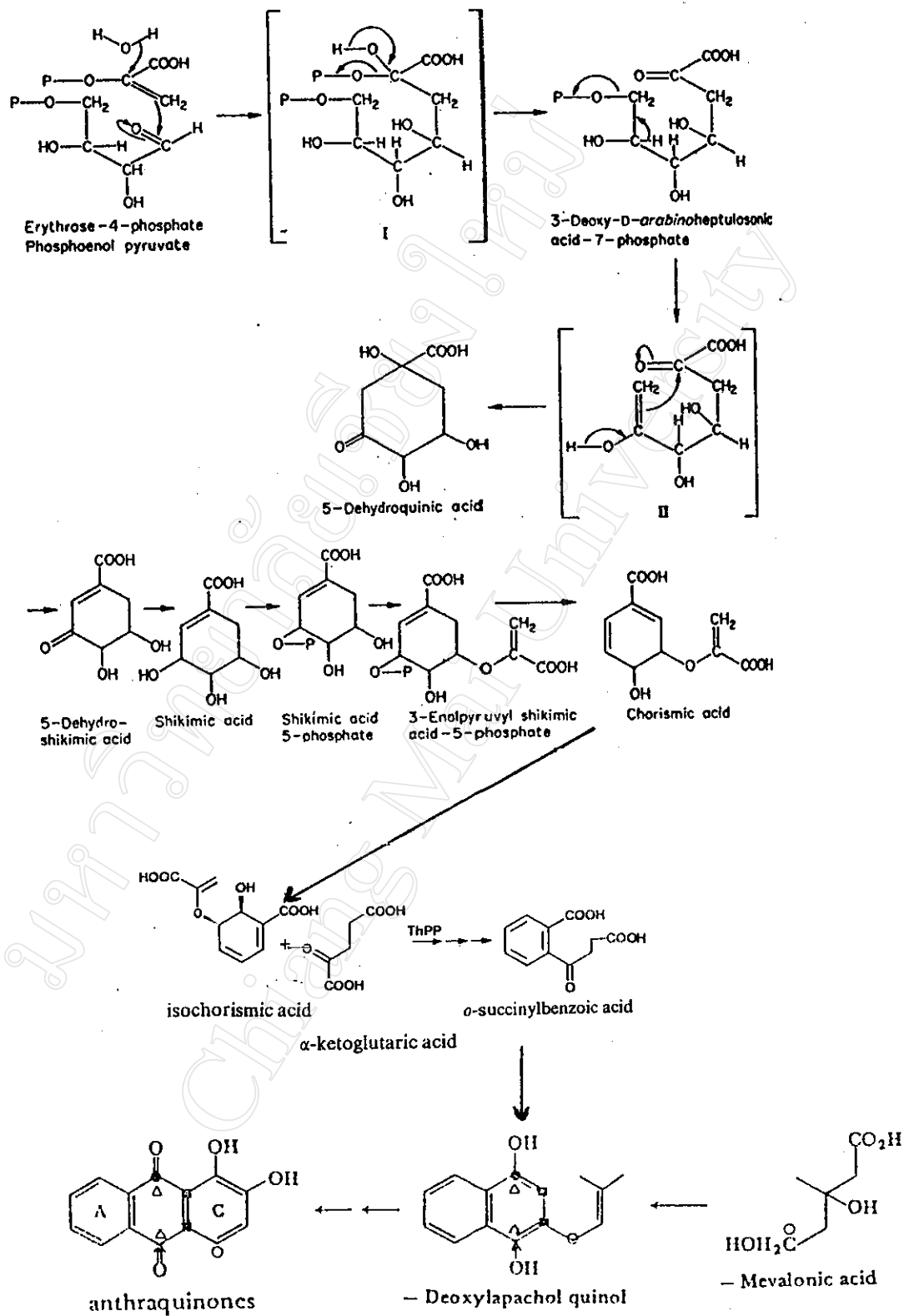


รูป 1.1 สูตรโครงสร้างทางเคมีของ Morindin



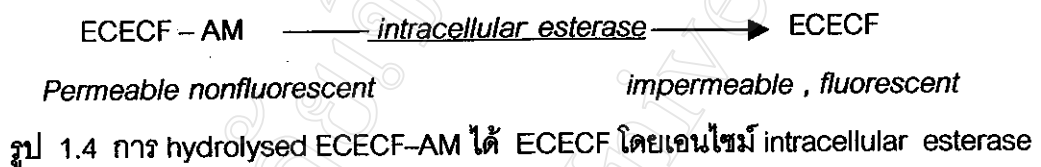
รูป 1.2 สูตรโครงสร้างทางเคมีของ Morindone⁹

ไอโซโคริสมัท (isochorismate) (Simantiras M. et.al., 1989)¹⁰ โดย enzyme plant isochorismate synthase และ Mg^{2+} (Poulsen C. et.al., 1991)⁷ ไอโซโคริสมัท (isochorismate) จะทำปฏิกิริยากับ α - ketoglutaric acid โดยมี เอนไซม์ (enzyme) ไทเอมีนไพโรฟอสเฟต (thiamine pyrophosphate) นำไปสู่การเกิดสารประกอบกรดออกโซซัคซินิก-อิวเบนโซอิก (o - succinoylbenzoic acid) (Simantiras M. et.al., 1991)¹¹ ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับ เมวาโลเนต (mevalonate) ได้ deoxylapachol quinol ซึ่งจะสังเคราะห์ได้ anthraquinone (Goodwin T.W., 1976)¹² สารประกอบ morindone เกิดขึ้นได้ 2 แนวทาง โดยจะเกิดผ่านวิถี Shikimate - Mevalonate (Leistner, 1973)¹³ ดังรูป 1.3 มีการศึกษาผลการผลิต anthraquinone โดยการเพาะเลี้ยงรากของ *Morinda citrifolia* ในอาหารเหลวและศึกษาอิทธิพลของฮอร์โมนพืชต่อสภาวะความเป็นกรด-ด่างของ cytoplasmic pH ในอาหารเหลวที่ใช้เลี้ยง cells ของ *M. citrifolia* ที่เติมฮอร์โมนพืชกลุ่ม ออกซิน (auxin) คือ α - naphthalene acetic

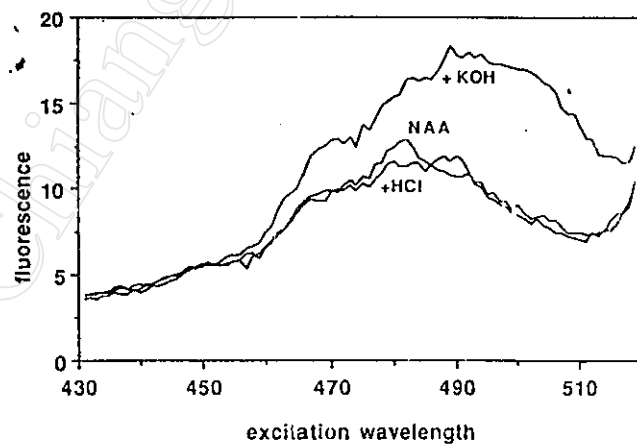


รูป 1.3 ภาพแสดงการสังเคราะห์ anthraquinone ผ่านวิถี Shikimate - Mevalonate¹³

acid (NAA) และ 2,4 – dichlorophenoxyacetic acid (2,4 – D) ซึ่งมีผลต่ออัตราการเจริญเติบโต (growth rate) และการสร้าง anthraquinone ศึกษาโดยการวัดค่า cytoplasmic pH โดยใช้ 2',7' – bis - (2 - carboxyethyl) – 5 – (and 6) – carboxyfluorescein (acetoxymethyl ester) (BCECF(-AM)) ซึ่งจะเป็นสารที่ทำให้เกิด permeability ที่ผนังเซลล์ (cell wall) โดยจะไม่มีเรืองแสง (nonfluorescent) BCECF(-AM) จะถูกไฮโดรไลต์ด้วย intracellular esterase ได้เป็น BCECF ซึ่งจะทำให้เกิด membrane impermeable โดยจะมีการเรืองแสง (Fluorescent) ดังรูป 1.4

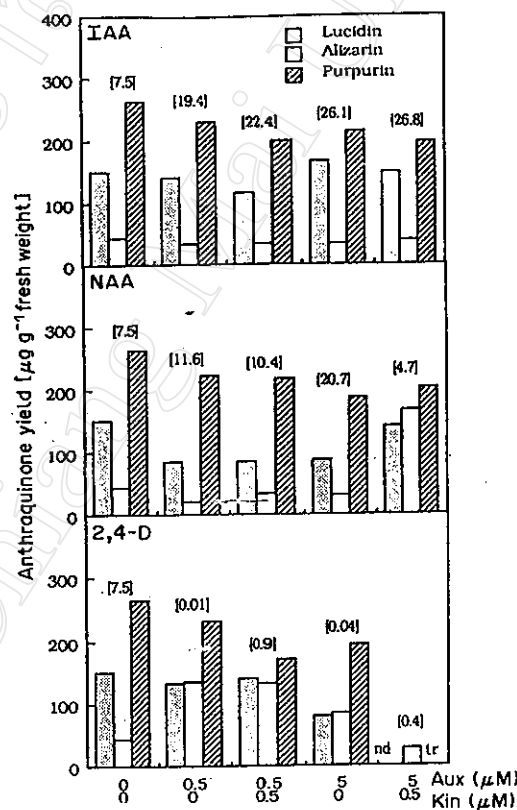


การศึกษา fluorescent pH indicator โดยการเติม 0.4 mM ของกรดไฮโดรคลอริก (HCl) และ 1.6 mM ของโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีออกซิน (auxin) คือ NAA พบว่าถ้า cytoplasmic pH จะมีค่าลดลงโดยการเติม HCl พบว่าการเรืองแสงก็จะลดลงด้วย แต่ถ้าทำให้ cytoplasmic pH สูงขึ้นโดยการเติม KOH พบว่าการเรืองแสงจะเพิ่มขึ้นดังรูป.1.5

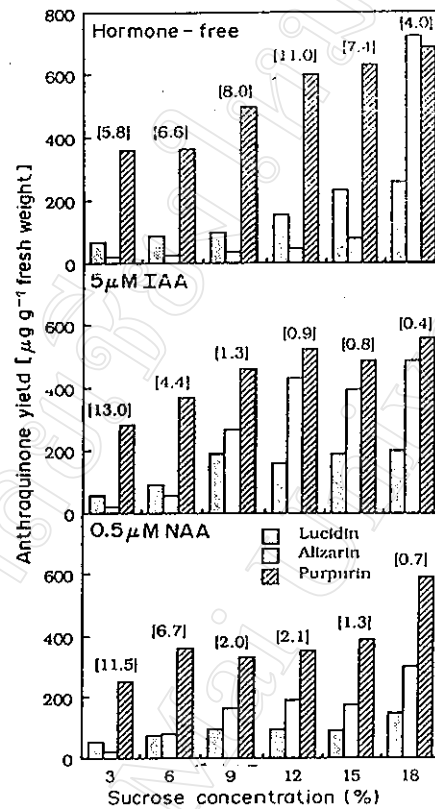


รูป 1.5 กราฟแสดงผลของ HCl และ KOH ที่เติมให้กับ fluorescence excitation spectra ของ BCECF ที่จะมีผลต่อการเจริญเติบโตของ *Morinda citrifolia* ที่เจริญเติบโตในอาหารที่มี NAA¹⁴

cytoplasmic pH มีค่าต่ำคือเป็น acidic จะมีการสร้าง anthraquinone ได้ดี (Hagendoorn et.al., 1994)¹⁴ ผลของความเข้มข้นของฮอร์โมนพืชกลุ่ม auxin 3 ชนิดคือ indole - 3 - acetic acid (IAA) , NAA และ 2,4 - D กลุ่ม cytokinin คือ kinetin ในอาหารเหลว MS medium เลี้ยงราก (hair root) ของ *Rubia tinctorum* ที่มี 5 μM IAA จะให้อัตราการเจริญเติบโตและการผลิต anthraquinone สูงสุด ในขณะที่ kinetin ไม่มีผลซึ่งใช้ 18 % น้ำตาลซูโครส อาหารเหลวที่ไม่มีฮอร์โมนพืชแต่มี 12 % ซูโครส จะให้อัตราการเจริญเติบโตและการผลิต anthraquinone สูงดังแสดงในรูป 1.6 แสดงผลของฮอร์โมนพืชทั้ง 3 ต่อปริมาณการสร้าง anthraquinone ของราก *R. tinctorum* รูป 1.7 แสดงผลของความเข้มข้นของซูโครสต่อปริมาณการสร้าง anthraquinone ของราก *R. tinctorum* (Sato K. et.al.,1991)¹⁵

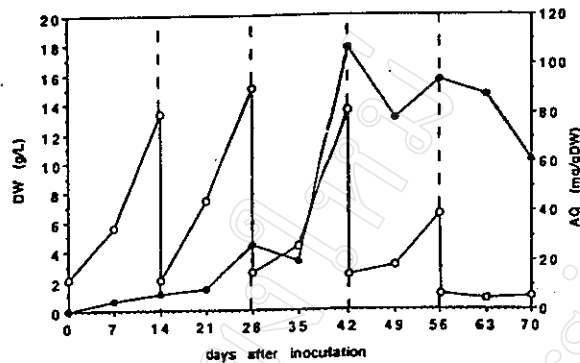


รูป 1.6 ผลของฮอร์โมนพืชต่อการสร้าง anthraquinone และการเจริญเติบโตของรากของ *Rubia tinctorum*¹⁵



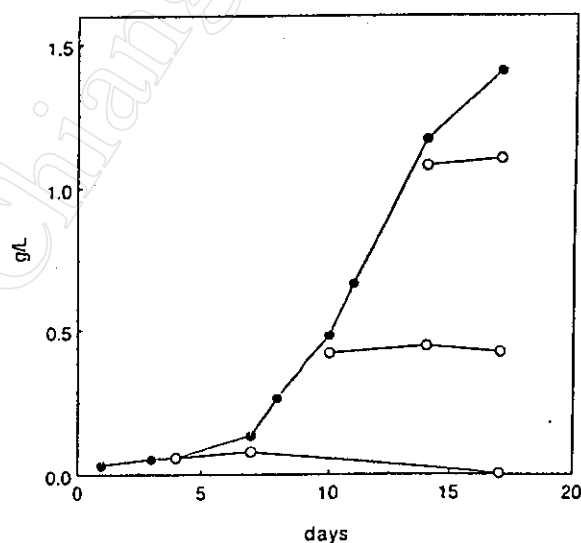
รูป 1.7 ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสต่อการสร้าง anthraquinone และการเจริญเติบโตของ *Rubia tinctorum*¹⁵

และการศึกษาผลของฮอร์โมนพืช คือ 1mg l^{-1} NAA และ 1mg l^{-1} 2,4-D เติมลงในอาหารเหลว B_5 ที่เลี้ยง *Morinda citrifolia* พบว่ามีการสร้าง anthraquinone มากถ้าเติม NAA แต่ถ้าเติม 2,4-D จะยับยั้งการสร้าง anthraquinone (van der Plas L.H.W. *et.al.*, 1995)¹⁶ แสดงดังรูป 1.8



รูป 1.8 กราฟแสดงการเจริญและการสร้าง anthraquinone ระหว่างการเลี้ยงเซลล์ของ *M. citrifolia* ที่เติม NAA (o) และที่เติม 2,4-D (●)¹⁶

ผลของน้ำตาลชนิดอื่นๆในกลุ่ม monosaccharide เช่น glucose , fructose ต่อ NAA และ 2,4-D โดยเติมในอาหาร B₅ ที่มี 4% ซูโครส พบว่าอาหารที่มีการสร้าง anthraquinone มากในทางตรงข้าม 2,4-D จะยับยั้งการสร้าง anthraquinone ดังรูป 1.9 ซึ่งจะแสดงถึงการเติม 2,4-D ลงในอาหารที่มี NAA ในช่วง วันที่ 4, วันที่ 10 และวันที่ 14 จะเห็นว่าปริมาณ anthraquinone จะลดลงทันที (Hagendoorn M.J.M. *et.al.*, 1994)¹⁷



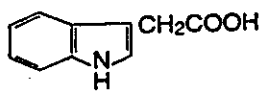
รูป 1.9 แสดงถึงการเติม 2,4-D ลงในอาหารที่มี NAA ในช่วงวันที่ 4, วันที่ 10 และวันที่ 14 ปริมาณ anthraquinone จะลดลง¹⁷

ฮอร์โมนพืช (phytohormones) แบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม ออกซิน (Auxin), จิบเบอเรลลิน (Gibberellin), ไซโตไคนิน (Cytokinin), เอทิลีน (Ethylene) และแอบซิสสิกแอซิด (Abscissic acid) รูป 1.10 แสดงโครงสร้างทางเคมีของกลุ่ม ออกซิน (auxin) และกลุ่มไซโตไคนิน (cytokinin) (สมิตะมาน ประสาทพร 2541)¹⁸ การเตรียม phytohormone ใช้ตัวทำละลายและการเก็บรักษาที่แตกต่างกัน (ภาวิตะ รังสฤษดิ์ 2540)¹⁹ แสดงในตาราง 1.1

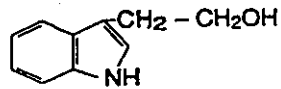
ตาราง 1.1 แสดงตัวทำละลายและการเก็บรักษาสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช

กลุ่มสาร	ชื่อสาร		ตัวทำละลาย	การเก็บ
ออกซิน (Auxins)	IAA	Indole-3-acetic acid	1N NaOH	0 °ซ
	IBA	Indole butyric acid	1N NaOH	0-5 °ซ
	NAA	Naphthaleneacetic acid	1N NaOH	อุณหภูมิห้อง
	2,4-D	2,4-dichlorophenoxyacetic acid	50% EtOH	อุณหภูมิห้อง
	2,4,5-T	2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid	50% EtOH	อุณหภูมิห้อง
ไซโตไคนิน (Cytokinins)	BAP	N ₆ -Benzyladenine phosphate	1N NaOH	อุณหภูมิห้อง
	-	Kinetin	1N NaOH	0 °ซ
	-	Zeatin	1N NaOH	0 °ซ
	2iP	N ₆ -Isopentenyl adenine	1N NaOH	0 °ซ
สารควบคุมการเจริญเติบโตอื่นๆ	ABA	Abscissic acid	1 N NaOH	0 °ซ
	GA	Gibberillic acid	50% EtOH	อุณหภูมิห้อง
	-	Picloram	0.2 M KOH	0 °ซ

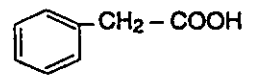
หมายเหตุ NaOH = Sodium hydroxide, EtOH=Ethanol, KOH = Potassium hydroxide,
N=Normality, M=Molarity



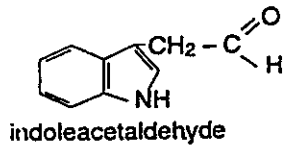
Indole-3-acetic acid
mol. wt. = 175.2 g/mole



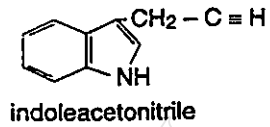
Indole ethanol



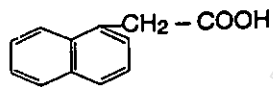
phenylacetic acid



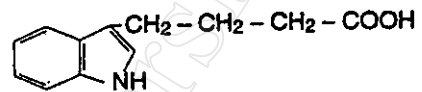
indoleacetaldehyde



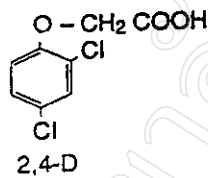
indoleacetonitrile



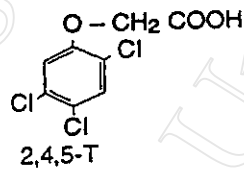
α -naphthalene acetic acid (NAA)



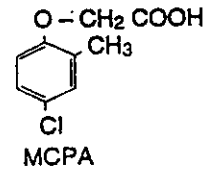
indole butyric acid (IBA)



2,4-D



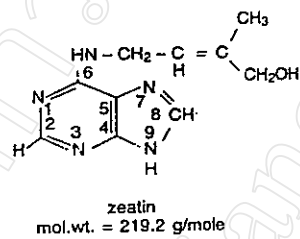
2,4,5-T



MCPA

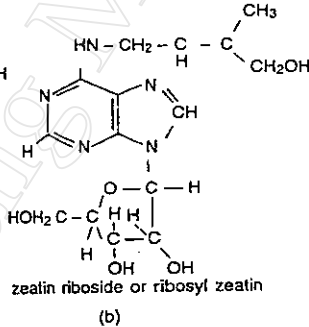
2-Methyl-4-chlorophenoxyacetic acid

A. กลุ่ม Auxin



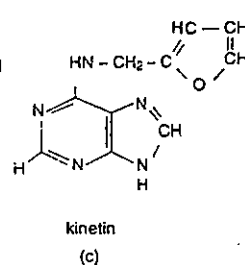
zeatin
mol.wt. = 219.2 g/mole

(a)



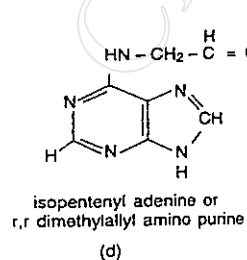
zeatin riboside or ribosyl zeatin

(b)



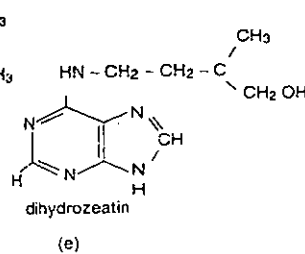
kinetin

(c)



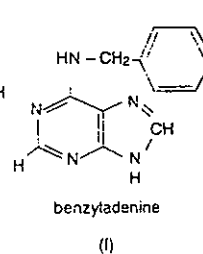
isopentenyl adenine or
r,r dimethylallyl amino purine

(d)



dihydrozeatin

(e)



benzyladenine

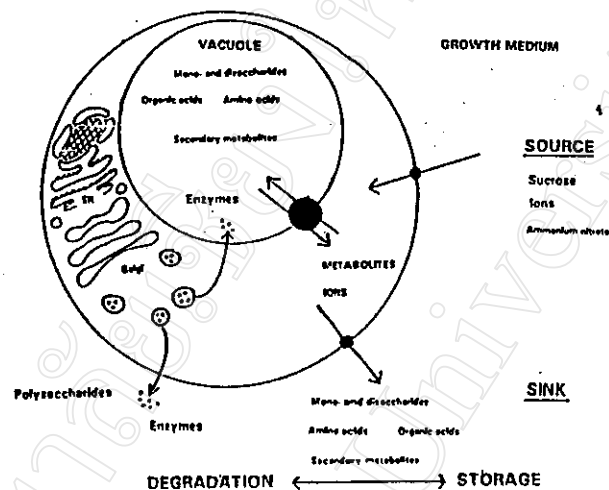
(f)

B. กลุ่ม Cytokinin

รูป 1.10 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ Phytohormone 2 กลุ่มคือ A. กลุ่ม Auxin และ B. กลุ่ม Cytokinin¹⁸

1.3 การสกัด anthraquinone โดยใช้เอนไซม์

ใช้เอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ (cell wall) และผนังของ tonoplast ซึ่งเป็น cell membrane ของ vacuole ดังรูป 1.11 ซึ่งมีองค์ประกอบเป็น phospholipid เช่น phosphatidyl choline และ phosphatidyl ethanolamine ซึ่งจะถูกเปลี่ยนเป็น phosphatidic acid โดย phospholipase D



รูป 1.11 แสดงโครงสร้างของเซลล์และ vacuole ที่เก็บ secondary metabolite

และยังมีเอนไซม์อื่นๆอีก เช่น Lipase, Lipozyme IM20® และ Lecitase®, Coloras®, Optidex LW.-300®, 95%glucoamylase, α -amylase, cellulase และ sophospholipase จะเห็นว่าถ้าเติม Lipase กับ Lecitase ปริมาณน้อย % การเจริญเติบโต (growth rate) และ % anthraquinone จะเพิ่มมากขึ้นดังแสดงในตาราง 1.2 (Donennburg H. et.al., 1992)²⁰

ตาราง 1.2 ผลของ lipase กับ lacinase ต่อการเจริญและปริมาณ anthraquinone ของ *Morinda citrifolia* เซลล์หลังจากเพาะเลี้ยงมา 2 สัปดาห์²⁰

Lipase			Lecitase		
Concentration (μ l/ml)	Growth (%)	AQ (%)	Concentration (μ l/25 ml)	Growth (%)	AQ (%)
0.5	102	82	1.0	95	53
1.0	113	38	2.0	89	28
2.0	99	36	4.0	78	20
5.0	104	18	6.0	54	18
10.0	9	11	10.0	No cell growth	

AQ, Anthraquinone accumulation.
Data are given in relation to the untreated sample.

1.4 การสกัดและวิเคราะห์สารให้สีธรรมชาติจากพืช²¹

1.4.1 การสกัด

การสกัดสารสำคัญจากพืชอาจทำได้หลายวิธี ขึ้นอยู่กับชนิดของสารที่สกัดคุณสมบัติของสารในการทนต่อความร้อน ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ แต่ละวิธีมีข้อดีและข้อจำกัดวิธีเหล่านี้ได้แก่

1.4.1.1 **Maceration** เป็นขบวนการสกัดสารสำคัญจากพืชโดยวิธีหมักพืชกับตัวทำละลายในภาชนะที่ปิด เช่น ขวดปากกว้าง ขวดรูปชมพู่หรือโถ เป็นต้น ทิ้งไว้ 7 วัน หมั่นเขย่าหรือคนบ่อยๆ เมื่อครบกำหนดเวลาจึงค่อยๆรินเอาสารสกัดออกพยายามบีบเอาสารละลายออกจากกาก (marc) ให้มากที่สุด รวมสารสกัดที่ได้นำไปกรอง การสกัดถ้าจะสกัดให้หมดจดอาจจำเป็นต้องสกัดซ้ำหลายครั้ง วิธีนี้มีข้อดีที่สารไม่ถูกความร้อนแต่เป็นวิธีที่สิ้นเปลืองตัวทำละลายมาก

1.4.1.2 **Percolation** เป็นขบวนการสกัดสารสำคัญแบบต่อเนื่อง โดยใช้เครื่องมือที่เรียกว่า percolator นำพืชมาหมักกับตัวทำละลายพอขึ้น ทิ้งไว้ 1 ชม. เพื่อให้พองตัวเต็มที่แล้วค่อยๆ บรรจุผงพืชที่ละชั้นลงใน percolator เติมตัวทำละลายลงไปให้ระดับตัวทำละลายสูงเหนือผงพืชประมาณ 0.5 ซม. ทิ้งไว้ 24 ชม. จึงเริ่มใสเอาสารสกัดออก โดยคอยเติมตัวทำละลายเหนือผงพืชอย่าให้แห้งเก็บสารสกัดจนการสกัดสมบูรณ์ บีบกากเอาสารสกัดออกมาให้มากที่สุด นำสารสกัดที่เก็บได้ทั้งหมดรวมกันนำไปกรอง

1.4.1.3 **Soxhlet Extractor** เป็นวิธีการสกัดแบบต่อเนื่อง โดยใช้ตัวทำละลายซึ่งมีจุดเดือดต่ำ การสกัดทำได้โดยใช้ความร้อนทำให้ตัวทำละลายใน flask ระเหยขึ้นไป แล้วกลั่นตัวลงมาใน thimble ซึ่งบรรจุผงพืชไว้ เมื่อตัวทำละลายใน extracting chamber สูงถึงระดับจะเกิดกาลักน้ำ สารสกัดจะไหลกลับลงไปใน flask ด้วยวิธีการกาลักน้ำ flask นี้ได้รับความร้อนจาก heating mantle หรือหม้ออังไอน้ำ ตัวทำละลายจึงระเหยขึ้นไป ทั้งสารสกัดไว้ใน flask ตัวทำละลายเมื่อกระทบ condenser จะกลั่นตัวกลับลงมาสกัดสารใหม่ วนเวียนเช่นนี้จนกระทั่งการสกัดสมบูรณ์การสกัดด้วยวิธีนี้ใช้ความร้อนด้วยจึงอาจทำให้สารเคมีบางชนิดสลายตัว

1.4.1.4 **Liquid-liquid Extractor** เป็นการสกัดสารจากสารละลายซึ่งเป็นของเหลวลงในตัวทำละลายอีกชนิดหนึ่ง ซึ่งไม่ผสมกับตัวทำละลายชนิดแรก แบ่งเป็น 2 ชนิดคือ

- ก. Extractan lighter คือตัวทำละลายที่ใช้สกัดมากกว่าตัวทำละลายที่ใช้ละลายสาร
- ข. Raffinate lighter คือตัวทำละลายที่ใช้สกัดน้อยกว่าตัวทำละลายที่ใช้ละลายสาร

1.4.2 การแยกบริสุทธิ์

ก่อนที่จะทำการวิเคราะห์โครงสร้างเคมีตรวจสอบปริมาณสารให้แต่ละชนิดที่มีในพืชแต่ละชนิดตลอดจนสมบัติของสารให้สีดังกล่าวจำเป็นต้องทำการแยกให้บริสุทธิ์เสียก่อน สำหรับสารให้สีธรรมชาติขั้นตอนการแยกบริสุทธิ์ไม่ยุ่งยากและวิธีที่นิยมใช้มีดังต่อไปนี้

1.4.2.1 โครมาโทกราฟีผิวนาง (Thin-layer Chromatography, TLC)

เป็นการแยกสารโดยใช้ stationary phase ซึ่งแผ่เป็นแผ่นเคลือบบน support ซึ่งอาจเป็นแก้ว aluminium หรือ polyethylene เมื่อหยดสารผสมลงบน stationary phase ที่เหมาะสมเพื่อให้เกิดกระบวนการที่ตัวทำละลายจะเคลื่อนที่ผ่านไปบน stationary phase ซึ่งเรียกว่า development ขณะที่เกิด development สารก็จะแยกออกจากกัน กลวิธีในการแยกจะมีทั้ง adsorption และ partition แต่จะมีวิธีใดมากกว่าขึ้นกับว่าแผ่น TLC ที่เตรียมขึ้นนั้นถูกนำไป activate หรือไม่ การ activate แผ่น TLC โดยอบที่ 110°C เป็นเวลาครึ่งชั่วโมง จะทำให้น้ำระเหยออกไปจาก particle ของ adsorbent ทำให้กลวิธีเป็น adsorption มากกว่า partition แต่ถ้าไม่ได้นำแผ่น TLC ไป activate น้ำที่จับอยู่ที่ particle จะทำหน้าที่เป็น liquid stationary phase จะมี partition mechanism เกิดมากกว่าเดิม น้ำที่เคลือบอยู่นี้มาจากความชื้นในอากาศนั่นเอง TLC ที่ใช้มีหลายชนิด ได้แก่

ก. Microscopic slide TLC เป็น TLC ขนาดเล็กใช้แผ่น microscopic slide ใช้แยกสารโดยใช้เวลาสั้น เช่น แยกสาร 4 ชนิด ในเวลา 5 นาที เตรียมง่าย ไม่ต้อง activate โดยมากใช้ทาง qualitative เช่น ตรวจ synthetic reaction หรือตรวจ fraction ของ column chromatography ที่มีสารไม่มากชนิดนัก

ข. Macro-layer TLC เป็น TLC ที่ใช้ทั่วไปและมีขายสำเร็จรูป มีขนาด 5x20, 10x20, 20x20 เซนติเมตร ความหนาของ adsorbent = 0.25 มิลลิเมตร ใช้ทั้ง qualitative และ quantitative

ค. Preparative TLC เป็น TLC ที่มี adsorbent หนาขึ้นถึง 2 มิลลิเมตร ใช้เมื่อแยกสารปริมาณมากขึ้น เช่นเดียวกับ Macro-layer TLC

1.4.2.2 โครมาโทกราฟีคอลัมน์ (Column Chromatography)

เทคนิคของโครมาโทกราฟีชนิดนี้ก็คือใส่ตัวทำละลายลงในหลอดรูปทรงกระบอก โดยปกติจะทำด้วยแก้วมีปลายด้านล่างเปิดและปิดได้ สารที่ใช้เป็นวัฏภาคคงที่อาจเป็นตัวดูดซับ (ในกรณีของโครมาโทกราฟีแบบดูดซับ) หรือเป็นของเหลวแผ่นบางๆ ที่เคลือบอยู่บนสารเฉื่อย (ในกรณีของโครมาโทกราฟีแบบแบ่งแยก) สำหรับการเตรียมคอลัมน์นั้นทำได้โดยการกรอกสารที่ใช้เป็นตัวดูดซับแห้ง ๆ ลงไปเลย หรือจะเตรียมโดยเอาตัวดูดซับนี้ผสมกับตัวทำละลายก่อน แล้วจึง

ใส่ลงในหลอดรูปทรงกระบอก ถ้าหากทำโดยวิธีแรกจะต้องเติมตัวทำละลายที่จะใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ลงไปและจะต้องให้ตัวทำละลายนี้สัมผัสกับตัวดูดซับอย่างทั่วถึง นั่นคือจะต้องไม่มีฟองอากาศอยู่ระหว่างตัวดูดซับและปรับระดับของตัวทำละลายให้อยู่เหนือตัวดูดซับเล็กน้อย แล้วจึงค่อยๆ เติมสารผสมที่ต้องการแยกลงไป (สารผสมนี้จะต้องละลายในตัวทำละลายที่ปริมาณน้อยที่สุด) หลังจากนั้นเติมตัวทำละลายที่จะใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ละน้อยของเหลวนี้จะไหลผ่านคอลัมน์และรองรับที่ปลายล่างของคอลัมน์ โดยทั่วไปจะใช้ตัวทำละลายที่มีโพลาริตี (polarity) สูงขึ้น ถ้าหากเลือกสารตัวดูดซับและตัวทำละลายได้เหมาะสมก็จะสามารถแยกสารแต่ละชนิดให้เคลื่อนที่ด้วยความเร็วต่างกันถ้าหากสารนั้นมีสีก็จะปรากฏให้เห็นเป็นแถบสีและเมื่อเติมตัวทำละลายไปเรื่อยๆ สารแต่ละชนิดก็จะผ่านออกจากคอลัมน์ในเวลาแตกต่างกัน นอกจากนี้ยังสามารถควบคุมให้สารต่างๆ แยกกันอยู่ในคอลัมน์แล้วหยุดเติมตัวทำละลายปล่อยให้ตัวทำละลายนี้ผ่านคอลัมน์จนหมด แล้วตัดคอลัมน์เป็นส่วนๆ ตามแถบของสารแต่ละชนิด ตันเอาตัวดูดซับออกจากคอลัมน์แล้วสกัดด้วยตัวทำละลาย หลังจากนั้นจึงจะเหวเอาตัวทำละลายออกไป ก็จะได้สารแต่ละชนิด ตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยการทำให้ TLC ที่ใช้ตัวชะแตกต่างกันหลายๆ ตัวชะ ถ้าสารบริสุทธิ์จะไม่มีตัวชะแบบใดแยกสารออกจากกันได้อีก หากยังไม่บริสุทธิ์จะทำการแยกซ้ำในคอลัมน์เดิมหรือทำการตกผลึกช่วย

1.4.3 การวิเคราะห์

1.4.3.1 การวิเคราะห์กลุ่มสารให้สีโดยปฏิกิริยาเคมี²¹

การศึกษาโดยอาศัยการตรวจสอบสารเคมี วิธีนี้อาศัยข้อมูลเบื้องต้นเพื่อจัดกลุ่มสารให้สีที่มีโครงสร้างหลักแบบเดียวกัน ซึ่งได้แก่ อัลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ แอนทราควิโนน เป็นต้น นำพืชต่างๆ มาตรวจสอบว่าสารให้สีจัดอยู่ในกลุ่มใดดังกล่าวข้างต้น พืชใดที่มีสารให้สีกลุ่มที่ตรวจสอบมากก็จัดเป็นพืชที่ควรนำมาสกัดแยกต่อจนได้สารบริสุทธิ์ แล้วจึงนำไปตรวจสอบสมบัติและโครงสร้างทางเคมี วิธีการตรวจสอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดในพืช อาจทำได้โดยใช้ปฏิกิริยาทางเคมีง่ายๆ ซึ่งจะให้ผลเป็นสีต่างๆ หรือการเกิดตะกอนต่างๆ ได้มีการใช้น้ำยาเคมีต่างๆ โดยเฉพาะกรดเข้มข้นในการทำปฏิกิริยากับสารสกัด

1.4.3.2 การวิเคราะห์โครงสร้างโดยวิธีทางสเปกโตรสโคปี (spectroscopy)

เป็นวิธีหาสูตรโครงสร้างโดยอาศัยการวัดและวิเคราะห์รังสีแม่เหล็กไฟฟ้า (electromagnetic radiation) ซึ่งถูกสารดูดกลืน (absorb) หรือ เปล่ง (emit) ออกมาจากสาร โดยอาศัยเครื่องมือต่างๆ ที่ทำหน้าที่ให้กำเนิดรังสีแม่เหล็กไฟฟ้า แยกวัดรังสีแม่เหล็กไฟฟ้าออกเป็นช่วงความยาวคลื่นต่างๆ กัน วัดการดูดกลืนรังสีในช่วงเหล่านี้โดยสาร และบันทึกข้อมูลออกมาเป็น spectrum ซึ่งสารจากธรรมชาติแต่ละชนิดมี spectrum ซึ่งมีลักษณะเฉพาะตัว การ

ตรวจสอบเอกลักษณ์ของสารซึ่งมีผู้ศึกษาสูตรโครงสร้างแล้วอาจทำได้โดยเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่รู้โครงสร้าง (authentic sample) หรือเปรียบเทียบจาก spectrum ที่รายงานไว้ในเอกสารต่างๆ สำหรับสารใหม่ต้องอาศัย spectra มาประกอบกันจึงจะสามารถบอกสูตรโครงสร้างได้

ก. Ultraviolet and visible Spectroscopy

เป็นวิธีการวัดการดูดกลืนแสงของสารในสารละลายที่เจือจาง ที่ช่วงความยาวคลื่น 200- 700 นาโนเมตร สำหรับสารที่มีสีวัดที่ 200-700 นาโนเมตร ส่วนสารที่ไม่มีสีวัดที่ 200-400 นาโนเมตร สิ่งสำคัญในการตรวจเอกลักษณ์คือ ความยาวคลื่น (wave length) ที่มีการดูดกลืนสูงสุดหรือต่ำสุดของสารและความเข้มข้นของการดูดกลืน นอกจากวัดการดูดกลืนในสารละลายที่เป็นกลางแล้ว ยังดูผลการเปลี่ยนแปลง pH ต่อการดูดกลืนแสงของสารว่าจะเปลี่ยนแปลงไปหรือไม่ เช่น phenolic compound เมื่อใส่ด่าง ความยาวคลื่นที่สารดูดกลืนแสงจะเคลื่อนไปอยู่ที่ช่วงความยาวคลื่นที่ยาวขึ้น เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า Bathochromic shift ซึ่งลักษณะการเปลี่ยนแปลงนี้ถ้าเป็นลักษณะการเปลี่ยนไปดูดกลืนสารที่ช่วงความยาวคลื่นสั้นลงเรียกว่า hypochromic shift สารบางชนิดจะไม่ดูดกลืนแสงเลย

ข. Infrared Spectroscopy

เป็นการวัดพลังงานที่เกิดจากการสั่นของโมเลกุล พันธะ หรือ functional group ช่วงที่วัดมีความถี่ $4,000-677\text{ cm}^{-1}$ หรือช่วงคลื่น 2.5 –15 nm เราใช้ตำแหน่งของ spectrum และความเข้มข้นของ peak ว่ามากน้อยหรือปานกลางเทียบกับ spectrum ของสารที่รู้สูตรโครงสร้างจาก IR spectrum จะช่วยบอก functional group และประเภทของสารได้ บริเวณเหนือ $1,200\text{ cm}^{-1}$ เป็น band หรือ peak ที่เกิดจากการสั่นของ individual bonds หรือ functional groups เช่น aromatic พบที่ 3,050 , 2,100 , 1,700 , 1,600, 1,580 และ $1,600\text{ cm}^{-1}$ ส่วนบริเวณที่ต่ำกว่า $1,200\text{ cm}^{-1}$ เป็น fingerprint region เกิดจากการสั่นของทั้งโมเลกุล เป็น spectrum ที่ซับซ้อนสารที่จะนำไปทำการ IR spectrum จะต้องเป็นสารที่บริสุทธิ์ อาจใช้สารละลาย 0.1-5% โดยมากใช้คลอโรฟอร์ม หรือ ใช้ของแข็งผสมกับ KBr แล้วอัดเป็นแผ่นใส หรือ ใช้ Nujol ทำให้เป็น suspension หรือ mull

ค. Nuclear Magnetic Resonance (NMR)

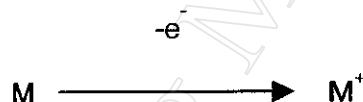
เป็น spectrum ที่ได้จากการวัด magnetic moment ของ H-atom เนื่องจาก H-atom ที่ติดอยู่กับ functional group แต่ละอันจะมีค่า magnetic moment แตกต่างกัน เช่น CH_2 , $-\text{CH}_3$, $-\text{CHO}$, $-\text{NH}_2$ เป็นต้น จาก spectrum ของ NMR เราจะได้ค่าของจำนวน H และชนิดของ carbon skeleton ที่ H จับอยู่ ตำแหน่งของ spectrum ใช้ค่า δ (delta) หรือ τ (tau) = 10δ

ตัวทำละลายที่ใช้ละลาย sample ได้แก่ CCl_4 , deuterium chloroform (CDCl_3), deuterium oxide (D_2O), deuterium acetone (CD_3COCD_3) ส่วนสารที่มีตัวใช้ tetramethylsilane, เป็นตัวทำละลาย พวกสารที่เป็น saturated compound จะมีค่า Chemical shifts น้อย ส่วนพวกที่มี unsaturation, O, N, S จะมีค่าสูง Chemical shifts (δ) จะมีค่า $= \Delta\nu \times 10^6/\text{radian frequency}$, $\Delta\nu$ = difference in absorption frequency ของ sample และ reference compound คือ TMS มีหน่วยเป็น Hertz หน่วยของ Chemical shift ส่วนมากใช้ p.p.m. spectrum ของ NMR อาจจะซับซ้อนเนื่องจาก interaction กับ atom ข้างเคียงแทนที่จะได้ peak เดียว อาจจะได้ 2 หรือ 3 หรือ มากกว่า

ง. Mass spectrometry (MS)

เป็น spectrum ที่ได้จากการระเหย sample เข้าไปใน low pressure system ของ MS ซึ่งสารจะถูก ionized เกิดการแตกตัวของพันธะได้ไอออนที่มีประจุบวก (positively charged ion) ซึ่งจะถูกเร่ง (accelerated) ในสนามแม่เหล็กและการกระจายตัว (disperse) ทำให้สามารถวัดปริมาณ ion สัมพัทธ์ (Relative abundance) ได้เป็น mass/charge

MS จะช่วยในการหาน้ำหนักโมเลกุล โดยใช้ค่า molecular ion ซึ่งเป็น ion ที่เกิดจาก ionize ทำให้ electron หลุดไป 1 ตัว



ในการหาสูตรโครงสร้างอาศัย fragment ที่ได้จากการแตกตัวว่ามีที่ m/e เท่าใด แล้วนำแต่ละ fragment มาต่อกันและอาศัย spectroscopy อื่น ก็ช่วยให้หาสูตรโครงสร้างได้ สารบางชนิดไม่ระเหย จำเป็นต้องทำ trimethylsilyl ethers หรือ methyl ester derivatives ก่อน

1.4.4 การตรวจสอบสมบัติสารให้สี

สมบัติสารให้สีที่สกัดได้จากพืชชนิดต่างๆ เป็นข้อมูลที่มีประโยชน์ในการพัฒนาการย้อมสีธรรมชาติและการเลือกชนิดและแหล่งของสารให้สี เช่น สมบัติการเปลี่ยนแปลงสีของสารให้สีต่อความเป็นกรดต่างของสารละลาย การเปลี่ยนสีเมื่อมีเกลือของโลหะบางชนิดใช้ประโยชน์ในการปรับเปลี่ยนเฉดสีของน้ำย้อม สมบัติการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ช่วงความยาวคลื่นที่เฉพาะสำหรับสารให้สีสามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารให้สีในน้ำย้อมสมบัติการละลายการคงทนของสารให้สีต่อความร้อน แสง และการถูกออกซิไดซ์ในบรรยากาศการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาช่วย

ในการพิจารณาเลือกใช้สีธรรมชาติให้เหมาะกับงาน เช่น ใช้เป็นสีผสมอาหาร เครื่องสำอาง หรือ เป็นสีย้อม เป็นต้น

1.5 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

เพื่อศึกษาการเพิ่มผลผลิตสารให้สีธรรมชาติจากรากยอป่าสกุล *Morinda angustifolia* Roxb. var. *scabridula* Craib. โดยการเพาะเลี้ยงกลุ่มเซลล์ราก และสกัดสารให้สีที่เซลล์สร้างขึ้น มาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับสารให้สีที่ผลิตจากรากยอป่าสายพันธุ์เดียวกันและศึกษาสภาวะที่ เซลล์รากผลิตสารให้สีสูงสุด