บทคัดย่อ

ชื่อโครงการ การผลิตและพัฒนาสารให้สีธรรมชาติโดยการเพาะเลี้ยงกลุ่มเซลล์พืชให้สีเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและสีย้อม

ผู้เขียนรายงาน รองศาสตราจารย์ ดร.สุรีย์ ฟูตระกูล

แอนทราควิโนน เป็นกลุ่มสารให้สีธรรมชาติที่พบในรากของพืชสกุล *Morinda* ซึ่งพบทั่วไปในเขตภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย และมีการใช้เป็นสีย้อมกันอย่างแพร่หลาย ในการวิจัยนี้ได้ทำการแสวงหาแนวทางในการเพิ่มผลผลิตสีย้อมธรรมชาติเพื่อผลิตสารให้สีดังกล่าว โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์รากยอป่าสายพันธุ์ *Morinda angustifolia* Roxb. var. *scabridula craib.* และได้ทำการสกัดรงควัตถุสีแดงจากรากยอป่าด้วยเอธานอลพบสารประกอบหลัก 2 ชนิด ผลการตรวจสอบทางเคมีของสารทั้ง 2 ชนิด พบว่าเป็นสารประกอบแอนทราควิโนน และได้วิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารให้สีหลักที่มีมากที่สุดโดยการใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีคอลัมน์ และชะออกมาด้วยตัวชะผสมของเฮกเซน : เมธานอล ในอัตราส่วน 9/1 ทำการชะติดต่อกันไปเรื่อยๆด้วยเทคนิคที่เรียกว่า Isocratic elution แล้วจึงทำการแยกบริสุทธิ์ต่อไปด้วยการตกผลึกซ้ำ ได้ผลึกที่มีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็ม สีเหลืองอมส้ม การวิเคราะโครงสร้างทางเคมีของสารประกอบหลักด้วยยูวีวิสิเบิล สเปคโตรสโคปี แมส สเปคโตรสโคปี และ C^{13} นิวเคลียร์แมกเนติคเรโซแนนซ์ สเปคโตรสโคปี พบว่าเป็นองค์ประกอบหลักนี้มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{15}H_{10}O_5$ และมีโครงสร้างทางเคมีเป็น morindone ส่วนสารให้สีหลักที่เหลือได้จากการสกัดด้วยน้ำด่างที่ค่าพีเอช 11.2 แล้วทำเป็นผงโดยการฉีดพ่นแห้ง แล้วสกัดสารให้สีด้วยคลอโรฟอร์ม และวิเคราะห์ด้วย TLC พบสารสีหลัก 2 ชนิด ชนิดหนึ่งมีค่า R_f ตรงกับที่สกัดด้วยเอธานอลตัวที่ไม่ใช่ morindone ซึ่งยังไม่ได้วิเคราะห์โครงสร้าง จึงแยกบริสุทธิ์ด้วย preparative TLC และคอลัมน์โครมาโทกราฟีเพื่อวิเคราะห์โครงสร้างต่อไป

ได้ทำการเปรียบเทียบปริมาณการผลิตสารสีกลุ่มแอนทราควิโนนโดยการเลี้ยงกลุ่มเซลล์รากยอป่า เป็นเวลา 3 เดือน และ 5 เดือน โดยทำการสกัดสารสีมาแยกด้วย TLC ชะด้วยคลอโรฟอร์ม : เมทานอล (9/1) และเทียบปริมาณ โดยอาศัยความเข้มของแถบสีที่แยก บนแผ่น TLC โดยใช้เครื่อง densitometer พบว่า เซลล์รากยอป่าที่เลี้ยงเป็นเวลา 5 เดือน จะมีน้ำหนักเซลล์เพิ่มขึ้น 2.6 เท่า และมีการผลิตสารสีเป็น 1.4 เท่า ของกลุ่มเซลล์ที่เลี้ยงเพียง 3 เดือน และเป็น 0.6 เท่า ของที่สกัดจากผงรากพืชที่มีอายุตั้งแต่ 2-3 ปีขึ้นไป ส่วนการเพาะเลี้ยงเซลล์รากในอาหารเหลวที่ 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 °ซ เป็นเวลา 14-30 วัน พบว่าเซลล์รากเจริญช้ามาก มีจำนวนเซลล์ไม่พอที่จะนำมาสกัดเพื่อดูปริมาณการผลิตสี

การเพาะกลุ่มเซลล์รากยอป่านั้นได้ใช้เซลล์รากปลอดเชื้อได้มาจากการเจริญของเมล็ดรากยอป่าบนอาหาร MS การชักนำให้เกิดแคลลัสทำโดยตัดรากออกเป็นชิ้นเล็กๆยาว 2.5 มม. วางชิ้นส่วนลงบนอาหาร MS จนกระทั่งมีกลุ่มเซลล์เกิดขึ้น จึงนำมาเขี่ยเซลล์ลงบนอาหาร Gamborgs' B_5 ที่ 25 °ซ เป็นเวลา 1 เดือน เซลล์รากมีลักษณะเป็นกลุ่มเซลล์ มีสีเหลือง ได้ทำการสกัดสารสีด้วยคลอโรฟอร์มและวิเคราะห์ด้วย TLCพบว่ามีสารให้สีหลัก 2 ชนิดที่มีค่า R_f ใกล้เคียงกับสารให้สีจากรากยอป่าที่สกัดด้วยเอธานอล โดยชนิดหนึ่งเป็น R_f ของ Morindone ส่วนอีกชนิดหนึ่งมีค่า R_f ตรงกับสารให้สีที่สกัดด้วยน้ำด่าง จึงได้ทำการแยกโดย preparative TLC และชะด้วยคลอโรฟอร์ม : เมธานอล (9/1) และโครมาโทกราฟีคอลัมน์และวิเคราะห์โครงสร้างของสารให้สีหลักที่สกัดได้จากทั้ง 2 แหล่ง โดยยูวีวิสิเบิล และอินฟราเรดสเปคโตรสโคปี พบว่าเป็นสาร ชนิดเดียวกัน และจากผลของ UV และ IR spectrum ที่ได้ใกล้เคียงกับสารแอนทราควิโนนที่เป็นกรดแอนทราฟลาวิค (2,6-dihydroxyanthraquinone) ซึ่งได้ทำการยืนยันโครงสร้างทางเคมีโดยการวิเคราะห์ด้วย C^{13} นิวเคลียร์แมกเนติคเรโซแนนซ์ และแมสสเปคโตรสโคปี การสกัดสีจากเซลล์รากยอป่าและแยกด้วย TLC นั้นพบสารให้สี 2 ชนิดเหมือนกับสารให้สีที่แยกได้รากของพืชชนิดนี้ คือ สารสีแดง (มอรินโดน) และสารสีเหลืองซึ่งได้ทำบริสุทธิ์และวิเคราะห์หาโครงสร้างทางเคมีด้วย ^1H, C^{13}-NMR และ mass spectrometry สารสีเหลืองที่พบคือ Alizarin 1-methyl ether

การหาปริมาณสารสีมอรินโดนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงกลุ่มเซลล์ราก ทำโดยนำเซลล์รากยอป่ามาสกัดด้วยคลอโรฟอร์มแยะวิเคราะห์ด้วย HPLC พบสารสีมอรินโดนจากสารสกัดหยาบเท่ากับ 576.5 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์เปียก เมื่อเทียบกับกราฟมาตรฐานมอรินโดน ซึ่งจะใช้ภาวะที่เหมาะสมนี้เพื่อติดตามปริมาณมอรินโดนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงกลุ่มเซลล์รากยอป่า

การแยกสารสีจากครามที่ได้จากผงคราม โดยนำผงครามมาสกัดด้วย DMSO และวิเคราะห์ด้วย HPLC พบสารสีอินดิโก 270 มิลลิกรัมต่อกรัมของผงคราม

การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์หาสารตั้งต้นในการผลิตอินดิโก (อินดิแคน ; indoxyl-β-D-glucoside) จากแคลลัสของใบคราม ทำโดยนำแคลลัสมาสกัดด้วยเมทานอลและหาปริมาณอินดิแคนโดยใช้เทคนิค HPLC ซึ่งจะใช้คอลัมน์ Nucleosil 100-7C18 ตัวชะที่ใช้เป็นเมทานอลที่มี 0.2% TFA และใช้เครื่องตรวจวัดแบบ UV detector ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร การเพาะเลี้ยงกลุ่มเซลล์ เริ่มจากนำใบครามสดที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาด 0.5 x 0.5 ซม. วางบนอาหารวุ้นสูตรปรับปรุง (MMS) ประกอบด้วย 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) และ kinetin ที่ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ไทโรซีน125 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลทราย 30 กรัมต่อลิตร เลี้ยงในที่มืด ที่ 25 °ซ เป็นเวลา 3 สัปดาห์ การใช้เทคนิค HPLC ในการหาปริมาณอินดิแคนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงกลุ่มเซลล์ใบครามสด เทียบกับกราฟมาตรฐานอินดิแคน เป็นวิธีที่ใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อย

Abstract

Title Production and Development of Natural Pigments by Pigmented Plant Cell Cultures for Food and Dyeing Industry

Report by Assoc.Prof.Dr. Suree Phutrakul

Anthraquinone is a group of natural red dye found in the root of *Morinda* sp. which is available in the upper north of Thailand and has been widely used on cotton dying. One alternative to increase the production of natural dye was culturing root cells of *Morinda angustifolia* Roxb. var. *scabridula craib*. Two major components were found in ethanol extracted red pigment from the root of this plant. They were found to be in anthraquinone group by chemical test. The major components of the red pigment were obtained by separation on silica gel column chromatography eluted with a mixture of hexane/chloroform (9:1) by isocratic elution technique. Recrystallization of the major component gave orange needle shape crystals. Structural analysis of the purified major constituent by UV-visible spectroscopy, mass spectroscopy and C^{13}-Nuclear magnetic resonance spectroscopy clearly indicated that the major constituent had chemical formula as $C_{15}H_{10}O_5$ and chemical structure as morindone. Another component was extracted with calcium hydroxide solution pH 11.2 and spray dried to powder which was extracted with chloroform and showed two major spots on TLC, one of which had R_f value the same as the other major component extracted with ethanol apart from morindone. It was then purified by preparative TLC for structural analysis.

The amount of anthraquinone dye produced in the cell culture for 3 and 5 months were compared. Extraction of the pigment from the cultured cells and separated by TLC and eluted with chloroform : methanol (9/1). The density of major band separated by TLC were compared with densitometer. It was found that the cultured root cell for 5 months was increase 2.6 times of root cell weight and the pigment produced was 1.4 times of the cultured cell for 3 months and 0.6 times of the root cell powder in the root of 2-3 years plant. The root cell cultured in shake flask 100 rpm at 25 $^{\circ}C$ for 14 to 30 days grew slowly and gave low yield which was not enough to detect pigment production.

Sterilized root cells were obtained by growing the Morinda seed on MS medium. The roots were cut into 2.5 mm. pieces and grown in fresh MS medium to get callus which was fully proliferated on a modified Gamborgs' B_5 medium at 25 ^{o}C for 1 month. The pigments extracted from the root cells with chloroform gave two major spots on TLC, one spot had R_f value the same as standard morindone and the other had R_f value the same as the pigment purified from the alkali extract. This component then was purified by preparative TLC eluted with chloroform : methanol (9:1) followed by column chromatography. The UV-visible and Infrared spectra of the purified component was exactly the same as the purified component from the alkali extract indicated that they were the same compound which might be anthraflavic acid (2,6-dihydroxy anthraquinone) due to the same IR spectra as the reference data. However, confirmation of the chemical structure of this component by C^{13}-NMR and mass spectroscopy was done . The pigments extracted from root cell culture and gave two components on TLC using the same system as the separation of the pigments from the plant's root. The red was morindone. The yellow was purified, analyzed by H^1,C^{13}-NMR and mass spectrometry and found the chemical structure as an anthraquinone pigment Alizarin 1-methyl ether.

The amount of morindone dye produced in the root cell culture was detected. Extraction of the dye from cultured root cell culture with chloroform and analyzed by HPLC. It was found that the morindone from the extracted cell culture was 576.5 mg/gram of fresh weight in comparison with standard morindone. This method will be used to follow the morindone pigment content in the optimization of anthraquinone production from root cell culture.

Separation of indigo dye from Kharm powder was performed. Extraction of the Kharm powder with DMSO and analyzed by HPLC. Results showed that the indigo dye was 270 mg/gram of Kharm powder compared with standard indigo.

A method to quantify the indigo precursor indican (indoxyl-β-D-glucoside) from callus of *Indigofera tinctoria* Linn. (Kharm) leaf has been developed. Callus was extracted in methanol and indican was identified and quantified using high performance liquid chromatography (HPLC). The indican was separated on a Nucleosil 100-7 C18 column with a methanol containing 0.2% trifluoroacetic acid (TFA) as eluent and

measured with UV detection at 280 nm. The callus was prepared from the fresh leaves of Kharm which were cut into 0.5 x 0.5 cm pieces. Sterilized leaves were grown on modified Murashige and Skoog agar medium (MMS) supplemented with 4 mgl^{-1} 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and kinetin, 125 mgl^{-1} tyrosine and 30 gl^{-1} sucrose. The plant cell was cultured at 25°C in the dark condition for three weeks. Using the HPLC technique, callus indican content was quantified by comparing with standard indican. Results showed that with this method it is possible to measure indican content in a short time.