JPAGS
Journal of Physics & General Science

ผลของอัตราส่วนระหว่างตัวอย่างกับตัวทำละลายต่อคุณภาพและเวลาการเก็บรักษาของสีย้อมโครโมโซมที่สกัดจากผลเถาคัน

Effect of Solid-to-Solvent Ratio on Efficiency and Shelf Life of the Chromosome Staining Dye Extracted from Fox Grape (*Causonis trifolia* (L.) Mabb. & J. Wen) Fruits

อรนุช สุขอนันต์* และสุไวดา สัสดี

Oranut Sukanan* and Suwaida Sussadee

สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา จังหวัดสงขลา

Program in Biology, Faculty of Science and Technology, Songkhla Rajabhat University, Songkhla

*Corresponding author e-mail: oranut.su@skru.ac.th

(Received: May 13, 2024, Revised: July 10, 2024, Accepted: July 27, 2024)

บทคัดย่อ

งานวิจัยครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์ เพื่อสกัดสีย้อมธรรมชาติจากผลเถาคัน โดยทดแทนการใช้อะซิโตคาร์มีนที่มีราคาแพง ทำการสกัดสีย้อม โดยใช้กรดอะซิติกเข้มข้นเป็นตัวทำละลายในอัตราส่วนของตัวอย่างต่อตัวทำละลาย 1:1, 1:3 และ 1:5 (กรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น จึงเก็บสีย้อมที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำสีย้อมที่มีอายุเก็บรักษา 0, 7, 14, 21 และ 28 วัน ทดสอบประสิทธิภาพของการย้อมโครโมโซมและวัดปริมาณแอนโทไซยานิน ด้วยวิธีเทคนิคพีเอชดิฟเฟอเรนเชียล ผลจากการวิจัยพบว่า สีย้อมที่สกัดด้วยอัตราส่วน 1:1 สามารถย้อมติดสีโครโมโซมได้ดีที่สุดและมีปริมาณแอนโทไซยานินสูงสุด รองลงมา คือ อัตราส่วน 1:3 และ 1:5 ตามลำดับ สีย้อมที่สกัดได้จากอัตราส่วนเหล่านี้สามารถย้อมติดสีโครโมโซมได้ใกล้เคียงกับสีอะซิโตคาร์มีน และสามารถคงคุณภาพของสีย้อม โดยการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสได้อย่างน้อย 28 วัน ดังนั้น อัตราส่วนของตัวอย่างต่อตัวทำละลาย 1:1 เป็นอัตราส่วนที่ดีที่สุดในการสกัดสีย้อมโครโมโซมจากผลเถาคัน สามารถใช้ทดแทนสีอะซิโตคาร์มีนได้

คำสำคัญ: ผลเถาคัน อะซิโตคาร์มีน สีย้อมโครโมโซม แอนโทไซยานิน เทคนิคพีเอชดิฟเฟอเรนเชียล

ABSTRACT

The objective of this research is to extract natural dyes from the fruit of grape, *Causonis trifolia* (L.) Mabb. & J. Wen, with the aim of replacing the use of expensive acetocarmine. Concentrated acetic acid was used as the solvent at sample-to-solvent ratios of 1:1, 1:3, and 1:5 (g/ml) for a duration of 24 hours. The extracted dyes were subsequently stored at 4 °C for further analysis. Dyes with varying shelf lives of 0, 7, 14, 21, and 28 days were subjected to tests assessing chromosome staining efficiency and anthocyanin content using the pH differential technique. The research findings indicated that the natural dye extracted at a 1:1 ratio exhibited the best chromosome staining and the highest anthocyanin content, with effectiveness decreasing for the 1:3 and 1:5 ratios, respectively. Notably, the dye extracted at the 1:1 ratio demonstrated chromosome staining capabilities comparable to those of acetocarmine. Furthermore, the quality of the dye was maintained for at least 28 days when stored at 4 °C. Therefore, the 1:1 ratio proved to be the most effective for extracting chromosomal dyes from fox grape fruits, establishing it as a viable substitute for acetocarmine.

Keywords: fox grape fruits, acetocarmine, chromosome staining dye, anthocyanin, pH differential technique

บทนำ

สีย้อมเป็นสารเคมีสำคัญสำหรับใช้ศึกษาโครโมโซมของสิ่งมีชีวิตยูแคริโอต อะซิโตคาร์มีน (acetocarmine) เป็นสีย้อมโครโมโซมชนิดหนึ่งที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการของสถานศึกษา เพราะสามารถย้อมติดโครโมโซมได้ดี มีความคงทน และสะดวกในการใช้งาน [1] อย่างไรก็ตาม การเตรียมสีย้อมชนิดนี้ต้องใช้อะซิโตคาร์มีน ซึ่งเป็นสีสังเคราะห์ที่สั่งซื้อและนำเข้ามาจากต่างประเทศ [2] ทำให้สถานศึกษาขนาดเล็กที่มีงบประมาณน้อย ไม่สามารถจัดหาสีย้อมเพื่อใช้ในการเรียนการสอนได้ ส่งผลให้ผู้เรียนขาดทักษะปฏิบัติในการย้อมโครโมโซม ดังนั้น การสกัดสีย้อมจากพืชในท้องถิ่นมาทดแทนการใช้สีอะซิโตคาร์มีนสามารถแก้ไขปัญหาดังกล่าว และเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับพืชในท้องถิ่น [3]

แอนโทไซยานิน (anthocyanin) เป็นรงควัตถุในกลุ่มของฟลาโวนอยด์ (flavonoid) ที่ให้สี มีคุณสมบัติละลายน้ำได้ พบในแวคิวโอลของเซลล์ในเนื้อเยื่อของใบ ดอก ผล ลำต้น และราก [4-5] สารประกอบกลุ่มแอนโทไซยานินมีมากกว่า 700 ชนิด แต่มีเพียง 6 ชนิดที่พบทั่วไปในธรรมชาติ มีรายงานว่า 50 เปอร์เซ็นต์ของแอนโทไซยานินที่พบในผักและผลไม้เป็นไซยานิดิน (cyanidin) สำหรับเพลาโกนิดิน (pelargonidin) เดลฟินิดิน (delphinine) และเพทุนิดิน (petunidin) พบได้ 12 เปอร์เซ็นต์ และอีกสองชนิด คือ พีโอนิดิน (peonidin) และมอลวิดิน (malvidin) พบได้ 7 เปอร์เซ็นต์ [5] สีของแอนโทไซยานินมีความสัมพันธ์กับสภาวะความเป็นกรด-ด่าง ซึ่งในสภาวะเป็นกรดเป็นสีแดง สภาวะเป็นกลางมีสีม่วง และสภาวะเป็นเบสให้สีน้ำเงิน จึงนำหลักการวัดค่าดูดกลืนแสงในสภาวะที่เป็นกรด-ด่างมาใช้เป็นวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณแอนโทไซยานิน เรียกว่า พีเอชดิฟเฟอเรนเชียล (pH differential) ซึ่งเป็นวิธีการหนึ่งที่ได้รับการยอมรับตามมาตรฐานสากล [6] สำหรับการสกัดแอนโทไซยานินจากพืชมีหลายวิธีการ การสกัดโดยใช้ตัวทำละลายเป็นวิธีการที่ง่ายที่สุด [4] ตัวทำละลายที่ใช้สกัดเป็นสารละลายที่มีขั้ว เช่น เมทานอล เอทานอล น้ำ และแอซิโตน นอกจากนี้ การสกัดโดยใช้สารละลายที่มีสภาวะเป็นกรด ช่วยให้เกิดเสถียรภาพของไอออนฟลาไวเลียม (flavylium ion) ที่อยู่ในโครงสร้างของแอนโทไซยานิน [7] จากคุณสมบัติของแอนโทไซยานินที่เป็นสารให้สีตามธรรมชาติ รวมถึงเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ทำให้แอนโทไซยานินถูกนำมาใช้ประโยชน์ทางด้านอาหาร ผลิตภัณฑ์สุขภาพ เครื่องสำอาง ยา และอุตสาหกรรมเคมี [8] การเกิดโคพิกเมนต์เทชัน (copigmentation) ระหว่างไอออน-ฟลาไวเลียมที่มีประจุบวกของแอนโทไซยานินกับกลุ่มฟอสเฟตของดีเอ็นเอ นอกจากทำให้ดีเอ็นเอมีความเสถียรและช่วยป้องกันอันตรายจากอนุมูลอิสระแล้ว [9-10] ปฏิกิริยานี้ ยังทำให้แอนโทไซยานินย้อมติดโครโมโซมได้ จากการศึกษาพบว่า แอนโทไซยานินที่สกัดจากพืชหลายชนิด สามารถย้อมโครโมโซมได้ใกล้เคียงกับสีสังเคราะห์ เช่น สีย้อมจากข้าวเหนียวดำที่สกัดด้วยกรดอะซิติกเข้มข้น 99.8 เปอร์เซ็นต์ [11] สีย้อมจากผลหม่อนแช่แข็งที่สกัดด้วยเมทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ [2] สีย้อมจากข้าวโพดหวานสีม่วงที่สกัดด้วยน้ำกลั่น [12] สีย้อมจากผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ [13] สีย้อมจากเปลือกมังคุดที่สกัดด้วยกรดอะซิติก 45 เปอร์เซ็นต์ [14] สีย้อมจากข้าวเหนียวดำแม่จันพันธุ์ดีที่สกัดด้วยเอทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ [15] สีย้อมจากกะหล่ำปลีม่วงที่สกัดด้วยกรดไฮโดรคลอริก 20 เปอร์เซ็นต์ [16] สีย้อมจากแก่นฝางที่สกัดด้วยเมทานอล 70 เปอร์เซ็นต์แล้วเติมคอปเปอร์ซัลเฟต [17]

เถาคัน *(Causonis trifolia* (L.) Mabb. & J.Wen) [18] เป็นไม้เถาเลื้อยในวงศ์ Vitaceae พบการแพร่กระจายพันธุ์ในออสเตรเลีย จีน อินเดีย อินโดนีเซีย มาเลเซีย เนปาล ฟิลิปปินส์ เวียดนาม และไทย [19] เถาคันเป็นพืชที่พบได้ทั่วไปในประเทศไทย สามารถเจริญเติบได้ดีในพื้นที่เปิดโล่งหรือบริเวณขอบป่า ใบและรากใช้เป็นยาลดไข้ เถาเป็นยาขับเสมหะ ใบใช้รักษาอาการเลือดออกตามไรฟัน ยอดอ่อนใช้แกงเลียง [20] ผลอ่อนสีเขียวใช้เพิ่มรสเปรี้ยวในแกงส้ม [21] ผลสุกสีม่วงดำมีรสหวานใช้หมักเป็นไวน์ [22] พบแอนโทไซยานินในผลสุกของเถาคัน ซึ่งให้สีที่เปลี่ยนแปลงไปตามความเป็นกรด-ด่าง สามารถใช้เป็นอินดิเคเตอร์ได้ [23] เนื่องจากผลสุกเป็นส่วนที่นำมาใช้ประโยชน์น้อย ดังนั้น ผู้วิจัยจึงสนใจสกัดสีย้อมจาก

ผลสุกของเถาคัน เพื่อพัฒนาเป็นสีย้อมโครโมโซมและทดแทนการใช้สีสังเคราะห์ที่มีราคาแพง นอกจากนี้ ยังเป็นการส่งเสริมการใช้ประโยชน์จากพืชในท้องถิ่นอีกด้วย

วัตถุประสงค์

1. เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสีย้อมโครโมโซมที่สกัดจากผลสุกของเถาคัน โดยใช้อัตราส่วนของตัวอย่างต่อตัวทำละลายแตกต่างกัน

2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของระยะเวลาการเก็บรักษาสีย้อมโครโมโซมที่สกัดจากผลสุกของเถาคัน โดยใช้อัตราส่วนของตัวอย่างต่อตัวทำละลายแตกต่างกัน

การดำเนินงานวิจัย

1. เปรียบเทียบประสิทธิภาพของสีย้อมโครโมโซมที่สกัดจากผลสุกของเถาคัน โดยใช้อัตราส่วนของตัวอย่างต่อตัวทำละลายแตกต่างกัน เริ่มจากเก็บตัวอย่างผลสุกของเถาคันจากอำเภอสิงหนคร จังหวัดสงขลา ล้างน้ำให้สะอาด ผึ่งลมให้แห้ง แล้วนำมาสกัดเป็นสีย้อมโครโมโซม โดยใช้กรดอะซิติก 99.8 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวทำละลายในอัตราส่วนของตัวอย่างต่อตัวทำละลายเป็น 1:1, 1:3 และ 1:5 (กรัมต่อมิลลิลิตร) สกัดแช่ที่อุณหภูมิห้อง (26 ± 2 องศาเซลเซียล) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กรองสีที่สกัดได้ผ่านกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 แล้วนำมาย้อมโครโมโซมของเซลล์ปลายรากหอมแดง (*Allium ascalonicum* L.) ที่ผ่านการแช่ในน้ำยาคงสภาพ (Farmer's solution) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเก็บรักษาในเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ด้วยเทคนิคการบดขยี้ (squash technique) [24] จำนวน 10 สไลด์ต่อสีย้อมที่สกัดได้ในแต่ละอัตราส่วน นำสไลด์ที่ย้อมไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ (รุ่น ECLIPSE Ci ยี่ห้อ Nikon พร้อมกล้องถ่ายภาพดิจิตอลเฉพาะทาง รุ่น MDX 1003 ยี่ห้อ LANOPTIK) ที่กำลังขยายของภาพ 400 เท่า เพื่อเลือกสไลด์ที่ย้อมติดโครโมโซมในระยะเมทาเฟสชัดเจนที่สุด จำนวน 5 สไลด์ต่อสีย้อมที่สกัดได้ในแต่ละอัตราส่วน เปรียบเทียบประสิทธิภาพของสีย้อมที่สกัดด้วยตัวทำละลายในอัตราส่วนต่าง ๆ กับสีอะซิโตคาร์มีนเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ สังเกตการติดสีของโครโมโซมและไซโทพลาซึม แต่ละสไลด์เลือกระยะเมทาเฟส 1 ภาพ เพื่อให้คะแนนการติดสีตามเกณฑ์การย้อมด้วยสีอะซิโตคาร์มีน ซึ่งดัดแปลงโดยเนรัฐชลา สุวรรณคนธ์ และคณะ [1] และถ่ายภาพ สำหรับเกณฑ์การให้คะแนนการย้อมสี [1] มีดังนี้

4 คะแนน หมายถึง ติดสีโครโมโซมชัดเจน ติดสีไซโทพลาซึมจาง

3 คะแนน หมายถึง ติดสีโครโมโซมชัดเจน ติดสีไซโทพลาซึมเข้ม

2 คะแนน หมายถึง ติดสีโครโมโซมค่อนข้างชัดเจน

1 คะแนน หมายถึง ติดสีโครโมโซมไม่ชัดเจน

0 คะแนน หมายถึง ไม่ติดสีโครโมโซม ไม่ติดสีไซโทพลาซึม

2. ศึกษาประสิทธิภาพของระยะเวลาการเก็บรักษาสีย้อมโครโมโซมที่สกัดจากผลสุกของเถาคัน โดยใช้อัตราส่วนของตัวอย่างต่อตัวทำละลายแตกต่างกัน โดยเก็บรักษาสีย้อมที่สกัดได้จากการทดลองในข้อ 1 ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำสีย้อมที่เก็บรักษาที่ 0, 7, 14, 21 และ 28 วัน ไปศึกษาผลของเวลาในการเก็บรักษาที่มีต่อคุณภาพของสีย้อมที่สกัดได้ ดังนี้

2.1 วัดปริมาณแอนโทไซยานินของสีย้อมที่เก็บรักษาไว้ในแต่ละช่วงเวลา โดยใช้วิธีเทคนิคพีเอชดิฟเฟอเรนเชียลตามวิธีการของสุภาพร ฟักเงิน และศิรประภา มีรอด [6] ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (รุ่น EVOLUTION 201 ยี่ห้อ Thermo Scientific) แต่ละขั้นตอนทำ 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวนด้วย one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรม SPSS เวอร์ชั่น 29

2.2 นำสีย้อมที่สกัดโดยใช้อัตราส่วนของตัวอย่างต่อตัวทำละลายแตกต่างกันและเก็บรักษาในตู้เย็นด้วยเวลาต่างกัน มาย้อมโครโมโซมเซลล์ปลายรากหอม โดยเตรียมสไลด์ บันทึกผล และถ่ายภาพ ดังที่กล่าวไว้ในการทดลองข้อที่ 1 จากนั้น นำคะแนนการย้อมสีไปวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วย one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรม SPSS เวอร์ชั่น 29

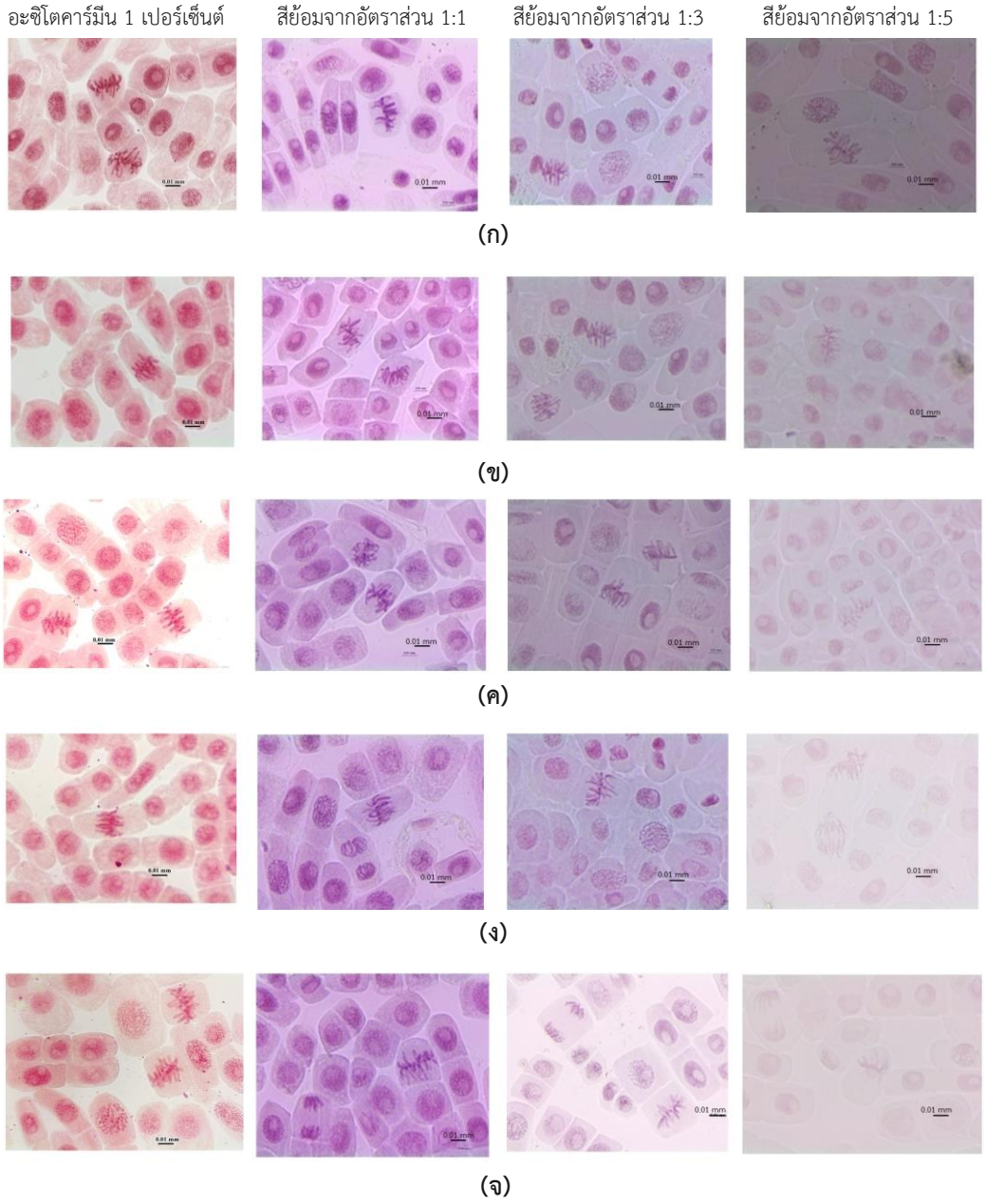
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

เมื่อย้อมโครโมโซมของเซลล์ปลายรากหอมด้วยสีย้อมที่สกัดได้ในแต่ละอัตราส่วนของตัวอย่างต่อตัวทำละลาย พบว่า สีที่สกัดได้ทุกอัตราส่วนสามารถย้อมติดสีโครโมโซมและเห็นระยะต่าง ๆ ของไมโทซีสได้ แต่เมื่อเปรียบเทียบคุณภาพของสีย้อมที่สกัดได้กับการย้อมโครโมโซมด้วยสีอะซิโตคาร์มีน พบว่า สีย้อมที่สกัดได้จากอัตราส่วน 1:1 ย้อมติดสีโครโมโซมระยะเมทาเฟสดีที่สุด และเห็นโครโมโซมเป็นสีม่วงชัดเจน ไซโทพลาซึมติดสีม่วงจาง ดูภาพที่ 1 (ก) และมีคะแนนติดสีสูงสุด คือ 4 ± 0.00 รองลงมา คือ สีย้อมที่สกัดได้จากส่วนอัตราส่วน 1:3 และ 1:5 ที่มีคะแนนการย้อมสีเท่ากัน คือ 2 ± 0.00 (ตารางที่ 1) แสดงให้เห็นว่า สีย้อมที่สกัดได้จากเถาคันโดยใช้อัตราส่วนของตัวอย่างต่อตัวทำละลายที่ 1:1 เป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมสำหรับใช้สกัดสีย้อมโครโมโซม สอดคล้องกับงานวิจัยของวันเพ็ญ แก้วพุก [25] ซึ่งทำการสกัดสีย้อมโครโมโซมจากดอกกระเจี๊ยบแดงด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วนของตัวอย่างต่อตัวทำละลายที่ 1:2, 1:4, 1:6 และ 1:8 (กรัมต่อมิลลิลิตร) ผลจากการย้อมโครโมโซม พบว่าอัตราส่วน 1:2 มีประสิทธิภาพการย้อมติดสีของโครโมโซมดีที่สุด เนื่องจากเป็นอัตราส่วนที่ใช้ตัวทำละลายน้อยกว่าและสีย้อมที่สกัดได้มีความเข้มของสีมากกว่าอัตราส่วนอื่น จึงทำให้สีย้อมโครโมโซมจากดอกกระเจี๊ยบแดงที่สกัดจากอัตราส่วน 1:2 ย้อมติดสีโครโมโซมได้ดีที่สุด นอกจากนี้ เมื่อพิจารณาปริมาณแอนโทไซยานินที่พบในสีย้อมที่สกัดได้จากผลเถาคันทั้งสามอัตราส่วนที่มีเวลาเก็บรักษา 0 วัน (ตารางที่ 2) พบว่า สีย้อมที่สกัดได้จากอัตราส่วน 1:1 มีปริมาณแอนโทไซยานินมากที่สุด จึงทำให้มีคะแนนการย้อมติดสีโครโมโซมสูงกว่าอัตราส่วน 1:3 และ 1:5 (ตารางที่ 1)

การนำสีย้อมที่สกัดได้มาเก็บรักษาในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 7, 14, 21 และ 28 วัน ไปตรวจปริมาณของแอนโทไซยานิน พบว่า เมื่อเวลาเก็บรักษาสีย้อมเพิ่มขึ้น ทำให้แอนโทไซยานินของสีย้อมที่สกัดได้ทุกอัตราส่วนมีปริมาณลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ยกเว้น สีย้อมที่สกัดได้จากอัตราส่วน 1:1 ที่เวลาเก็บรักษา 0 วัน และ 7 วัน มีปริมาณแอนโทไซยานินไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 2) การลดลงของปริมาณแอนโทไซยานินเมื่อมีเวลาเก็บรักษาเพิ่มขึ้น สอดคล้องกับงานวิจัย [26] ซึ่งได้ศึกษาปริมาณแอนโทไซยานินของมันเทศสีม่วง มะเขือยาวสีม่วง และกะหล่ำปลีสีม่วง ซึ่งเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง อุณหภูมิ 10 และ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน พบว่า ผักสีม่วงทั้งสามชนิดที่เก็บรักษาในอุณหภูมิต่าง ๆ มีปริมาณแอนโทไซยานินลดลง เมื่อเวลาเก็บรักษาเพิ่มขึ้น แต่อุณหภูมิ 10 และ 15 องศาเซลเซียสนั้น มีแอนโทไซยานินลดลงน้อยกว่าอุณหภูมิห้อง และสอดคล้องกับงานวิจัยใน [24] พบว่า เมื่อเพิ่มเวลาการเก็บรักษาสีย้อมจากผลก้างปลาแดงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำให้ปริมาณแอนโทไซยานินลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เนื่องจากอุณหภูมิมีผลต่อความคงตัวของแอนโทไซยานิน [5] ดังนั้น งานวิจัยนี้ จึงใช้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียล เพื่อเก็บรักษาสีย้อมที่สกัดได้จากผลเถาคันทุกอัตราส่วนและสีอะซิโตคาร์มีน ซึ่งอุณหภูมิดังกล่าว ใช้เก็บรักษาสีย้อมโครโมโซมในงานวิจัยที่ศึกษาคุณภาพของสีย้อมที่สกัดได้จากพืช และมีรายงานว่าสามารถชะลอการลดลงของปริมาณแอนโทไซยานิน ทำให้สีย้อมที่สกัดได้มีเวลาการเก็บรักษาได้ยาวนาน [1-2, 13, 24] รวมถึงการบรรจุสีย้อมในขวดสีชา เพื่อป้องกันแอนโทไซยานินในสีย้อมจากแสง ซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อความคงตัวของแอนโทไซยานิน [5] อย่างไรก็ตาม ปริมาณแอนโทไซยานินที่พบในสีย้อมที่สกัดได้ทุกอัตราส่วนยังคงลดลง เมื่อเวลาการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น อาจเป็นเพราะปฏิกิริยาการสลายตัวของแอนโทไซยานินแปรผันตามเวลา จึงทำให้แอนโทไซยานินที่พบในสีย้อมลดลงตามเวลาที่ใช้เก็บรักษา [27]

ผลการย้อมโครโมโซมด้วยสีย้อมที่สกัดได้ทั้งสามอัตราส่วนที่มีเวลาเก็บรักษา 0, 7, 14, 21 และ 28 วัน (ภาพที่ 1) พบว่า ทุกช่วงเวลาของการเก็บรักษาสีย้อมที่สกัดจากอัตราส่วน 1:1 มีคะแนนการย้อมสีมากที่สุด และคะแนนการย้อมสีที่ได้จาก

ช่วงเวลาที่ใช้เก็บรักษาต่าง ๆ มีคะแนนการย้อมสีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) (ตารางที่ 1) อาจเป็นเพราะอัตราส่วน 1:1 สามารถสกัดสีย้อมที่มีปริมาณแอนโทไซยานินมากกว่าอัตราส่วน 1:3 และ 1:5 (ตารางที่ 2) ดังนั้น การลดลงของปริมาณแอนโทไซยานินในสีย้อมที่สกัดได้จากอัตราส่วน 1:1 ตามเวลาการเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้น จึงไม่มีผลต่อการย้อมติดสีโครโมโซม ส่วนสีย้อมที่สกัดจากอัตราส่วน 1:3 ที่มีเวลาเก็บรักษาระหว่าง 0-21 วัน มีคะแนนการย้อมติดสีเท่ากับสีย้อมที่สกัดจากอัตราส่วน 1:5 ที่มีเวลาการเก็บรักษา 0 และ 7 วัน คือ 2±0.00 ดังตารางที่ 1



ภาพที่ 1 เซลล์ปลายรากหอมที่ย้อมด้วยสีซึ่งสกัดจากผลเถาคัน โดยใช้อัตราส่วนของตัวอย่างต่อตัวทำละลายต่าง ๆ เปรียบเทียบกับสีอะซิโตคาร์มีนเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ด้วยเวลาการเก็บรักษา (ก) 0 วัน (ข) 7 วัน (ค) 14 วัน (ง) 21 วัน และ (จ) 28 วัน ด้วยอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียล

ตารางที่ 1 คะแนนการย้อมสีโครโมโซมของเซลล์ปลายรากหอมด้วยสีย้อมที่สกัดได้จากอัตราส่วนของตัวอย่างต่อตัวทำละลาย 1:1, 1:3 และ 1:5 (กรัมต่อมิลลิลิตร) ที่ผ่านการเก็บรักษาในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 7, 14, 21 และ 28 วัน

เวลาของการเก็บรักษาสีย้อมที่สกัดได้ (วัน)	คะแนนการย้อมสีโครโมโซม*		
	อัตราส่วนของตัวอย่างต่อตัวทำละลาย 1:1	อัตราส่วนของตัวอย่างต่อตัวทำละลาย 1:3	อัตราส่วนของตัวอย่างต่อตัวทำละลาย 1:5
ชุดควบคุม**	4.00±0.00^{aA}	4.00±0.00^{aA}	4.00±0.00^{aA}
0	4.00±0.00^{aA}	2.00±0.00^{bB}	2.00±0.00^{bB}
7	3.66±0.54^{aA}	2.00±0.00^{bB}	2.00±0.00^{bB}
14	4.00±0.00^{aA}	2.00±0.00^{bB}	1.00±0.00^{cC}
21	4.00±0.00^{aA}	2.00±0.00^{bB}	1.00±0.00^{cC}
28	4.00±0.00^{aA}	1.00±0.00^{cB}	1.00±0.00^{cB}

หมายเหตุ * อ้างอิงเกณฑ์การให้คะแนนการย้อมสีอะซิโตคาร์มีนตามการดัดแปลงของเนรัฐชลา สุวรรณคนธ์และคณะ [1]
**ชุดควบคุม คือ สีอะซิโตคาร์มีน
ตัวอักษร a b c ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
ตัวอักษร A B C ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางที่ 2 ปริมาณแอนโทไซยานินของสีย้อมที่สกัดได้จากอัตราส่วนของตัวอย่างต่อตัวทำละลาย 1:1, 1:3 และ 1:5 (กรัมต่อมิลลิลิตร) ที่ผ่านการเก็บรักษาในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 7, 14, 21 และ 28 วัน

เวลาของการเก็บรักษาสีย้อมที่สกัดได้ (วัน)	ปริมาณแอนโทไซยานิน (มิลลิกรัม/ลิตร)		
	อัตราส่วนของตัวอย่างต่อตัวทำละลาย 1:1	อัตราส่วนของตัวอย่างต่อตัวทำละลาย 1:3	อัตราส่วนของตัวอย่างต่อตัวทำละลาย 1:5
0	1511.80±6.95^{aA}	961.85±3.34^{aB}	715.82±10.20^{aC}
7	1500.56±2.03^{aA}	925.12±20.85^{bB}	624.42±12.18^{bC}
14	1433.87±5.10^{bA}	824.14±5.55^{cB}	514.32±3.34^{cC}
21	1293.60±5.10^{cA}	792.64±6.95^{dB}	451.98±6.95^{dC}
28	1270.23±10.20^{dA}	679.08±27.20^{eB}	413.02±13.90^{eC}

หมายเหตุ ตัวอักษร a b c d e ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
ตัวอักษร A B C ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

สรุปผลการวิจัย

สีย้อมที่สกัดได้จากอัตราส่วนของตัวอย่างต่อตัวทำละลาย 1:1 ที่มีเวลาการเก็บรักษา 0 วัน มีคะแนนการย้อมสีโครโมโซมมากที่สุด และสามารถย้อมติดสีโครโมโซมได้อย่างชัดเจนกว่าอัตราส่วน 1:3 และ 1:5 เมื่อนำสีย้อมที่สกัดได้ทั้งสามอัตราส่วนไปเก็บรักษาในตู้เย็น ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำมาวิเคราะห์หาปริมาณแอนโทไซยานินและย้อมโครโมโซม พบว่า สีย้อมทั้งสามอัตราส่วนมีปริมาณแอนโทไซยานินลดลง เมื่อมีเวลาการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ สีย้อมที่สกัดได้จากอัตราส่วน 1:1 มีคะแนนการย้อมติดสีมากที่สุดทุกช่วงเวลาการเก็บรักษา จึงสรุปได้ว่า สีย้อมจากผลสุกเถาคันที่สกัดได้อัตราส่วน 1:1 สามารถใช้ทดแทนสีอะซิโตคาร์มีนได้

ข้อเสนอแนะ

ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในขั้นตอนของการสกัดสีย้อมโครโมโซมจากเถาคัน เช่น ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของตัวทำละลาย เวลาที่ใช้สกัดสีย้อม รวมถึงการวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของสีที่สกัดได้จากอัตราส่วนต่าง ๆ และการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่างที่เกิดขึ้นในระหว่างการเก็บรักษา การศึกษาเกี่ยวกับความคงตัวของสีย้อมที่สกัดได้ การวิเคราะห์โครงสร้างของแอนโทไซยานินที่พบในผลสุกของเถาคัน

การนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

งานวิจัยนี้เป็นแนวทางในการเตรียมสีย้อมโครโมโซมที่มีราคาถูกจากพืชที่มีอยู่ในท้องถิ่น เพื่อใช้ทดแทนสีสังเคราะห์ เช่น อะซิโตคาร์มีนที่มีราคาแพง สามารถแก้ไขปัญหาให้กับสถานศึกษาขนาดเล็กที่ไม่มีงบซื้อสีย้อมได้ และช่วยส่งเสริมให้มีการใช้พืชที่มีอยู่ในท้องถิ่นมาใช้ประโยชน์

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณกองทุนวิจัย มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา ที่สนับสนุนทุนในการวิจัยครั้งนี้ และขอขอบคุณ ดร.เบญจวรรณ ยันต์วิเศษภักดี และ ดร.นุชจรินทร์ เพชรเกลี้ยง อาจารย์ประจำหลักสูตรวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา ที่ให้คำปรึกษาและคำแนะนำในการจัดทำงานวิจัยนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

[1] เนรัฐชลา สุวรรณคนธ์, กรรณิกา ทองพูล, ศิริพร ไล่เขีย, สิริมา เก้าหลิม และเสาวลักษณ์ บุญมา, “การเตรียมสีธรรมชาติอย่างง่ายจากผลสุกมะม่วงหาวมะนาวโห่สำหรับการย้อมโครโมโซมพืช,” *วารสารนเรศวรพะเยา*, ปีที่ 15, ฉ. 1, น. 1-10, 2563.

[2] ณัฐพงศ์ คุ้นเคย, ศรีจันทรา ไทยอุดม และธีรารัตน์ แช่มชัยพร, “การพัฒนาสีย้อมจากผลมัลเบอร์รี่ (*Morus alba* L.) สำหรับย้อมสีโครโมโซมจากปลายรากหอม,” ใน *การประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยราชภัฏ*นครปฐม *ครั้งที่ 14*, นครปฐม, 2565, น. 93-99.

[3] วีรนุช วอนเก่าน้อย, พันธิวา แก้วมาตย์, อลงกลด แทนออมทอง และพรณรงค์ สิริปิยะสิงห์, “การคัดเลือกสารสีสกัดจากธรรมชาติในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยเพื่อใช้เป็นสีย้อมโครโมโซม,” *วารสารวิจัยเพื่อพัฒนาสังคมและชุมชน มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม*, ปีที่ 2, ฉ. 1, น. 42-52, 2558.

[4] S. Silva, E. M. Costa, C. Calhau, R. M. Morais and M. E. Pintado, “Anthocyanin extraction from plant tissues: A review,” *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 57, no. 14, pp. 3072–308, 2017.

[5] B. Enaru, G. Dretcanu, T. D. Pop, A. Stânilâ and Z. Diaconeasa, “Anthocyanins: Factors affecting their stability and degradation,” *Antioxidants,* vol. 10, no. 12, pp. 1-24, 2021.

[6] สุภาพร ฟักเงิน และศิรประภา มีรอด, “การสกัดแยกหาปริมาณแอนโทไซยานินจากลูกมะม่วงหาวมะนาวโห่,” ใน *การประชุมวิชาการระดับชาติ สถาบันวิจัย มหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชร ครั้งที่ 4*, กำแพงเพชร, 2560, น. 1002-1011.

[7] N. Tena and A. G. Asuero, “Up-to-date analysis of the extraction methods for anthocyanins: Principles of the techniques, optimization, technical progress, and industrial application,” *Antioxidants*, vol. 11, no. 2, pp. 1-40, 2022.

[8] J. Tan, Y. Han, B. Han, X. Qi, X. Cai, S. Ge and H. Xue, “Extraction and purification of anthocyanins: A review,” *Journal of Agriculture and Food Research*, vol. 8, 100306, pp. 1-7, 2022.

[9] A. D. Sarma and R. Sharma, "Anthocyanin-DNA copigmentation complex: Mutual protection against oxidative damage," *Phytochemistry*, vol. 52, no. 7, pp. 1313-1318, 1999.

[10] J.-M. Kong, L.-S. Chia, N.-K. Goh, T.-F. Chia and R. Brouillard, "Analysis and biological activities of anthocyanins," *Phytochemistry*, vol. 64, no. 4, pp. 923-933, 2003.

[11] หัทยา กาวีวงศ์ และวิไล ชัยสมภาร, "การเตรียมสีย้อมโครโมโซมสำหรับการเรียนการสอนจากพืชท้องถิ่นไทย," *วารสารวิทยาศาสตร์*, ปีที่ 57, ฉ. 1, น. 35-39, 2546.

[12] รุจิรา ทองศรีสุข, ยอดชาย ช่วยเงิน, อลงกลด แทนออมทอง และสายัญ พันธ์สมบูรณ์, "การประยุกต์ใช้สีธรรมชาติข้าวโพดหวานสีม่วง (*Zea mayssaccharata*) ในการศึกษาการแบ่งเซลล์ไมโทซิสของพืช," *วารสารวิทยาศาสตร์ คชสาส์น*, ปีที่ 39, ฉ. 2, น. 34-44, 2560.

[13] จิดาภา บุญพันธ์, อิสรีย์ ปั้นก้อง และธีรารัตน์ แช่มชัยพร, "การสกัดสีธรรมชาติจากพืชกลุ่มแอนโทยานิน เพื่อใช้ในการย้อมสีโครโมโซมจากปลายรากหอม," ใน *การประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม ครั้งที่* 11, นครปฐม, 2562, น. 28-33.

[14] อรญา สมบูรณ์, จารุวัตร จันทร์ประดิษฐ์ และอรุณรัศมิ์ วณิชชานนท์, "สีสกัดจากเปลือกมังคุด (*Garcinia mangostana* Linn.) เพื่อย้อมโครโมโซม," ใน *การประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยทักษิณ ครั้งที่ 29*, พัทลุง, 2562, น. 877-882.

[15] ศิริรัตน์ พักปากน้ำ, น้ำฝน วรรณศิริ และมนัสวี เดชกล้า, "การพัฒนาสีย้อมโครโมโซมจากสารสกัดข้าวเหนียวดำ (*Oryza sativa* var. indica)," *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา*, ปีที่ 26, ฉ. 2, น. 1096-1108, 2564.

[16] ธวัชชัย วัดนครใหญ่, ธันย์ชนก เจตนเสน และธีรารัตน์ แช่มชัยพร, "การประยุกต์ใช้สีจากกะหล่ำปลีม่วง (*Brassica oleracea* var. *rubra*) เพื่อใช้ในการย้อมเนื้อเยื่อลำต้นหมอน้อยและโครโมโซมจากปลายรากหอม," ใน *การประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม ครั้งที่* 14, นครปฐม, 2565, น. 80-86.

[17] ลัดดาวัลย์ กงพลี, "การประยุกต์ใช้สีย้อมธรรมชาติจากสารสกัดแก่นฝาง (*Biancaea sappan* (L.) Tod.) สำหรับย้อมสีโครโมโซม," *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา*, ปีที่ 7, ฉ. 3, น. 37-45, 2565.

[18] B. R. Jackes, "Transfer of three species of *Cayratia* Juss., to *Causonis* Raf. (Vitaceae)," *TELOPEA Journal of Plant Systematics*, vol. 10, no. 2, pp. 319-322, 2020.

[19] Parmar, V. C. Dang, R. N. Rabarijaona, Z. D. Chen, B. R. Jackes, R. L. Barrett, Z. Z. Zhang, Y. T. Niu, A. Trias-Blasi, J. Wen and L. M. Lu, "Phylogeny, character evolution and taxonomic revision of *Causonis*, a segregate genus from *Cayratia* (Vitaceae)," *Taxon*, vol. 70, no. 6, pp. 1188-1218, 2021.

[20] สราวุธ สังข์แก้ว, "ชุดวัลยชาติ ตอน เถาคันขาว," *วารสาร อพวช.*, ปีที่ 16, ฉ. 188, น. 50-51, 2561.

[21] ศิโรจน์ พิมาน, เสน่ห์ บุญกำเนิด และภควดี รักษ์ทอง, "ความหลากหลายและรูปแบบการรับประทานผักพื้นบ้านในจังหวัดสุราษฎร์ธานี," *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี*, ปีที่ 10, ฉ. 1, น. 89-104, 2565.

[22] กฤช เหลือลมัย, (2562, 16 พฤศจิกายน), แกงปลาหมอกับผลเถาคัน สูตรอร่อยร้อยปี, [ออนไลน์]. จาก: https://www.matichon.co.th/lifestyle/food-travel/news_1756113

[23] A. E. Peluru and P. H. Abram, "The utilization of acid as a color stabilizer in the extraction of anthocyanins from the Lakum (*Cayratia trifolia* L.) peel," *Jurnal Akademika Kimia*, vol. 10, no. 4, pp. 254-259, 2021.

[24] นูรอัยนี มามะ, ภวิกา มหาสวัสดิ์ และอรนุช สุขอนันต์, “ผลของอายุการเก็บรักษาและสารช่วยติดสีต่อประสิทธิภาพของสีย้อมโครโมโซมที่สกัดจากผลสดก้างปลาแดง (*Phyllanthus reticulatus* Poir.),” ใน *การประชุมวิชาการระดับชาติพฤกษศาสตร์พื้นบาน ครั้งที่ 2*, เชียงราย, 2561, น. PC-08_1-8.

[25] วันเพ็ญ แก้วพุก, “การศึกษาสารสกัดสีธรรมชาติจากพืชเพื่อการย้อมสีโครโมโซม สำหรับห้องปฏิบัติการชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม,” ใน *การประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม ครั้งที่ 7*, นครปฐม, 2558, น. 1434-1442.

[26] อัญจนา จันทร์ปะทิว, ยุพา มิตรมังกร และนาตยา มนตรี, “ผลของความร้อนและการเก็บรักษาต่อปริมาณแอนโทไซยานินในผักสีม่วงบางชนิด,” *วารสารแก่นเกษตร*, ปีที่ 45, ฉ. ฉบับพิเศษ 1, น. 1278-1282, 2560.

[27] วริพัสย์ อารีกุล, สิริพรรณ กิตตวรพัฒน์ และกชรัตน์ วงศ์ณรัตน์, “ผลของอุณหภูมิแช่เย็นต่อความคงตัวของแอนโทไซยานินและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในน้ำบลูเบอร์รี่และบลูเบอร์รี่เข้มข้น,” ใน *การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 48*, กรุงเทพฯ, 2553, น. 245-251.