

การประยุกต์ใช้การงอกของละอองเรณูของหางนกยูงฝรั่งในการประเมินความเข้มข้นของ  
ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในผลิตภัณฑ์

The application of pollen germination of *Delonix regia* (Bojer ex Hook.) Raf.  
to estimate the concentration of hydrogen peroxide in products

นพวรรณ ศึกษาภูมิภาค มนัสนันท์ สิทธิกัน รุ่งอรุณ วงษ์สิงห์แก้ว  
อังคณา เชื้อเจ็ดตน หฤทัย ไทยสุชาติ และ พรอนันต์ บุญก่อน\*

Noppawan Sueksaphumiphak Manatsanun Sittigun Rungaroon Wongsingkaew  
Angkana Chuajedton Haruthai Thaisuchat and Pornanan Boonkorn\*  
สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏลำปาง

บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการทดสอบความเป็นพิษและปริมาณของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $H_2O_2$ ) โดยใช้ละอองเรณูจากหางนกยูงฝรั่ง แบ่งเป็น 3 การทดลองย่อย ได้แก่ การทดลองที่ 1 ศึกษาชนิดพืชและสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการทดสอบการเจริญของหลอดละอองเรณู โดยนำละอองเรณูจากดอกหางนกยูงฝรั่ง อัญชัน อินทนิล ชบา และ ราชพฤกษ์ มาเลี้ยงในอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงละอองเรณูจำนวน 5 สูตร จากการทดลองพบว่าละอองเรณูจากดอกหางนกยูงฝรั่งมีเปอร์เซ็นต์การงอกของหลอดละอองเรณูได้ดีที่สุดในอาหารสูตรที่ 2 ซึ่งประกอบด้วย 0.1 % boric acid calcium, 0.01 % chloride และ 10% sucrose โดยมีค่าเท่ากับ 53.48 เปอร์เซ็นต์ จึงเลือกชนิดของพืชและสูตรอาหารที่เหมาะสมมาทำการทดลองต่อ โดยการทดลองที่ 2 เป็นการทดสอบความเป็นพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่มีผลต่อความมีชีวิตและการงอกของหลอดละอองเรณู โดยทดสอบในอาหารที่มีความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0, 2.4, 2.8, 3.2 และ 3.6% จากการทดลองพบว่าเมื่อความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพิ่มขึ้น ความมีชีวิตและการสร้างหลอดละอองเรณูของหางนกยูงฝรั่งมีค่าลดลง เมื่อนำค่าเปอร์เซ็นต์การสร้างหลอดละอองเรณูมาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์เทียบกับ ระดับความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ระดับต่าง ๆ ได้รูปสมการแบบเอ็กซิโพเนนเชียลคือ  $y = 13.624e^{-1.224x}$  ( $R^2$  เท่ากับ 0.9068) และเมื่อนำค่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของหลอดละอองเรณูมาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์เทียบกับระดับความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ระดับต่าง ๆ พบว่าจะได้รูปสมการแบบเส้นตรงคือ  $y = -19.41x + 84.845$  ( $R^2$  เท่ากับ 0.971) จากนั้นนำรูปสมการที่ได้ไปใช้ในการทดลองต่อไป คือการทดลองที่ 3 การสอบปริมาณของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยชีววิเคราะห์ โดยสอบเทียบกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ทราบความเข้มข้นคือ 1.5 และ 2.7% และ เทียบกับผลิตภัณฑ์ที่ใช้ผสมครีมเปลี่ยนสีผม NIGAO LIFE ที่ระบุความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์คือ 3% จากผลการทดลองพบว่าค่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของหลอดละอองเรณูจากดอกหางนกยูงฝรั่งมีแนวโน้มสามารถใช้สอบความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ โดยค่าที่ทำนายจากสมการมีค่าเบี่ยงเบนไปจากค่าจริง 2.56-12.00%

คำสำคัญ: ละอองเรณู ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $H_2O_2$ ) ชีววิเคราะห์ (bioassay)

## Abstract

The purposes of this research were to study the possibility in examining the toxicity of hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) and create the equation for predicted the concentration of hydrogen peroxide using pollen from *Delonix regia* (Bojer ex Hook.) Raf. The experiments divided into three sub-experiments. The first experiment was to study the species of plants and germination medium those suitable for pollen tube growth test. Pollens of *Delonix regia* (Bojer ex Hook.) Raf., *Clitoria ternatea* L., *Lagerstroemia macrocarpa* Wall., *Hibiscus rosa-sinensis* L. and *Cassia fistula* L. were cultured in 5 germination medium formulas. The results found that pollens of *Delonix regia* (Bojer ex Hook.) Raf. had grown best in the medium containing 0.1 % boric acid calcium, 0.01 % chloride and 10% sucrose, with pollen tube growth at 53.48%. Therefore, pollens of *Delonix regia* (Bojer ex Hook.) Raf. and the appropriate medium were selected for the next experiment. The second experiment aimed on examining the toxicity of hydrogen peroxide at various concentrations that affect the viability and germination of pollen tubes. Germination medium containing hydrogen peroxide at concentrations of 0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0, 2.4, 2.8, 3.2 and 3.6% were tested. The results had shown that the increasing the concentration of hydrogen peroxide decreased pollen viability and tube formation. Next, the relation of the pollen viability percentage and tube formation in accordance to the concentration of hydrogen peroxide was calculated. The exponential equation  $y = 13.624e^{-1.224x}$  with ( $R^2$  equal to 0.9068) and the linear equation  $y = -19.41x + 84.845$  ( $R^2$  equals 0.971) were found from pollen tube formation and pollen survival percentage, respectively. Then the equations were used for the next experiment. The third experiment was aimed on verify the equations raised from the second experiment by growing pollens in medium with hydrogen peroxide those known concentrations at 1.5 and 2.7% and also with the products of NIGAO LIFE cream color change which indicated the concentration of hydrogen peroxide at 3 percent. It was found that the percentage of pollen survival of *Delonix regia* (Bojer ex Hook.) Raf. tended be used in prediction of hydrogen peroxide concentration, with the deviation from the actual value 2.56-12.00%.

**Keywords:** pollen, hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), bioassay

## บทนำ

โดยทั่วไปวิธีการทดสอบความเป็นพิษในผลิตภัณฑ์ที่จะนำมาใช้กับผิวหนังมนุษย์นิยมใช้สัตว์ทดลอง เช่น หนู หรือกระต่าย ซึ่งสร้างความเจ็บปวดและทุกข์ทรมานแก่สัตว์ทดลอง ดังนั้น เพื่อเหตุผลทางศีลธรรม จึงมีการคิดหาวิธีการเพื่อลดการใช้สัตว์ในการทดสอบสารพิษ เช่น การเอาเนื้อเยื่อและเซลล์ของสัตว์และมนุษย์มาทดสอบความเป็นพิษของสารเคมี แต่วิธีการนี้ก็ยังคงมีข้อบกพร่องเนื่องจากการเตรียมอาหารในการเพาะเลี้ยง นั้นมีราคาแพง วิธีการมีความซับซ้อนต้องอาศัยความชำนาญภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ จึงได้มีการศึกษาความเป็นไปได้ในการนำเอาส่วนต่าง ๆ ของพืช ได้แก่ เมล็ด เนื้อเยื่อ และเซลล์ มาใช้ทดสอบความเป็นพิษเบื้องต้น เช่น การทดสอบความเป็นพิษโดยใช้การเจริญเติบโตของพืชและการงอกของต้นอ่อน การเพาะเลี้ยง เซลล์พืช หรือใช้การงอกและการเจริญเติบโตของปลายรากหอมหรือละอองเรณูของพืช เป็นต้น จากรายงานวิจัยของ Kristen and Kappler (1996) ซึ่งประยุกต์ใช้การทดสอบการงอกของหลอดละอองเรณูจากดอก ยาสูบเพื่อทดสอบความเป็นพิษของควันบุหรี่ พบว่า สามารถระบุค่าความเป็นพิษของควันบุหรี่ได้ และสามารถที่จะนำไปประยุกต์ใช้กับสารพิษชนิดอื่นที่อยู่ในสถานะก๊าซได้ Kristen and Friedrich (2006) ได้ศึกษาการใช้ละอองเรณูจากดอกยาสูบมาทดสอบความเป็นพิษของน้ำยาบ้วนปากและพบว่า สามารถใช้จำแนกระดับความเป็นพิษของน้ำยาบ้วนปากได้ และ ปฏิญญา (2545) พบความเป็นไปได้ที่จะนำละอองเรณูจากดอกกุหลาบไปใช้ในการทดสอบความเป็นพิษของสารเคมีชนิดต่าง ๆ ได้

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $H_2O_2$ ) เป็นสารเคมีที่เป็นส่วนผสมของผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางหลายชนิด เช่น น้ำยาบ้วนปาก ยาฆ่าเชื้อโรคที่ผิวหนัง รวมทั้งใช้ฟอกสีเส้นผมให้มีสีอ่อนลงเพื่อง่ายต่อการเปลี่ยนสีผม และยังทำให้สีที่ต้องการย้อมติดกับเส้นผมได้ดีขึ้น ซึ่งตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง กำหนดชื่อและปริมาณของวัตถุที่อาจใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตเครื่องสำอาง ลงวันที่ 9 ตุลาคม พ.ศ. 2551 ได้ระบุว่า ในยาย้อมผมไม่ควรมีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เกิน 4% แต่ในปัจจุบันที่พบในท้องตลาดมีความเข้มข้นตั้งแต่ 3–40 % ซึ่งหากใช้โดยไม่มีการเจือจางจะทำให้เกิดอาการระคายเคืองหนังศีรษะ และเส้นผมอาจถูกทำลายได้ การวัดปริมาณของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในปัจจุบันมีวิธีที่ซับซ้อน ใช้สารเคมีและเครื่องมือหลายชนิด และต้องทำในห้องปฏิบัติการที่มีความพร้อมเท่านั้น ซึ่งหากสามารถทำการหาปริมาณหรือระบุความเข้มข้นของสารเพื่อประเมินระดับความเป็นพิษเบื้องต้นได้โดยใช้อุปกรณ์เครื่องมือที่ไม่ยุ่งยากซับซ้อนก็จะช่วยให้สามารถหลีกเลี่ยงสารชนิดนั้นหากพบว่ามีแนวโน้มที่จะเป็นอันตรายต่อผู้ใช้ผลิตภัณฑ์หรือสารเคมีนั้นได้

## วัตถุประสงค์ในการศึกษา

1. เพื่อศึกษาการใช้ละอองเรณูในการทดสอบความเป็นพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์
2. เพื่อประยุกต์ใช้ละอองเรณูเพื่อทดสอบความเป็นพิษและความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในผลิตภัณฑ์

## วิธีดำเนินการวิจัย

### การทดลองที่ 1 การศึกษาชนิดพืชและสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการทดสอบการเจริญของหลอดละอองเรณู

หลอดละอองเรณูที่ทดสอบนำมาจากพืชจำนวน 5 ชนิด ได้แก่ หางนกยูงฝรั่ง อัญชัน ชบา อินทนิล และราชพฤกษ์ ซึ่งเป็นพืชที่ออกดอกจำนวนมากในช่วงฤดูร้อนไปจนถึงฤดูฝน ทำการทดลองในช่วงเดือน เมษายน-สิงหาคม พ.ศ. 2561 โดยใช้ดอกที่อยู่ในระยะที่ใกล้บาน ซึ่งเป็นระยะที่หลอดละอองเรณูเจริญเต็มที่ที่อยู่ภายในอับเรณูที่ยังไม่แตก ทดสอบความสามารถในการสร้างหลอดละอองเรณูเมื่อเลี้ยงในอาหารพื้นฐานจำนวน 5 สูตร ได้แก่ สูตรที่ 1 ชุดควบคุม (น้ำกลั่น); สูตรที่ 2 ประกอบด้วย 0.1% boric acid + 0.01% calcium chloride + 10% sucrose; สูตรที่ 3 ประกอบด้วย 0.01% calcium chloride + 10% sucrose; สูตรที่ 4 ประกอบด้วย 0.01% calcium chloride + 15% sucrose และ สูตรที่ 5 ประกอบด้วย 10% sucrose เลี้ยงหลอดละอองเรณูของพืชแต่ละชนิดในสไลด์หลุมที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนหลอดละอองเรณูที่ออกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า แต่ละชุดการทดสอบมี 30 ซ้ำ

### การทดลองที่ 2 การทดสอบความเป็นพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่มีผลต่อความมีชีวิตและการงอกของหลอดละอองเรณู

เลี้ยงสารแขวนลอยหลอดละอองเรณู (pollen suspension) ที่มีความหนาแน่นของหลอดละอองเรณูเท่ากับ 13 pollen/μl ในสูตรอาหารที่เติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0, 2.4, 2.8, 3.2 และ 3.6% ซึ่งอยู่ในช่วงความเข้มข้นที่กำหนดให้สามารถใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์สำหรับเส้นผม ผลิตภัณฑ์สำหรับผิวหนัง ผลิตภัณฑ์สำหรับเล็บ ผลิตภัณฑ์เพื่อสุขอนามัยในช่องปาก และผลิตภัณฑ์ฟอกสีฟันสำหรับทันตแพทย์จำหน่ายให้ผู้บริโภคนำใช้เองที่บ้าน ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง กำหนดชื่อและปริมาณของวัตถุที่อาจใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตเครื่องสำอาง ปี พ.ศ. 2551 บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สร้างสภาวะขึ้นโดยคลุมด้วยผ้าขนหนูที่ขึ้น 2 ชั้น ภายใต้สภาวะไม่มีแสง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วทดสอบความมีชีวิตของหลอดละอองเรณูโดยการทำปฏิกิริยากับสารละลาย 0.1% 2,3,5 -Triphenyltetrazolium chloride ซึ่งหลอดละอองเรณูที่มีชีวิตจะติดเป็นสีแดง รวมทั้งนับจำนวนหลอดละอองเรณูที่งอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า โดยหลอดละอองเรณูที่นับว่างอกต้องมีความยาวของหลอดละอองเรณูเกินครึ่งหนึ่งของความกว้างของหลอดละอองเรณู จากนั้นนำข้อมูลไปเขียนกราฟเพื่อหาสมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์กับเปอร์เซ็นต์การงอกของหลอดละอองเรณูและเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของหลอดละอองเรณูด้วยโปรแกรม Microsoft Excel โดยแต่ละชุดการทดสอบมี 30 ซ้ำ

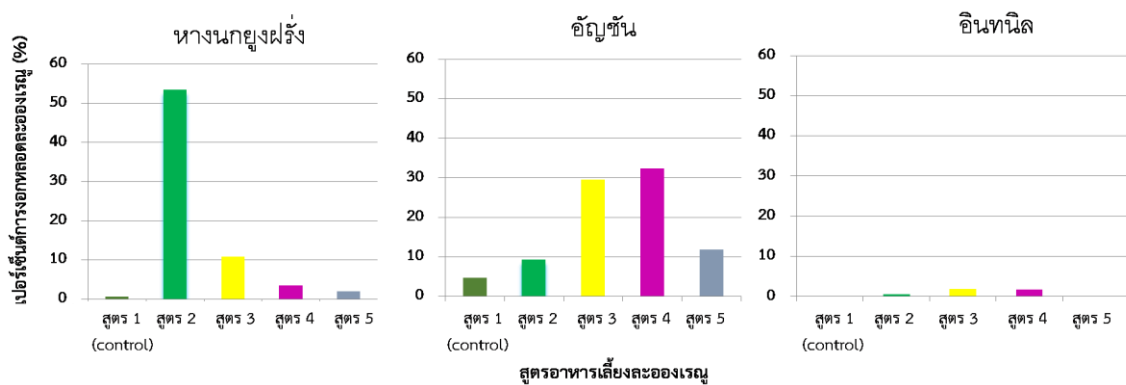
### การทดลองที่ 3 การประยุกต์ใช้หลอดละอองเรณูเพื่อทดสอบความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

เลี้ยงสารแขวนลอยหลอดละอองเรณูในอาหารที่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 1.5 และ 2.7% ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นที่อยู่ในช่วงของการทดสอบในการทดลองที่ 2 แต่ไม่ใช่ค่าที่วัดโดยตรง บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สร้างสภาวะขึ้นโดยคลุมด้วยผ้าขนหนูที่ขึ้น 2 ชั้น ภายใต้สภาวะไม่มีแสง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นับจำนวนหลอดละอองเรณูที่มีชีวิตและที่สร้างหลอดละอองเรณูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า นำค่าที่วัดได้ไปเทียบกับค่าที่คำนวณได้จากสมการที่ได้จากการทดลองที่ 2 แต่ละชุดการทดสอบมี 30 ซ้ำ ส่วนการทดสอบความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยทดสอบกับผลิตภัณฑ์ที่ระบุว่ามีส่วนประกอบของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 3% ทำการแช่หลอดละอองเรณูในผลิตภัณฑ์ที่ใช้ผสมครีมเปลี่ยนสีผม NIGAO LIFE Developer Cream เป็นเวลา 3 ชั่วโมงแล้วจึงเลี้ยงในอาหารพื้นฐานต่ออีก 3 ชั่วโมง นับจำนวนหลอดละอองเรณูที่มีชีวิตและที่งอก นำค่าที่วัดได้ไปเทียบกับค่าที่คำนวณได้จากสมการที่ได้จากการทดลองก่อนหน้านี้ แต่ละชุดการทดสอบมี 30 ซ้ำ

## ผลการวิจัยและอภิปรายผล

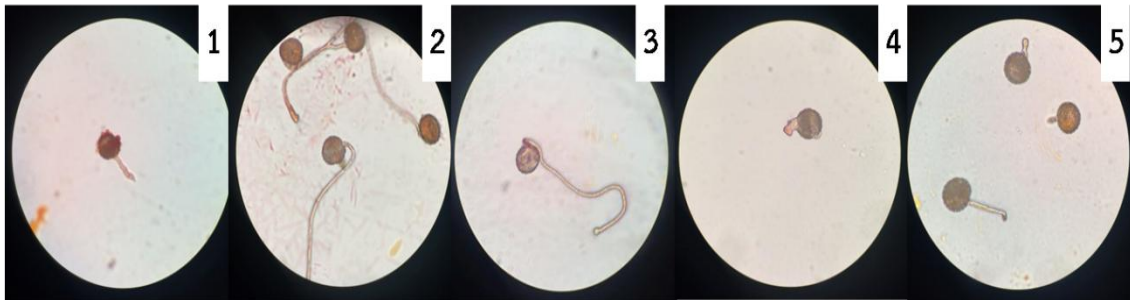
### การทดลองที่ 1 การศึกษาชนิดพืชและสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการทดสอบการเจริญของหลอดละอองเรณู

ผลการสร้างหลอดละอองเรณูของพืชมีดอกจำนวน 5 ชนิด ได้แก่ หางนกยูงฝรั่ง อัญชัน อินทนิล ขบา และราชพฤกษ์ ในอาหารเพาะเลี้ยง (*In vitro*) จำนวน 5 สูตร เลี้ยงที่อุณหภูมิเฉลี่ย 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยพบว่า ละอองเรณูของพืชที่มีระยะเวลาในการงอกเร็วที่สุด คือ หางนกยูงฝรั่ง อัญชัน และอินทนิล ซึ่งงอกตั้งแต่ 3 ชั่วโมงแรกหลังการเลี้ยงในอาหาร (ไม่แสดงผลในที่นี้) ในขณะที่ขบาและราชพฤกษ์ไม่พบการงอกแม้เวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การงอกของหลอดละอองเรณูในพืชแต่ละชนิด ภายหลัง 48 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง พบว่า หางนกยูงฝรั่งมีเปอร์เซ็นต์การงอกของหลอดละอองเรณูสูงกว่าพืชชนิดอื่น และมีค่าสูงที่สุดในอาหารสูตร 2 ซึ่งประกอบด้วย 0.1% boric acid, 0.01% calcium chloride และ 10% sucrose มีค่าเท่ากับ 53.48 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 1) แสดงให้เห็นว่าเป็นสัดส่วนที่เหมาะสมกับการงอกหลอดละอองเรณูของพืชชนิดนี้ โดยเฉพาะน้ำตาลซูโครส เนื่องจากหากมีความเข้มข้นที่น้อยหรือมากเกินไปจะมีผลต่อสมดุลออสโมติกของละอองเรณู ซึ่งอาจทำให้ละอองเรณูแตกได้ ซึ่งแตกต่างจากรายงานของ ศิริขัตตพันธ์ และคณะ (2559) ซึ่งได้ทำการทดลองหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการงอกของหลอดกล้วยไม้สกุลหวายจำนวน 3 พันธุ์ โดยทดสอบในอาหารสังเคราะห์ 11 สูตร พบว่า ละอองเรณูของพันธุ์หวายแคะที่เพาะในอาหารวันที่ไม่เติมซูโครสมีการงอกของหลอดละอองเรณูสูงที่สุด ขณะที่พันธุ์เอื้องสกุล และบอม 17 มีการงอกของหลอดละอองเรณูต่ำมาก เห็นได้ว่าอาหารเพาะเลี้ยงละอองเรณูแต่ละสูตรมีผลต่อเปอร์เซ็นต์การงอกของหลอดละอองเรณูในพืชแต่ละชนิดแตกต่างกัน ซึ่ง Jayaprakash (2018) ระบุว่าอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงละอองเรณูให้งอกนั้นมีหลายสูตรขึ้นอยู่กับชนิดของพืช หรือแม้กระทั่งสายพันธุ์ที่ต่างกันก็อาจตอบสนองต่ออาหารที่ต่างกันไปด้วย ลักษณะการงอกหลอดละอองเรณูดอกหางนกยูงฝรั่งแสดงดังภาพที่ 2



ภาพที่ 1 เปอร์เซ็นต์การงอกหลอดละอองเรณูจากดอกไม้บางชนิดที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรต่าง ๆ

หมายเหตุ อาหารสูตรที่ 1 ชุดควบคุม (น้ำกลั่น); สูตรที่ 2 ประกอบด้วย 0.1% boric acid + 0.01% calcium chloride + 10% sucrose; สูตรที่ 3 ประกอบด้วย 0.01% calcium chloride + 10% sucrose; สูตรที่ 4 ประกอบด้วย 0.01% calcium chloride + 15% sucrose และ สูตรที่ 5 ประกอบด้วย 10 % sucrose



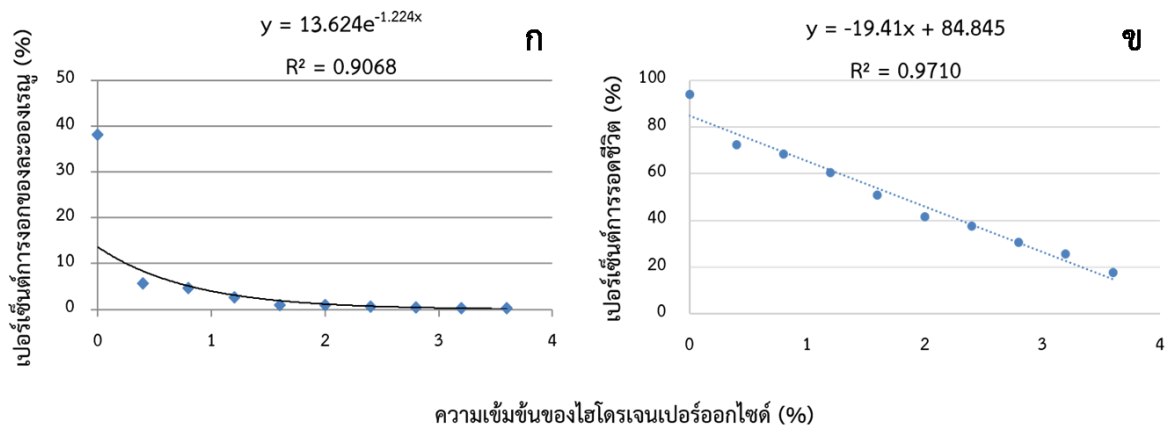
ภาพที่ 2 ลักษณะการงอกหลุดละอองเรณูจากหางนกยูงฝรั่งที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรต่าง ๆ

หมายเหตุ อาหารสูตรที่ 1 ชุดควบคุม (น้ำกลั่น); สูตรที่ 2 ประกอบด้วย 0.1% boric acid + 0.01% calcium chloride + 10% sucrose; สูตรที่ 3 ประกอบด้วย 0.01% calcium chloride + 10% sucrose; สูตรที่ 4 ประกอบด้วย 0.01% calcium chloride + 15% sucrose และ สูตรที่ 5 ประกอบด้วย 10 % sucrose

### การทดลองที่ 2 การทดสอบความเป็นพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่มีผลต่อความมีชีวิตและการงอกของหลุดละอองเรณู

จากการทดสอบเปอร์เซ็นต์การงอกของละอองเรณู พบว่า เมื่อระดับความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพิ่มขึ้นคือ 0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2, 2.4, 2.8, 3.2 และ 3.6% ส่งผลให้มีเปอร์เซ็นต์การงอกของละอองเรณูลดลงเหลือ 38.12, 5.70, 4.65, 2.67, 1.02, 0.89, 0.62, 0.45, 0.31 และ 0.28% ตามลำดับ (ภาพที่ 3ก) แสดงให้เห็นถึงผลเสียของสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่มีต่อการงอกของหลุดละอองเรณูจากดอกหางนกยูงฝรั่ง ทั้งนี้เนื่องจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จัดเป็นสารอนุมูลอิสระ (reactive oxygen species, ROS) ชนิดหนึ่ง ซึ่งมีผลต่อการควบคุมการแลกเปลี่ยนไอออนบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของละอองเรณู ทำให้ภายในเซลล์มีไอออนของแคลเซียมมากเกินไป ส่งผลกระทบต่อการทำงานของเซลล์ และเกิดการสร้างผนังเซลล์ในอัตราที่เร็วกว่าปกติ ทำให้มีผลเสียต่อการสร้างและการยืดยาวของหลุดละอองเรณูของพืชในที่สุด (Maksimov et al., 2016) เมื่อนำค่าเปอร์เซ็นต์การงอกของละอองเรณูมาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์เทียบกับระดับความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ระดับต่าง ๆ โดยใช้โปรแกรม Microsoft Excel ได้กราฟความสัมพันธ์แบบเอ็กซ์โพเนนเชียล มีค่าแสดงความสัมพันธ์ของข้อมูล ( $R^2$ ) เท่ากับ 0.9068 ซึ่งมีค่าเข้าใกล้ 1 แสดงว่าข้อมูลมีความสัมพันธ์กันในระดับสูงและได้ค่าสมการแสดงความสัมพันธ์ออกมาเป็น  $y=13.624e^{-1.224x}$  โดย  $y$  คือเปอร์เซ็นต์การงอกของหลุดละอองเรณูหางนกยูงฝรั่ง และ  $x$  คือระดับความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งจะได้นำสมการนี้ไปเปรียบเทียบกับค่าที่ทดสอบได้ใน การทดลองต่อไป

ผลการทดสอบการรอดชีวิตของละอองเรณูพบว่าเมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในระดับ 0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0, 2.4, 2.8, 3.2 และ 3.6% ส่งผลให้ค่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตลดลงตามลำดับ คือ 93.88, 72.51, 68.42, 60.41, 50.91, 41.62, 37.59, 30.62, 25.67 และ 16.04% (ภาพที่ 3ข) เมื่อนำค่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของละอองเรณูมาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์เทียบกับระดับความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ระดับต่าง ๆ ได้กราฟความสัมพันธ์แบบเส้นตรง มีค่าแสดงความสัมพันธ์ของข้อมูล ( $R^2$ ) เท่ากับ 0.971 แสดงว่าข้อมูลมีความสัมพันธ์กันในระดับสูง และได้ค่าสมการแสดงความสัมพันธ์ออกมาเป็น  $y = -19.41x+84.845$  โดย  $y$  คือเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของหลุดละอองเรณูหางนกยูงฝรั่ง และ  $x$  คือระดับความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งจะได้นำสมการนี้ไปเปรียบเทียบกับค่าที่ทดสอบได้ใน การทดลองต่อไป



ภาพที่ 3 เปอร์เซ็นต์การงอกหลอดละอองเรณู (ก) และการรอดชีวิตของละอองเรณู (ข) จากดอกหางนกยูงฝรั่งที่เลี้ยงในอาหารที่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

### การทดลองที่ 3 การประยุกต์ใช้ละอองเรณูเพื่อทดสอบความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

เมื่อนำสมการที่ได้จากการทดลองที่ 2 มาทำนายค่าความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยการเพาะเลี้ยงละอองเรณูหางนกยูงฝรั่งในอาหารเพาะเลี้ยงที่ผสมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในระดับความเข้มข้นจำนวน 2 ระดับ ได้แก่ 1.5 และ 2.7% แล้วหาเปอร์เซ็นต์การงอกของละอองเรณู นำค่าเปอร์เซ็นต์การงอกที่ได้ไปทวนสอบกลับโดยการแทนที่ค่า  $x$  (ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ทราบค่า) เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเปอร์เซ็นต์การงอกของหลอดละอองเรณูที่วัดได้จริงจากการเลี้ยงในอาหารกับค่าที่คำนวณจากสมการ  $y = 13.624e^{-1.224x}$  ผลจากการทดลองและการคำนวณแสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์การงอกหลอดละอองเรณูในอาหารที่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่มีความเข้มข้น 2 ระดับ

ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (%)	เปอร์เซ็นต์การงอกของหลอดละอองเรณู (%)		
	ค่าที่วัดได้จริงจากการเลี้ยงในอาหาร*	ค่าที่คำนวณได้จากสมการ $y = 13.624e^{-1.224x}$	เปอร์เซ็นต์การเบี่ยงเบนของค่าที่คำนวณจากสมการเทียบกับค่าที่วัดได้จริง (%)
1.5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1.11±0.35	2.17	95.50
2.7% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.50±0.14	0.50	0.00

\*หมายเหตุ เป็นค่าเฉลี่ยที่วัดจาก 30 ซ้ำ

ซึ่งจากตารางที่ 1 เห็นได้ว่าผลการทวนสอบมีความแปรปรวนของค่าสูงเมื่อเทียบระหว่างค่าที่วัดได้จริงกับค่าที่คำนวณได้จากสมการ กล่าวคือที่ระดับความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 1.5% ค่าที่คำนวณได้มีความผิดพลาดไปจากค่าที่วัดได้จริงถึง 95% ในขณะที่ระดับความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 2.7% ค่าที่คำนวณได้มีความผิดพลาดไปจากค่าที่วัดได้จริง 0% แสดงให้เห็นว่าสมการการงอกของหลอดละอองเรณูที่ได้จากการทดลอง ( $y = 13.624e^{-1.224x}$ ) อาจยังไม่มีเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการคำนวณค่าการงอกของหลอดละอองเรณูที่แท้จริงได้ ขณะที่เมื่อนำค่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของละอองเรณูที่วัดได้จริงไปทวนสอบกลับโดยการแทนที่ค่า  $x$  (ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ทราบค่า) จากสมการ  $y = -19.41x + 84.845$  ผลจากการทดลองและการคำนวณแสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของละอองเรณู ที่ระดับความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 2 ระดับ

ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (%)	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของละอองเรณู (%)		
	ค่าที่วัดได้จริงจากการเลี้ยงในอาหาร*	ค่าที่คำนวณได้จากสมการ $y = -19.41x + 84.845$	เปอร์เซ็นต์การเบี่ยงเบนของค่าที่คำนวณจากสมการเทียบกับค่าที่วัดได้จริง (%)
1.5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	51.40±5.06	55.73	8.42
2.7% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	31.63±6.42	32.44	2.56

\*หมายเหตุ เป็นค่าเฉลี่ยที่วัดจาก 30 ซ้ำ

ซึ่งจากตารางที่ 2 เห็นได้ว่าผลการสอบมีความแปรปรวนของค่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 8.42 และ 2.56% ตามลำดับ จากการวัดและคำนวณที่ระดับความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เท่ากับ 1.5 และ 2.7% ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าสมการการรอดชีวิตของละอองเรณูที่คำนวณได้จากกราฟในผลการทดลองในตอนี่ 2 ( $y = -19.41x + 84.845$ ) มีแนวโน้มที่จะสามารถนำไปใช้ในการคำนวณค่าการงอกของหลอดละอองเรณูที่แท้จริงเหมาะสมกว่าการใช้ค่าการงอกของหลอดละอองเรณู เนื่องจากค่าที่คำนวณได้มีความแตกต่างจากค่าที่ทำการทดสอบจริงไม่ถึง 10%

การสอบโดยใช้ค่าเปอร์เซ็นต์การงอกของหลอดละอองเรณูที่ทดสอบกับผลิตภัณฑ์ที่ระบุว่ามี ส่วนประกอบของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 3% โดยนำละอองเรณูมาแช่ในผลิตภัณฑ์ NIGAO LIFE (3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) เป็นเวลา 1 ชั่วโมงแล้วจึงเติมอาหารเพาะเลี้ยง บ่มที่อุณหภูมิเฉลี่ย 35 องศาเซลเซียส จำนวนเปอร์เซ็นต์การงอกของหลอดละอองเรณู นำค่าที่ได้ไปสอบกลับโดยการแทนที่ค่า y (เปอร์เซ็นต์การงอกของหลอดละอองเรณู) เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ระบุไว้ข้างขวดผลิตภัณฑ์กับค่า x ที่คำนวณได้จากสมการ  $y = 13.624e^{-1.224x}$  ผลจากการทดลองและการคำนวณแสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 เปอร์เซ็นต์การงอกของหลอดละอองเรณูจากการคำนวณด้วยสมการเทียบกับระดับความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ระบุไว้ในตัวผลิตภัณฑ์

ค่าที่ระบุไว้ที่ฉลากของผลิตภัณฑ์	ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (%)	
	ค่าที่คำนวณได้จากสมการ* $y = 13.624e^{-1.224x}$	เปอร์เซ็นต์การเบี่ยงเบนของค่าที่คำนวณจากสมการเทียบกับค่าที่ระบุไว้ (%)
3	2.59	13.67

\*หมายเหตุ เป็นการแทนที่สมการด้วยค่า y (วัดได้จากการทดลอง มีค่าเท่ากับ 0.57) ซึ่งเป็นค่าเปอร์เซ็นต์การงอกของหลอดละอองเรณูที่วัดได้จากการเลี้ยงละอองเรณูที่มีผลิตภัณฑ์ที่ใช้ผสมครีมเปลี่ยนสีผสม NIGAO LIFE (ค่าเฉลี่ยที่วัดจาก 30 ซ้ำ)

ซึ่งจากตารางที่ 3 เห็นได้ว่าผลการทดสอบมีความแปรปรวนของค่าที่คำนวณได้เมื่อเทียบกับค่าที่ระบุไว้คือ 13.67 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าสมการการงอกของหลอดละอองเรณูที่คำนวณได้จากกราฟในการทดลองที่ 2 ( $y = 13.624e^{-1.224x}$ ) มีแนวโน้มเหมาะสมในการนำไปใช้คำนวณค่าความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าตัวผลิตภัณฑ์ที่มีความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่างจากที่ระบุไว้เล็กน้อย หรืออาจมีสารเคมีอื่น ๆ ที่เป็นส่วนประกอบในน้ำยาย้อมผมที่ส่งผลให้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เจือจางลงขณะที่การสอบโดยใช้ค่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเมื่อแทนที่ค่า y (เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของละอองเรณู) จากสมการ  $y = -19.41x + 84.845$  ผลจากการทดลองและการคำนวณแสดงดังตารางที่ 4



ตารางที่ 4 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของละอองเรณูจากการคำนวณด้วยสมการเทียบกับระดับความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ระบุไว้ในตัวผลิตภัณฑ์

ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (%)		
ค่าที่ระบุไว้ที่ฉลากของผลิตภัณฑ์	ค่าที่คำนวณได้จากสมการ*	เปอร์เซ็นต์การเบี่ยงเบนของค่าที่คำนวณจากสมการเทียบกับค่าที่ระบุไว้ (%)
	$y = -19.41x + 84.845$	
3.00	2.64	12

\*หมายเหตุ เป็นการแทนที่สมการด้วยค่า y (วัดได้จากการทดลอง มีค่าเท่ากับ 33.61) ซึ่งเป็นค่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของละอองเรณูที่วัดได้จากการเลี้ยงละอองเรณูที่มีผลิตภัณฑ์ที่ใช้ผสมครีมเปลี่ยนสีผม (ค่าเฉลี่ยที่วัดจาก 30 ซ้ำ)

ซึ่งจากตารางที่ 4 เห็นได้ว่าผลการสอบมีความแตกต่างจากค่าที่ระบุไว้ 12% แสดงให้เห็นว่าสมการการรอดชีวิตของละอองเรณูที่คำนวณได้จากกราฟในผลการทดลองที่ 2 ( $y = -19.41x + 84.845$ ) มีแนวโน้มที่จะสามารถนำไปใช้ในการคำนวณความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้เหมาะสมกว่าการใช้ค่าการออกของหลอดหลอดละอองเรณู เนื่องจากค่าที่คำนวณได้มีความแปรปรวนจากค่าจริงต่ำกว่า

จากผลการทดลองเห็นได้ว่าการวิเคราะห์โดยใช้ค่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของละอองเรณูจากดอกหางนกยูงฝรั่งมีแนวโน้มที่สามารถใช้ในการทดสอบความเป็นพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และทำนายระดับความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้เป็นเบื้องต้น ซึ่งการใช้ละอองเรณูในการทดสอบความเป็นพิษมีข้อดีหลายประการ เนื่องจากการเตรียมอาหารเลี้ยงละอองเรณูทำได้ง่าย ใช้สารเคมีไม่มาก และไม่จำเป็นต้องผ่านการนิ่งฆ่าเชื้อเนื่องจากใช้เวลาในการทดสอบเพียง 3-24 ชั่วโมงเท่านั้น ละอองเรณูของพืชทำได้ง่าย มีจำนวนมาก และไม่มีรังควันจุลินทรีย์ที่อาจรบกวนกระบวนการทดสอบ อีกทั้งเมื่อเข้าสู่กระบวนการงอกหลอดละอองเรณู เซลล์ของหลอดละอองเรณูยังมีความคล้ายคลึงกับเซลล์สัตว์ เนื่องจากเป็นช่วงที่เซลล์กำลังเติบโต ยังไม่มีการสะสมของผนังเซลล์มากนัก การใช้เซลล์พืชในการทดสอบความเป็นพิษยังมีข้อดีในแง่ของศีลธรรมเพื่อหลีกเลี่ยงการทรมานสัตว์ทดลองได้อีกทางหนึ่ง อีกทั้งต้นหางนกยูงเป็นไม้ยืนต้นที่ออกดอกเป็นจำนวนมาก ซึ่งปกติไม่ใช่พืชเศรษฐกิจ จึงไม่มีผลกระทบต่อการใช้ปุ๋ยหรือสารกำจัดศัตรูพืชใด ๆ ที่อาจมีผลกระทบต่อกระบวนการทดสอบ

อย่างไรก็ตาม งานวิจัยครั้งนี้ยังมีจุดที่ต้องปรับปรุงแก้ไขอีกหลายประการ เนื่องจากจำนวนซ้ำที่ใช้ในการทดสอบยังไม่มากพอที่จะนำไปสู่ข้อสรุปได้อย่างชัดเจน จึงควรมีการทดสอบโดยเพิ่มจำนวนซ้ำให้มากขึ้นเพื่อยืนยันผลการทดลองอีกครั้ง และต้องควบคุมปัจจัยภายนอกที่อาจมีผลกระทบต่อทดสอบ โดยเฉพาะแหล่งที่มาของพืชควรมีความหลากหลายมากกว่านี้ อีกทั้งดอกหางนกยูงฝรั่งเป็นดอกที่ออกในช่วงฤดูร้อนถึงฤดูฝนเท่านั้น ทำให้ไม่สามารถหาละอองเรณูมาทดสอบได้ตลอดทั้งปี อย่างไรก็ตาม มีรายงานว่าละอองเรณูของพืชหลายชนิดสามารถเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิต่ำได้เป็นเวลานานหลายเดือน เช่น ละอองเรณูของดอกทุเรียนสามารถเก็บรักษาได้ 36 วัน ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส (พิชัย, 2558) ขณะที่ละอองเรณูของระกำสามารถเก็บได้นาน 360 วัน เมื่อใช้ไนโตรเจนเหลวในการเก็บรักษา (รมย์ริญ, 2542) เป็นต้น จึงมีความน่าสนใจว่าละอองเรณูของดอกหางนกยูงฝรั่งจะสามารถเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิต่ำได้นานกี่วัน โดยที่ยังสามารถรักษาความสามารถในการเจริญในอาหารเพาะเลี้ยงได้เมื่อนำออกมาทำการทดสอบ และนอกจากนี้ ยังต้องมีการเปรียบเทียบผลการทดสอบกับวิธีมาตรฐานที่ใช้ในปัจจุบัน ได้แก่ red blood cell test และ Draize eye irritation assay (Kristen et al., 1993) ก่อนการนำไปใช้จริง ซึ่งเป็นหัวข้อที่น่าสนใจที่ควรทำการทดลองต่อไป

## สรุปผลการวิจัย

ละอองเรณูจากดอกหางนกยูงฝรั่งมีการเจริญเติบโตได้ดีในอาหารสูตรที่ 2 ซึ่งประกอบด้วย 0.1% boric acid, 0.01% calcium chloride และ 10% sucrose เนื่องจากมีเปอร์เซ็นต์การงอกของหลอดละอองเรณูสูงที่สุด เมื่อละอองเรณูจากดอกหางนกยูงฝรั่งสัมผัสกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในระดับความเข้มข้น 0 - 3.6 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลต่อการลดลงของค่าเปอร์เซ็นต์การงอกและการรอดชีวิตของละอองเรณู และเมื่อนำมาประยุกต์ใช้เพื่อทดสอบความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในผลิตภัณฑ์ พบว่าสามารถใช้ค่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของละอองเรณูในการทดสอบความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในผลิตภัณฑ์ได้ โดยค่าที่ทำนายได้มีค่าเบี่ยงเบนไปจากค่าจริง 2.56-12.00%

## เอกสารอ้างอิง

- ปริญญา สุขวงศ์. 2545. การทดสอบความเป็นพิษของสารเคมี โดยใช้การงอกของละอองเรณูรูปถั่วเป็นดัชนี. [วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต]. [นครปฐม]. มหาวิทยาลัยมหิดล.
- พิชัย ใจกล้า. 2558. ความมีชีวิตและการเก็บรักษาละอองเรณูทุเรียนที่ปลูกในจังหวัดอุดรดิตถ์. วารสารวิทยาศาสตร์ลาดกระบัง. 24: 89-99.
- รมย์ริฎ ปิยารมย์. 2542. วิธีการเก็บรักษาละอองเรณูระกำ (*Salacca wallichiana* Mart.) ในไนโตรเจนเหลว. [วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต]. [กรุงเทพฯ]. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ศิริชตนันท์ โรจนวิจิตร ปิยอนุช ศรชัย ดวงกมล สัมฤทธิ์นันท์ หนึ่งฤทัย เดชสังกรานนท บุษพา คงสมัย และ เสริมศิริ จันทระเปรม. 2559. เทคนิคสำหรับการแยกและการทดสอบความงอกของเรณูกกล้วยไม้สกุลหวายบางพันธุ์. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 47: 305-316.
- Javaprakash, P. 2018. Pollen germination *in vitro*. Intech Open. 81-96.
- Kristen, U., Kappler, R., Pape, W. J. W. and Hoppe, U. 1993. *In vitro* toxicity assessment of tensides: the pollen tube growth test, the red blood cell test and the Draize eye irritation assay in comparison. Bioengineering. 9: 39-45.
- Kristen, U. and Friedrich, E. R. 2006. Toxicity screening of mouthwashes in the pollen tube growth test: safety assessment of recommended dilutions. Brazilian Dental Journal. 17: 58-62.
- Kristen, U. and Kappler, R. 1996. Adaptation of the pollen tube growth assay to cytotoxicity testing of cigarette smoke. ALTEX. 13:175-178.
- Maksimov, N. M., Breigin, M. A. and Ermakov, I. P. 2016. Regulation of ion transport across the pollen tube plasmalemma by hydrogen peroxide. Cell and Tissue Biology. 10: 69-75.