



การส่งเสริมสมบัติต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ในปลายยอดผักหวานบ้าน ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยการฉายรังสียูวีซี รัชนี เพ็ชรช้าง

Enhancement on Antioxidant Activities, Total Phenolics and Total Flavonoids Content of Shoot Cultures of *Sauropus androgynus* L. by UV-C Irradiation

Ratchanee Petchang

สาขาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรดิตถ์ อำเภอเมือง จังหวัดอุดรดิตถ์ 53000

Department of Applied Biology, Faculty of Science and Technology, Uttaradit Rajabhat University, Uttaradit, Thailand 53000

* Corresponding author. E-mail address: rpetchang@hotmail.com

บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้เป็นการนำปลายยอดผักหวานบ้าน (*Sauropus androgynus*) มาเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตร Murashige and Skoog ดัดแปลงโดยการเติมฮอร์โมน 6- benzyladenin (BA) 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์ จนได้ยอดจำนวนมาก นำปลายยอดที่ได้มาให้รังสียูวีซีเป็นเวลา 0 นาที (กลุ่มควบคุม) 5 10 และ 15 นาที (กลุ่มทดลอง) จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงในท้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจนครบ 3 สัปดาห์ นำปลายยอดที่เพิ่มขึ้นของกลุ่มควบคุม กลุ่มทดลองและนำปลายยอดจากธรรมชาติมาสกัดด้วยเมทานอล นำสารสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์สมบัติต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH scavenging assay, ABTS scavenging assay และ FRP assay พบว่ากลุ่มให้รังสียูวีซี 5 นาที มีสมบัติต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ทั้งหมด สูงที่สุด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH scavenging assay มีค่า IC_{50} 10.13 มิลลิกรัมต่อลิตร วิธี ABTS scavenging assay มีค่าเฉลี่ยสูงสุด 166.48 มิลลิกรัม TEAC/100 กรัมน้ำหนักสด และวิธี FRP assay มีค่าเฉลี่ยสูงสุด 22.72 mM $FeSO_4$ /100 กรัมน้ำหนักสด ส่วนปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด มีค่าเฉลี่ยสูงสุด 15.54 มิลลิกรัม GAE/ 100 กรัมน้ำหนักสด และปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด มีค่าเฉลี่ยสูงสุด 63.65 มิลลิกรัม QE/100 กรัมน้ำหนักสด การวิจัยนี้เป็นพื้นฐานในการนำปลายยอดผักหวานบ้านที่ให้รังสียูวีซี 5 นาที เพื่อใช้ประโยชน์ในการเป็นอาหารเสริมและเป็นยาต่อไป

คำสำคัญ: ผักหวานบ้าน รังสียูวีซี สมบัติต้านอนุมูลอิสระ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Abstract

The shoot of *Sauropus androgynus* were cultured for 6 weeks on modified Murashige and Skoog (MS) mediums containing 1mg/L 6- benzyladenin (BA) for multiple shoots formation. Multiple shoots were treated by UV-C irradiation for 0 min (for the control group) and 5, 10 and 15 mins (for the experimental groups). After 3 weeks of culture, the shoots were extracted with methanol and analyzed for antioxidant activities using DPPH scavenging assay, ABTS scavenging assay and FRP assay and the total phenolic and total flavonoid contents were determined. The results indicated that the shoot treated with UV-C irradiation for 5 mins exhibited the highest antioxidant activities at IC_{50} of 10.13 mg/mL using DPPH scavenging assay, 166.48 mg TEAC/100g fresh weight (FW) using ABTS scavenging assay and 22.72 mM $FeSO_4$ / 100 g FW using FRP assay. The total phenolic and total flavonoid contents were 15.54 mg GAE/100g FW and 63.65 mg QE/100g FW., respectively. This study will provide useful knowledge and can be utilized for improving the quality of *S. androgynus* raw materials in herbal supplementary food and medical uses.

Keywords: *Sauropus androgynus* L., antioxidant activities, UV-C irradiation, plant tissue culture

บทนำ

โรคต่างๆ ที่พบมากในปัจจุบันอันได้แก่ โรคหลอดเลือดหัวใจตีบและแข็งตัว โรคมะเร็งบางชนิด โรคความจำเสื่อม โรคไขข้ออักเสบ โรคความแก่ สาเหตุหนึ่งมาจากอนุมูลอิสระในร่างกายมีมากเกินไป ทำให้เกิดการขาดสมดุล เกิดปัญหาต่อสุขภาพ (ไมตรี สุทธิจิตต์ และคนอื่นๆ, 2555) แต่ปัจจุบันผู้บริโภคหันมาบริโภคอาหารที่มีสารต้านอนุมูลอิสระ ที่ทำหน้าที่ต่อต้าน ยับยั้ง และควบคุมอนุมูลอิสระไม่ให้ไปกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน จึงช่วยยับยั้งอนุมูลอิสระไม่ให้ทำลายองค์ประกอบของเซลล์ และ DNA สารต้านอนุมูลอิสระที่พบในธรรมชาติ พบได้ในผักและผลไม้ ซึ่งพืชสร้างขึ้นเพื่อป้องกันตนเองจากสัตว์ แมลง และจุลินทรีย์ศัตรูของพืช (Wink, 1988) สารกลุ่มนี้ส่วนใหญ่จะเป็นสารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compound) วิตามินซี วิตามินอี แคโรทีนอยด์และกรดอินทรีย์อื่นๆ เป็นต้น (Huang, Ho, & Lee, 1992)

ผักหวานบ้าน (*Sauropus androgynus* L.) อยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae เป็นพืชที่พบในเอเชียรวมทั้งประเทศไทย พบได้ทุกภาคและคนส่วนใหญ่นิยมบริโภค เนื่องจากส่วนยอดอ่อนและใบอ่อน มีรสหวานและเป็นแหล่งอาหารที่มีคุณค่า รวมทั้งมีสรรพคุณทางยา โดยมีสารพาวเวรีน (Papaverine) ที่สกัดได้จากใบและลำต้นในแอลกอฮอล์มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์เอชไอวี-1 รีเวอร์ส ทรานสคริปเทส (HIV-1 Reverse transcriptase) และ 3-O- β -D-Glucosyl-Kaempferol (GKK) ทำให้ไขมันในเลือดลดลง (วิมล ศรีสุข, 2552, น. 172-178) ส่วนสารสกัดจากผักหวานบ้านด้วยเมทานอล มีสมบัติต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH scavenging assay มีค่า IC_{50} $0.43 \pm 0.14\%$ (v/v) และมีปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด 47.20 ± 14.92 มิลลิกรัม GAE/100 กรัมตัวอย่างสด สารสกัดจากปลายยอดผักหวานบ้าน ที่สกัดด้วยเมทานอลเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ช่วยป้องกันการทำลายเซลล์ HEK-293 จากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ (Benjapak, Swatsitang, Senawong, & Tanpanich, 2008, pp.179-200) แต่พบว่าในช่วงที่มีอากาศร้อนและแล้ง ผักหวานบ้านจะเจริญเติบโตช้า มีลักษณะยอดและใบหงิกงอ ทั้งนี้

เนื่องจากเกิดการระบาดของเพลี้ยไฟและหนอนเจาะลำต้น ซึ่งปากดูดของเพลี้ยไฟและหนอนเจาะลำต้น มักจะดูดเอาเชื้อไวรัสติดมาด้วย จึงทำให้ยอดและใบผักหวานบ้านหงิกงอ

รังสีวิทยามีคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อโรคและมีการนำมาปรับปรุงพันธุ์พืช (ยุพารณณ์ ศิริโสม และสมปอง เตชะโต, 2551, น. 141-151) รวมทั้งการเพิ่มปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ ทั้งนี้เนื่องจากรังสีวิทยืเป็นสารอลิซิเทอร์ (Elicitor) ในกลุ่มอะไบโอติก ได้แก่ เกลือของโลหะ รวมไปถึงสภาวะที่ทำให้เกิดความเครียดออกซิเดชัน เช่น การใช้รังสีอัลตราไวโอเลต (UV) และการเกิดบาดแผลของพืช (Benhamou, 1996) และสามารถลดการเสื่อมสภาพของเซลล์และ DNA ดังนั้นจึงมีการใช้รังสีวิทยืในการกระตุ้นการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระและลดสถานะเสื่อมของเซลล์พืช เช่น การวิจัยในสตรอเบอร์รี่และบร็อกโคลี่ (Erkan, et al., 2008; Costa, Vicente, Civello, Chaves, & Martinez, 2006, pp. 204-210) การชะลอการลดลงของวิตามินซีและคาโรทีนอยด์ของคะน้า (ชัยรัตน์ บุรณะ และวาริช ศรีละออง, 2552, น. 137-140)

นอกจากนี้ยังพบว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสามารถกระตุ้นการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระในพืชที่เพาะเลี้ยงได้เช่นกัน โดยสามารถปรับสภาวะสูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง ร่วมกับการใช้เทคนิคการเติมสารนำส่งสัญญาณที่มีผลกระตุ้นกลไกการป้องกันตัวของพืชที่เพาะเลี้ยง เช่น การใช้ฮอร์โมนพืชและการใช้รังสีวิทยื เป็นต้น จากการศึกษาผลของชนิดและ ปริมาณของสารควบคุมการเจริญเติบโตพบว่า สามารถเพิ่มสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดจากแคลลัสของมะระขี้นกและมะระจีนได้ (อรสา สุริยาพันธ์ และสมสุข มัจฉาชีพ, 2552) ส่วนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อประยงค์ (*Aglaia odorata* Lour.) ด้วยสูตรอาหาร MS ที่เติม BA พบว่า มีการสร้างสารทุติยภูมิที่มีรูปแบบสารเคมีที่เป็นรูปแบบเดียวกันกับต้นธรรมชาติ (วินิจ พลศักดิ์, 2546) ส่วนการเพาะเลี้ยงแคลลัสของพืชหลายชนิดสามารถเพิ่มการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระได้เช่น ไอโซฟลาโวนอยด์ (Isoflavonoid) จากต้น *Maackia amurensi* แอนทราควิโนน (Anthraquinone) จากต้น *Rubia cordifolia* และแอนโทไซยานิน (Anthocyanin) จากต้นผักปลังเพิ่มขึ้น



(Fedoreyer, et al., 2000; Masayuki, et al., 1999; Mischenko, et al., 1999; ธนิกันต์ พุ่มชาวสวน และ ศศิธร วงศ์เรือง, 2552)

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการให้รังสีวิธีแก๊สผักหวานบ้านที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อส่งเสริมสมบัติด้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ทั้งหมด โดยทำการเปรียบเทียบผลระหว่างกลุ่มธรรมชาติ (นำปลายยอดมาจากต้นธรรมชาติในเรือนเพาะชำ) กลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง เพื่อนำกลุ่มที่ให้ผลสูงสุดมาใช้ประโยชน์ในการเป็นอาหารเสริมและเป็นยาต่อไป

วิธีการศึกษา

สารเคมีที่ใช้

สูตรอาหาร Murashige, & Skoog. (1962) ฮอร์โมน BA, สาร folin-ciocalteut และ sodium phosphate buffered saline pH 7.4 จากบริษัท Sigma (Aldrich, USA) ส่วนสาร 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azinobis (2, 2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), trolox, gallic acid, aluminum chloride, trichloroacetic acid, potassium dihydrogen phosphate และ hydrogen peroxide จากบริษัท Merck (Darmstadt, Germany) สาร potassium ferricyanide และ ferric chloride จากบริษัท Fluka (Steinheim, Germany) สาร sodium bicarbonate และ ferrous sulfate จากบริษัท Ajax Finechem (NSW, Australia) สาร Isoquercetin, crypto-chlorogenic acid และ astragalin จากบริษัท Biopurify (China)

พันธุ์พืชที่ใช้

ปลายยอดผักหวานบ้าน ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสูตรอาหาร MS (Murashige, & Skoog, 1962) ดัดแปลงที่เติมฮอร์โมน BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (รัชนี เพ็ชรช้าง, 2554, น. 35-42) และปลายยอดผักหวานบ้านจากต้นธรรมชาติ ซึ่งจะเลือกใช้ให้มีลักษณะใกล้เคียงกับที่ได้จากเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เพื่อใช้เปรียบเทียบคุณสมบัติที่ศึกษากับกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง

ขั้นตอนการเตรียมพันธุ์พืช

นำต้นผักหวานบ้านที่ปลูกในจังหวัดอุดรดิตถ์ มาปลูกในกระถาง นำมาเลี้ยงในเรือนเพาะชำ ศูนย์วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรดิตถ์ ฉีดพ่นด้วยสารฆ่าเชื้อราและฮอร์โมน BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2-3 สัปดาห์ เพื่อป้องกันแมลงและโรคพืชและเพิ่มจำนวนยอด

วิธีการฟอกฆ่าเชื้อเนื้อเยื่อ

ตัดปลายยอดผักหวานบ้าน ยาวประมาณ 1-2 นิ้ว มาตัดส่วนใบออก ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วเติมทวิน-20 จำนวน 1-2 หยด เช้า 5 นาที จำนวน 2-3 ครั้ง ฟอกฆ่าเชื้อปลายยอดด้วยสารละลายคลอริกซ์ ความเข้มข้น 15% เดิมทวิน-20 จำนวน 1-2 หยด เช้าเป็นเวลา 7 นาที และฟอกฆ่าเชื้อต่อด้วยสารละลายคลอริกซ์ ความเข้มข้น 10% เดิมทวิน-20 จำนวน 1-2 หยด เช้าเป็นเวลา 5 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ละครึ่ง 5 นาที

วิธีการเตรียมอาหาร MS+BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ใส่น้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตรขนาด 1 ลิตร ปริมาณ 200 มิลลิลิตร ดูดสารละลายต้นตอ (Stock) ของอาหารสูตร MS โดยสารละลายต้นตอที่ 1 จำนวน 10 มิลลิลิตร สารละลายต้นตอที่ 2-3 จำนวน 4 มิลลิลิตร และสารละลายต้นตอที่ 4-7 จำนวน 5 มิลลิลิตร นำมาใส่ลงในขวดปรับปริมาตร เติมน้ำตาลทราย 30 กรัม ฮอร์โมน BA 1 มิลลิกรัม ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร วัด pH ให้ได้ 5.5-5.8 เติมน้ำ 7 กรัม เทอาหารลงในบีกเกอร์สเตนเลส เคี่ยวให้เดือด เทใส่ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีความสูง 1 เซนติเมตร ปิดฝาขวด นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหมอนึ่งความดันที่ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

นำปลายยอดผักหวานบ้านที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้ว วางบนจานเพาะเชื้อ ตัดแต่งให้มีขนาด 0.5-1.0 เซนติเมตร คีบใส่ขวดอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 1 ชิ้น/1 ขวด นำมาเพาะเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีอุณหภูมิ 25 ± 3 °C ความเข้มแสง 1,000-2,000 ลักซ์ ให้แสง 16 ชั่วโมงมืด 8 ชั่วโมงต่อวัน จนถึงสัปดาห์ที่ 6 ที่มีจำนวนยอดเพิ่มขึ้น

ขั้นตอนการส่งเสริมสมบัติต้านอนุมูลอิสระ

นำยอดผักหวานบ้านที่มียอดเพิ่มขึ้นในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเข้าตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ เปิดฝาขวดแล้ววางบนตะแกรงที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว โดยให้ห่างจากหลอดรังสียูวี (EI series UV-C lamp, UVP model UVS-28, Holland) 29 เซนติเมตร จากนั้นเปิดหลอดรังสียูวี ที่มีพลังงานแสง 2.228 จูล ต่อตารางเมตร วัดโดย UV-C light meter (Model: UV-C254 SD, Lutron Electronic, Germany) เป็นเวลา 0 นาที (กลุ่มควบคุม) 5, 10 และ 15 นาที (กลุ่มทดลอง) ตามลำดับ โดยทำกลุ่มละ 10 ซ้ำ ใช้เทคนิคปลอดเชื้อ (Aseptic techniques) ทั้งไว้จนครบ 7 วัน ย้ายไปใส่ในอาหาร สูตร MS+ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตรใหม่ ทำการเพาะเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีอุณหภูมิ 25 ± 3 °C ความเข้มแสง 1,000–2,000 ลักซ์ ให้แสง 16 ชั่วโมง มีด 8 ชั่วโมงต่อวันจนครบ 3 สัปดาห์

วิธีการสกัดสาร

ซึ่งตัวอย่าง 0.2 กรัม หั่นให้เป็นชิ้นเล็ก แล้วบดละเอียดด้วยเครื่องบด หรือโกร่งบด จากนั้นนำมาใส่ในขวดสีชา ทำการหมัก (Macerate) โดยใช้เมทานอล 5 มิลลิตร ทำการเขย่าและสกัดเป็นเวลา 3 วัน (ทำกลุ่มละ 3 ซ้ำ) จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยง ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็ว 650 rpm เพื่อแยกตะกอนออก เก็บสารสกัดในตู้แช่ -20 °C เพื่อรอการนำไปวิเคราะห์ต่อไป

การวิเคราะห์ผล

การวิจัยครั้งนี้เป็นการวิจัยแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design) โดยทำการทดลองกลุ่มละ 3 ซ้ำ และทำการวิเคราะห์ผลดังนี้

การเปรียบเทียบลักษณะของปลายยอดและใบผักหวานบ้านในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองเมื่อให้รังสียูวีซี ในระยะเวลา 5 10 และ 15 นาที หลังให้รังสียูวีซี 1 สัปดาห์ โดยสังเกตลักษณะภายนอก คือลักษณะของยอด ใบ และสีของใบที่ปรากฏ

การศึกษาสมบัติต้านอนุมูลอิสระจะใช้วิธีทดสอบ 3 วิธี ดังนี้

1. วิธี DPPH scavenging assay ดัดแปลงวิธีการของ Vongsak, et al. (2013) ดังนี้

เตรียมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 152 ไมโครโมล โดยละลาย DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 6 มิลลิกรัม กับ เมทานอล 100 มิลลิตร เก็บ

ไว้ที่ -20 °C จนกว่าจะใช้งาน จากนั้นผสมสารสกัดจากปลายยอดผักหวานบ้านแต่ละกลุ่มหรือสารมาตรฐาน (Trolox) 500 ไมโครลิตร กับ สารละลาย DPPH 500 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน (Vortex) ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer (Perkin Elmer, USA) ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร (nm) ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง DPPH* (% Inhibition DPPH*) ดังสมการ

$$\% \text{ Inhibition DPPH}^* = \frac{(A_1 - A_2)}{A_1} \times 100$$

A_1 = ค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุม

A_2 = ค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มทดลอง

นำค่าที่ได้มาทำกราฟระหว่าง % Inhibition DPPH* (แกน y) กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน Trolox (แกน x) เพื่อหาค่า IC_{50} (The half maximal inhibitory concentration) ส่วนสารสกัดที่ทดสอบในทำนองเดียวกันและหาค่า IC_{50}

2. วิธี ABTS scavenging assay ดัดแปลงวิธีการของ Amao, et al. (2001) ดังนี้

เตรียมสารละลาย ABTS^{•+} (2, 2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt radical solution) ความเข้มข้น 7.4 มิลลิโมล กับ สารละลายโพแทสเซียม เปอร์ซัลเฟต ความเข้มข้น 2.6 มิลลิโมล เตรียมสารละลายที่จะใช้ทดลอง (working solution) โดยผสมสารทั้ง 2 ใน อัตราส่วน 1 : 1 จากนั้นทิ้งไว้ 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เจือจางสารละลายดังกล่าว 1 มิลลิลิตร กับเมทานอล 24 มิลลิลิตร วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ให้ได้ 1.1 ± 0.02 หน่วย จากนั้นผสมสารสกัดจากปลายยอดผักหวานบ้าน แต่ละกลุ่มหรือสารมาตรฐาน (Trolox) 100 ไมโครลิตร กับ สารละลาย ABTS 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันจากนั้นทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร คำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง ABTS^{•+} (%Inhibition ABTS^{•+}) และนำค่าที่ได้มาทำกราฟระหว่าง % Inhibition ABTS^{•+} (แกน y)



กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน Trolox ที่ 0 - 100 $\mu\text{g/mL}$ (แกน x) ส่วนสารสกัดที่ทดสอบนำมาทำปฏิกิริยากับ ABTS^{•+} และหาความสามารถต้านออกซิเดชัน ที่เทียบกับกราฟมาตรฐานซึ่งมีหน่วยเป็นมิลลิกรัม TEAC/100 กรัมน้ำหนักสด (Fresh weight ; FW)

3. วิธี FRP (Ferric reducing power) assay ดัดแปลงวิธีการของ Ferreira et al., (2007) ดังนี้

ผสมสารสกัด 250 μL กับ 0.2 M โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 250 μL และ 1 % (w/v) สารละลายโพแทสเซียมเพอร์ริกโซไดไฮไดรด์ 250 μL บ่มทิ้งไว้ 20 นาที ที่อุณหภูมิ 50 °C ผสม 10% (w/v) กรดไตรคลอโรอะซิติก 1 mL. จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 650 rpm. 10 นาที ดูดสารละลายส่วนใส 250 μL เขย่า และผสมน้ำกลั่นปราศจากไอออน 250 μL และ 0.1% (w/v) สารละลายเพอร์ริกคลอไรด์ 50 μL วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer คำนวณผลการทดลองโดยหาปริมาณของ Fe^{2+} แสดงในรูป mM FeSO_4 equivalents/100 g FW

การวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด ดัดแปลงวิธีการจาก Vongsak, et al. (2013)

ผสมสารสกัดจากปลายยอดผักหวานบ้านแต่ละกลุ่มหรือสารมาตรฐาน Gallic acid ที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 200 ไมโครลิตร กับ สารละลาย Folin-Ciocalteu (ที่เจือจาง 1 ส่วนกับน้ำกลั่น 10 ส่วน) 500 ไมโครลิตร เติม 7.5 % (w/v) สารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนต 800 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เขย่าเป็นครั้งคราว วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตรด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer วิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดแสดงในรูป มิลลิกรัม gallic acid equivalents (GAE)/ 100 g FW

การวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ดัดแปลงวิธีการจาก Vongsak, et al. (2013)

ผสมสารสกัดจากปลายยอดผักหวานบ้านหรือสารมาตรฐาน (Quercetin) 500 ไมโครลิตรกับ 2% สารละลายอะลูมิเนียมคลอไรด์ (Aluminum chloride) 500 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที เขย่าเป็นครั้งคราว จากนั้นวัดปฏิกิริยาด้วยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 415 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer โดยมีชุดเปรียบเทียบ (Blank) ที่ไม่มีอะลูมิเนียมคลอไรด์ วิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด มีหน่วยเป็น มิลลิกรัม QE/100 g FW.

สถิติที่ใช้ในการวิจัย

นำข้อมูลที่ได้จากการวิจัยมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance; ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ Least significant difference (LSD) ที่ระดับ $P < 0.05$

ผลการศึกษา

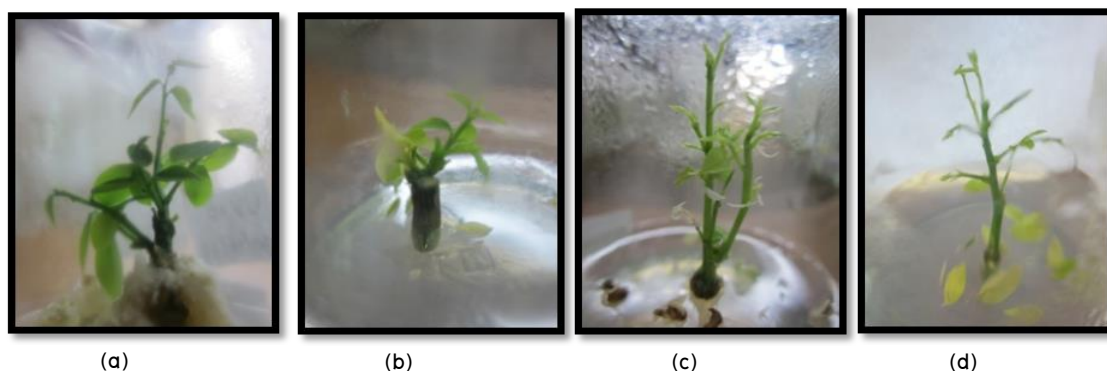
การเปรียบเทียบลักษณะของปลายยอดและใบผักหวานบ้านในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง

พบว่า ลักษณะของปลายยอดผักหวานบ้านในกลุ่มควบคุมจะมีสีของยอดและใบสีเขียวเข้ม ส่วนกลุ่มทดลองที่ให้อาหารเลี้ยงเป็นเวลา 5 นาที ยอด และใบจะมีสีซีดเหลืองและใบร่วงประมาณ 30 % การให้อาหารเลี้ยง 10 นาที ยอดและใบจะมีสีซีดเหลืองและใบร่วงประมาณ 60% และการให้อาหารเลี้ยง 15 นาที ยอดและใบจะมีสีซีดเหลืองและใบร่วงประมาณ 80 % เมื่อเทียบกับพื้นที่สีเขียวทั้งหมดดังตารางที่ 1 และรูปที่ 1

ตารางที่ 1 ลักษณะของปลายยอดผักหวานบ้านในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองหลังให้อาหารเลี้ยง 1 สัปดาห์

กลุ่มที่ศึกษา	ลักษณะของใบ
กลุ่มควบคุม (UV-C 0 นาที)	ยอดและใบมีสีเขียวเข้ม
กลุ่มทดลอง	
UV-C 5 นาที	ยอดและใบซีดเหลืองและใบร่วงประมาณ 30 %
UV-C 10 นาที	ยอดและใบซีดเหลืองและใบร่วงประมาณ 60 %
UV-C 15 นาที	ยอดและใบซีดเหลืองและใบร่วงประมาณ 80 %

หมายเหตุ การซีดเหลืองและการร่วงของใบเปรียบเทียบกับพื้นที่ทั้งหมดของใบพืช



รูปที่ 1 ลักษณะปลายยอดผักหวานบ้านในกลุ่มควบคุม(a)และกลุ่มทดลอง หลังให้รังสียูวีซี (b) 5 นาที่ (c) 10 นาที่ (d) 15 นาที่

สมบัติต้านอนุมูลอิสระ

การศึกษาสมบัติต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากปลายยอดผักหวานบ้านโดย วิธี DPPH scavenging assay จากกราฟของ % scavenging และความเข้มข้นต่างๆ ของสารมาตรฐาน Trolox มีค่า $y = 3.882x + 1.838$, $R^2 = 0.991$ (y คือ % inhibition และ x คือ ความเข้มข้นต่างๆ ของสารมาตรฐาน Trolox) พบว่า กลุ่มให้รังสียูวีซี 5 นาที่มีค่า IC_{50} 10.13 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีค่า $y = 3.860x + 10.882$, $R^2 = 0.991$ (y คือ % inhibition และ x คือ ความเข้มข้นต่างๆ ของสารสกัด) มีค่าต่ำที่สุด แสดงว่ามีสมบัติต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) จากกลุ่มอื่นๆ รองลงมาคือ กลุ่มควบคุม กลุ่มให้รังสียูวีซี 10 นาที่และ 15 นาที่ และกลุ่มธรรมชาติ โดยมีค่า IC_{50} 15.24, 16.21, 16.86 และ 18.77 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

ส่วนการหาด้วยวิธี ABTS scavenging assay จากกราฟของ % scavenging และความเข้มข้นต่างๆ ของ

สารมาตรฐาน Trolox มีค่า $y = 1.485x + 7.104$, $R^2 = 0.994$ (y คือ % scavenging และ x คือ ความเข้มข้นต่างๆ ของสารมาตรฐาน Trolox) พบว่ากลุ่มให้รังสียูวีซี 5 นาที่ มีค่าเฉลี่ยสูงสุด 166.48 มิลลิกรัม TEAC/100 กรัม น้ำหนักสด มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) รองลงมาคือ กลุ่มควบคุม กลุ่มให้รังสียูวีซี 10 นาที่ และ 15 นาที่ และกลุ่มธรรมชาติ โดยมีค่าเฉลี่ย 133.17, 100.15, 68.01 และ 64.06 มิลลิกรัม TEAC/100 กรัม น้ำหนักสด ตามลำดับ

ส่วนการหาด้วยวิธี FRP assay หาจากสมการ $y = 0.002x + 0.134$, $R^2 = 0.994$ (y หมายถึง ค่าการดูดกลืนแสงของ Fe^{2+} และ x คือ ความเข้มข้นของ Fe^{2+}) พบว่า กลุ่มให้รังสียูวีซี 5 นาที่ มีค่าเฉลี่ยสูงสุด 22.72 mM $FeSO_4$ /100 กรัม น้ำหนักสด มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) รองลงมาคือ กลุ่มควบคุม กลุ่มให้รังสียูวีซี 10 นาที่ และ 15 นาที่ และกลุ่มธรรมชาติ โดยมีค่าเฉลี่ย 17.28, 15.33, 13.50 และ 12.72 mM $FeSO_4$ /100 กรัม น้ำหนักสด ตามลำดับ ดังตารางที่ 2



ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยสมบัติต้านอนุมูลอิสระ จากสารสกัดจากปลายยอดผักหวานบ้าน ด้วยวิธี DPPH scavenging assay, ABTS scavenging assay และ FRP assay ระหว่างกลุ่มธรรมชาติ กลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลอง

กลุ่มที่ศึกษา	DPPH scavenging assay IC_{50} (mg/mL)	ABTS scavenging assay (mgTEAC/100g. FW)	FRP assay (mM $FeSO_4/100$ g. FW)
กลุ่มธรรมชาติ	$18.77 \pm 2.83b$	$64.06 \pm 4.31d$	$12.72 \pm 0.81b$
กลุ่มควบคุม (UV-C 0 นาที)	$15.24 \pm 1.37b$	$133.17 \pm 8.69b$	$17.28 \pm 1.63b$
กลุ่มทดลอง			
UV-C 5 นาที	$10.13 \pm 0.91a$	$166.48 \pm 5.35a$	$22.72 \pm 4.27a$
UV-C 10 นาที	$16.21 \pm 1.53b$	$100.15 \pm 4.70c$	$15.33 \pm 1.36b$
UV-C 15 นาที	$16.86 \pm 0.97b$	$68.01 \pm 0.64d$	$13.50 \pm 1.15b$

หมายเหตุ สัญลักษณ์ที่ต่างกันในกลุ่มเดียวกัน มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ปริมาณสารฟีนอลิกและสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด
 ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดวิเคราะห์ด้วยสารละลาย Follin-Ciocalteu โดยเทียบกับค่ามาตรฐานของ Gallic acid equivalents (GAE) หาจากสมการ $y = 0.037x + 0.134$, $R^2 = 0.993$ ซึ่งในกลุ่มที่ให้รังสียูวีซี 5 นาที มีค่าเฉลี่ยมากที่สุด 15.54 มิลลิกรัม GAE/100 กรัม น้ำหนักสด มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) รองลงมาคือ กลุ่มควบคุม กลุ่มให้รังสียูวีซีในเวลา 10 นาที กลุ่มให้รังสียูวีซี 15 นาที และกลุ่มธรรมชาติ มีค่าเฉลี่ยสูงสุด 9.56, 9.08, 7.74 และ 6.02 มิลลิกรัม GAE/100 กรัม น้ำหนักสด ตามลำดับ ส่วนปริมาณสารฟลาโวนอยด์

ทั้งหมด ที่วิเคราะห์ด้วย อะลูมิเนียมคลอไรด์ จากกราฟ การดูดกลืนแสงและความเข้มข้นต่างๆ ของสารมาตรฐาน Quercetin equivalents (QE) กับอะลูมิเนียมคลอไรด์ มีค่า $y = 0.033x - 0.022$, $R^2 = 0.998$ ซึ่งในกลุ่มที่ให้รังสียูวีซี 5 นาที มีค่าเฉลี่ยมากที่สุด 63.64 มิลลิกรัม QE/100 กรัม น้ำหนักสด มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) รองลงมา คือ กลุ่มควบคุม กลุ่มให้รังสียูวีซีในเวลา 10 นาที กลุ่มให้รังสียูวีซี 15 นาที และกลุ่มธรรมชาติ มีค่าเฉลี่ยสูงสุด 50.11, 45.62, 42.52 และ 41.99 มิลลิกรัม QE/100 กรัม น้ำหนักสด ตามลำดับ ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ยปริมาณสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ระหว่างกลุ่มธรรมชาติ กลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลอง

กลุ่มที่ศึกษา	ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด (mg GAE/100g FW)	ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (mg QE/100g FW)
กลุ่มธรรมชาติ	$6.02 \pm 0.49c$	$41.99 \pm 1.49b$
กลุ่มควบคุม (UV-C 0 นาที)	$9.56 \pm 1.28b$	$50.11 \pm 6.35b$
กลุ่มทดลอง		
UV-C 5 นาที	$15.54 \pm 1.56a$	$63.64 \pm 3.67a$
UV-C 10 นาที	$9.08 \pm 0.46b$	$45.62 \pm 3.77b$
UV-C 15 นาที	$7.74 \pm 0.39bc$	$42.52 \pm 4.11b$

หมายเหตุ สัญลักษณ์ที่ต่างกันในกลุ่มเดียวกัน มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

สรุปผลและอภิปรายผลการศึกษา

การให้รังสียูวีซี เป็นเวลา 5 นาที แก่ปลายยอด ผักหวานบ้านที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สามารถส่งเสริมสมบัติต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารฟีนอลิก และสารฟลาโ-

นอยด์ทั้งหมดได้สูงที่สุด กว่ากลุ่มควบคุมกลุ่มทดลอง อื่นๆ และกลุ่มธรรมชาติ โดยมีค่าสมบัติต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH scavenging assay, ABTS scavenging assay และ FRP assay มีค่า IC_{50} 10.13 มิลลิกรัมต่อ ลิตร 166.48 มิลลิกรัม TEAC/100 กรัม น้ำหนักสด

และ 22.72 mM FeSO₄/100 กรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ ส่วนปริมาณสารฟีนอลิกและปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด มีค่า 15.54 มิลลิกรัม GAE/ 100 กรัม น้ำหนักสด และ 63.65 มิลลิกรัม QE/100 กรัม น้ำหนักสด ตามลำดับ

ทั้งนี้เนื่องจากรังสีวิทยีสถาบันการกระตุ้นกระบวนการสร้างสารทุติยภูมิสำคัญในพืช เช่น การสร้างสารต้านอนุมูลอิสระ โดยเฉพาะรังสีวิทยีสถาบันการกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ ดิสมูเทส (Superoxide dismutase) แคทาเลส (Catalase) และเพอร์ออกซิเดส (Peroxidase) ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวจะกระตุ้นกระบวนการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระแบบ enzymatic ที่ส่งผลป้องกัน และลดความเสียหายของเซลล์และ DNA จากภาวะเครียดออกซิเดชันนั่นเอง (Benhamou, 1996; Dornenberg, & Knorr, 1995) สอดคล้องกับณัฐชัย พงษ์ประเสริฐ, Yoshihiko, Sumiko, & Hiroshi. (2554) ที่ศึกษาผลของการใช้รังสีวิทยีสถาบันการลดสภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) และการเกิดอาการสะท้อนหนาวของผลกล้วยหอม และการชะลอการลดลงของวิตามินซีและคาโรทีนอยด์ในคะน้าหลังการเก็บรักษาให้ลดความเสียหายในระดับเซลล์ที่เกิดจากสภาวะเครียดออกซิเดชันได้ (ชัยรัตน์ บุรณะ และวาริช ศรีละออง, 2552) ส่วน Erkan, et al. (2008) ศึกษาการใช้รังสีวิทยีสถาบันการเพื่อลดการเสื่อมสภาพของผลได้ เช่นกัน Costa, et al. (2006) ใช้รังสีวิทยีสถาบันการกระตุ้นการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระในบร็อกโคลีได้เช่นกัน ส่วนการให้รังสีวิทยีสถาบันการ 5 นาที ให้ผลดีที่สุดว่าการให้รังสีวิทยีสถาบันการ 10 และ 15 นาที ทั้งนี้ อาจเนื่องจากการให้รังสีวิทยีสถาบันการที่เหมาะสม (Optimum) จะกระตุ้นให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชันระดับหนึ่งที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระได้ดี (Erkan, et al., 2013) แต่ถ้าได้รับรังสีวิทยีสถาบันการระดับสูงมากและนานเกินไปทำให้พืชเกิดการไหม้และใบร่วงเป็นอันตรายมากขึ้นต่อพืช รวมทั้งการเจริญเติบโตของพืชหยุดชะงัก จึงทำให้กระบวนการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระหยุดชะงักหรือสร้างในปริมาณน้อยลง ทั้งนี้ สอดคล้องกับงานวิจัยของชัยรัตน์ บุรณะ และวาริช ศรีละออง (2552) ที่ศึกษาผลของรังสีวิทยีสถาบันการกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระในคะน้า พบว่าการให้รังสีวิทยีสถาบันการ 3.6 กิโลจูล/ตารางเมตร จะให้ผลดีกว่าการให้รังสีวิทยีสถาบันการ 5.4

กิโลจูล/ตารางเมตร นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับชนิดและชั้นส่วนของพืชในสภาวะแวดล้อมต่างๆ อีกด้วย (Costa, et al., 2006) ส่วนในกลุ่มควบคุม มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสาร ฟีนอลิกและปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด รองลงจากกลุ่มอื่น ทั้งนี้เนื่องจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเช่นฮอร์โมน BA มีผลกระตุ้นการเพิ่มสารต้านอนุมูลอิสระในพืชที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สอดคล้องกับงานวิจัยของ อรสา สุริยาพันธ์ และสมสุข มัจฉาชีพ (2552) ที่ศึกษาผลของชนิดและปริมาณของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชต่อสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดจากแคลลัสของมะระขี้นก และมะระจีน พบว่ามีผลส่งเสริมสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและสารฟีนอลิกทั้งหมดมากขึ้นกว่ากลุ่มควบคุม ส่วนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้น *Maackia amurensis* เพื่อเพิ่มการผลิตสารไอโซฟลาโวนอยด์ พบว่าสามารถเพิ่มสารได้สูงถึง 20.8 มิลลิกรัม/กรัม เซลล์แห้ง เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมฮอร์โมน BA 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA (α -naphthaleneacetic acid) 2 มิลลิกรัม/ลิตร (Fedoreyer, et al., 2000) เช่นเดียวกับการผลิตสารแอนทราควิโนน ของต้น *Rubia cordifolia* ได้สูงถึง 0.62 - 1.22 % ต่อน้ำหนักแห้ง (Mischenko, et al., 1999) และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อประยงค์ (*Aglaia odorata* Lour.) พบว่า สารสกัดจากปลายยอดประยงค์ที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติมฮอร์โมน BA พบว่า สารสกัดจากยอดเป็นสารทุติยภูมิเช่นเดียวกับต้นจากธรรมชาติและเป็นสารรูปแบบเดียวกัน (วินิจ พลศักดิ์, 2546) ดังนั้นกลุ่มควบคุมจึงสามารถสร้างสารต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารฟีนอลิกและสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในปลายยอดผักหวานบ้านในสภาพปลอดเชื้อได้ดีกว่ากลุ่มธรรมชาติ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรดิตถ์ ที่ให้การสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัย และขอบคุณศูนย์วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรดิตถ์ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำวิจัย



เอกสารอ้างอิง

- ชัยรัตน์ บุรณะ และวาริช ศรีละออง. (2552). ผลของรังสี UV-C ต่อกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระในคะน้า. *ว.วิทย. เกษตร*, 40(3), 137-140.
- ณัฐชัย พงษ์ประเสริฐ, Yoshihiko Sekozava, Sumiko Sugaya, และHiroshi Gemma. (2554). ผลของการใช้ รังสี UV-C ต่อการลด Oxidative stress และการเกิด อาการสะท้อนหนาวของผลกล้วยหอม. *ว.วิทย. เกษตร*, 40(3), 208-211.
- ธนิกานต์ พุ่มขาวสวน และศศิธร วงศ์เรือง.(2552). การใช้รังสียูวีซีในการเพิ่มสารแอนโทไซยานิน การเพาะเลี้ยงผักปลังในสภาพปลอดเชื้อ. *วิทยานิพนธ์ ปริญญาโทบริหารธุรกิจ, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่*.
- ไมตรี สุทธิจิตต์, รัตนา บรรเจิดพงศ์ชัย, วีรพล คู่คงวิริยพันธุ์, ศศิธร ศิริอมรพรรณ, ไชยวัฒน์ ไชยสุต, สุพัตรา ประศู-พัฒนา. และคนอื่นๆ. (2555). อนุมูลอิสระและสารต้าน อนุมูลอิสระ. เชียงใหม่: นวัตกรรมสุขภาพ.
- ยุพาภรณ์ ศิริโสม และสมปอง เตชะโต. (2551). ผลของรังสีอัลตราไวโอเลตซี (UV-C) ต่อการกลายพันธุ์ ของกลีอกขิเนีย. *ว.วิทย. เกษตร*, 24(2), 141-151.
- รัชนี เพ็ชรช้าง. (2554). การขยายพันธุ์ผักพื้นบ้านบาง ชนิดด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในตาบลนานกกก อำเภอลับแล จังหวัดอุตรดิตถ์. *วารสารมหาวิทยาลัย นเรศวร*, 19(3), 35-42.
- วินิจ พลศักดิ์. (2546). การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อประยงค์ (*Aglaia odorata* Lour.) และการเปรียบเทียบ สารทุติยภูมิที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกับต้นที่พบใน สภาพธรรมชาติ. *วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบริหารธุรกิจ, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์*.
- วิมล ศรีสุข. (2552). มะรุ่ม: พืชสมุนไพรหลาก ประโยชน์. *จุลสารข้อมูลสมุนไพร*, 26(4), 172-178
- อรสา สุริยาพันธ์ และสมสุข มัจฉาชีพ. (2552). ผลของ สารควบคุมการเจริญเติบโตต่อสมบัติการเป็นสารต้าน อนุมูลอิสระและปริมาณสารฟีนอลในสารสกัดจากแคลลัส ของพืชสมุนไพรที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในสภาพ ปลอดเชื้อ. *ชลบุรี: คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา*.
- Amao, B., Cano, A., & Acosta, M. (2001). The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chem.*, 73, 239-244.
- Benhamou, N. (1996). Elicitor-induced plant defence pathways. *Trends Plant Sci.*, 1, 233-240.
- Benjapak, N., Swatsitang, P., Senawong T., & Tanpanich, S. (2008). Antioxidant capacity of Pak-Wanban (*Sauropus androgynus* L. Merr.) in human embryonic kidney 293 cells (HEK-293 cells). *Agri Sci. J.*, 39(3), 197-200.
- Costa, L., Vicente, R., Civello, M., Chaves, R., & Martinez, A. (2006). UV-C treatment delays postharvest senescence in Broccoli florets. *Postharvest Biol Tec.*, 39, 204-210.
- Dornenburg, H., & Knorr, D. (1995). Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant cell cultures. *Enzyme Microb Tec.*, 17, 674-684.
- Erkan, M., Wang, Y., & Wang, Y. (2008). Effect of UV treatment on antioxidant capacity, antioxidant enzyme activity and decay in strawberry. *Postharvest Biol Tec.*, 48, 163-171.



- Fedoreyev, A., PoKushalova, V., Veselova, V., Glebko, I., Kulesh, I., & Muzarok, et al. (2000). Isoflavonoid production by callus cultures of *Maackia amurensis*. *Fitoterapia*, 71, 365–372.
- Ferreira R., Baptista P., Vilasboas M., & Barros, L. (2007). Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: individual cap and stripe activity. *Food Chem.*, 100, 1511–1516.
- Huang, T., Ho, T., & Lee, Y. (1992). *Phenolic compounds in food and their effects on health*. II. antioxidants and cancer prevention; ACS symposium series 507. Washington, DC.: American Chem. Society.
- Mischenko, P., Fedoreyev, A., Glazunov, P., Chernoded, K., Bulgakov, P., & Zhuravlev, N. (1999). Anthra quinone production by callus cultures of *Rubia cordifolia*. *Fitoterapia*, 70, 552–557.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiol. Plant.*, 15, 473–497.
- Vongsak, B., Sithisarn, P., Mangmool, S., Thongpraditchote, S., Wongkrajang, Y., & Gritsanapan. (2013). Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaf extract by the appropriate extraction method. *Ind Crop Prod.*, 44, 566–571.
- Wink, M. (1988). Plant breeding: important of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. *Theoretical and Apply Gene.*, 75, 225–23.