

ผลของระยะเวลาเพาะเลี้ยงต่อปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระของ ยอดหัวข้าวเย็นเหนือ (*Smilax corbularia*) ในสภาพปลอดเชื้อ Effect of Culture Periods on Antioxidant Contents of *In Vitro Smilax corbularia* Shoots

เยาวพา จิระเกียรติกุล*, เจิมอรุณ อุทัยแจ่มศรีผล, ภาณุมาศ ฤทธิไชย

สาขาวิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

อรุณพร อิฐรัตน์

สถานการแพทย์แผนไทยประยุกต์ คณะแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

Yaowapha Jirakiattikul*, Jermaroon Autaijamsripon and Panumart Rithichai

Department of Agricultural Technology, Faculty of Science and Technology,

Thammasat University, Rangsit Centre, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

Arunporn Itharat

Department of Applied Thai Traditional Medicine, Faculty of Medicine,

Thammasat University, Rangsit Centre, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

บทคัดย่อ

หัวข้าวเย็นเหนือ (*Smilax corbularia* Kunth.) เป็นพืชสมุนไพรที่เหง้ามีสรรพคุณรักษาโรคมะเร็ง และเอ็ดส์ มีรายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อขยายพันธุ์พืชชนิดนี้แล้ว แต่ยังไม่มีการศึกษาถึงผลของระยะเวลาการเพาะเลี้ยงต่อปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้นในการศึกษารั้วนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงต่อปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระของยอดหัวข้าวเย็นเหนือที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อ โดยเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อบนอาหารสูตร MS (Murashige & Skoog) ที่เติม BA (benzyladenine) ความเข้มข้น 1.0 mg/L ร่วมกับ IAA (indole-3-acetic acid) ความเข้มข้น 0.5 mg/L และน้ำมะพร้าวความเข้มข้น 15 % (v/v) เป็นเวลานาน 4, 6, 8, 10 และ 12 สัปดาห์ พบว่ายอดหัวข้าวเย็นเหนือที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (EC₅₀) เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง โดยยอดที่เพาะเลี้ยงนาน 12 สัปดาห์ มีปริมาณสารดังกล่าวสูงสุด 84.92±5.88 mg GAE/g dry extract 107.56±7.19 mg CE/g dry extract และ 15.75±0.88 µg/mL ตามลำดับ

*ผู้รับผิดชอบบทความ : yjirakia@tu.ac.th

คำสำคัญ : หัวข้าวเย็นเหนือ; ระยะเวลาเพาะเลี้ยง; สารต้านอนุมูลอิสระ; สมุนไพร

Abstract

Smilax corbularia Kunth. is a medicinal plant which its rhizomes used to treat cancers and AIDS. Plant tissue culture for propagation of *S. corbularia* has been studied but there is no report on the effect of *in vitro* culture periods on its antioxidant contents. Therefore, the objectives of this study was to investigate the effects of culture periods on antioxidant contents of *S. corbularia* shoots grown under aseptic conditions. Single node segments were cultured on MS (Murashige and Skoog) medium supplemented with 1.0 mg/L BA (benzyladenine), 0.5 mg/L IAA (indole-3-acetic acid) and 15 % (v/v) coconut water for 4, 6, 8, 10 and 12 weeks. The results showed that total phenolic and total flavonoid contents including DPPH radical scavenging activities of *S. corbularia* regenerated shoots increased along the culture periods. The 12 week-old regenerated shoots exhibited the highest contents of total phenolic (84.92 ± 5.88 mg GAE/g dry extract) and total flavonoid (107.56 ± 7.19 mg CE/g dry extract). The greatest DPPH radical scavenging activity also obtained from the 12 week-old regenerated shoots ($EC_{50} = 15.75 \pm 0.88$ μ g/mL).

Keywords: *Smilax corbularia* Kunth.; culture period; antioxidant; medicinal plant

1. บทนำ

หัวข้าวเย็นเหนือ (*Smilax corbularia* Kunth.) เป็นไม้เถาเลื้อยเนื้อแข็ง มีลำต้นใต้ดินสะสมอาหารในเหง้า (rhizome) จัดอยู่ในวงศ์ Smilacaceae ถิ่นกำเนิดอยู่ในทวีปเอเชียและอเมริกา [1] ในประเทศไทยพบหัวข้าวเย็นเหนือแพร่กระจายบริเวณป่าทั่วภูมิภาค โดยเฉพาะอย่างยิ่งทางภาคเหนือ [2] แพทย์แผนไทยนิยมนำเหง้าของหัวข้าวเย็นเหนือมาใช้เพื่อรักษาโรคต่าง ๆ เช่น รักษาอาการร้อนใน น้ำเหลืองเสีย และเส้นเอ็นพิการ [3] นอกจากนี้มีรายงานการใช้เหง้าของหัวข้าวเย็นเหนือเป็นตำรับยาร่วมกับหัวข้าวเย็นอีก 4 ชนิด คือ *Pygmaeopremna herbacea* (Roxb.) Mold., *Dioscorea membranacea* Pierre ex Prain & Burkill., *D. birmanica* Prain & Burkill และ *S. glabra* Roxb. เพื่อรักษาโรคมะเร็งและเอดส์ [4] เหง้า

ของหัวข้าวเย็นเหนือประกอบด้วยสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่สำคัญ ได้แก่ phenolic compound [5] astilbin quercetin engeletin [6] และ steroid saponin [7] ซึ่งสารเหล่านี้มีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

ปัจจุบันมีการนำเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาใช้ในการขยายพันธุ์พืชสมุนไพรและผลิตสารทุติยภูมิที่สำคัญ เนื่องจากสามารถผลิตสารได้อย่างต่อเนื่องและให้คุณภาพสม่ำเสมอ โดยปริมาณสารทุติยภูมิของพืชที่ผลิตได้ในสภาพปลอดเชื้อนี้จะไม่แปรผันตามสภาพภูมิประเทศและสภาพภูมิอากาศ [8] ซึ่งการขยายพันธุ์หัวข้าวเย็นเหนือด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้มีรายงานแล้วโดย Jirakiattikul และคณะ [9] อย่างไรก็ตาม ปริมาณสารทุติยภูมิของยอดที่พัฒนาจากเนื้อเยื่อพืชนั้นยังไม่มีรายงาน โดยระยะเวลาในการ

เพาะเลี้ยงเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อปริมาณสารทุติยภูมิของพืชที่เพาะเลี้ยง [10] ดังรายงานของ ทิพย์สุนันธ์ [11] ที่พบว่ายอดหัวข้าวเย็นใต้ (*D. membranacea*) ที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อนาน 4 และ 6 สัปดาห์ มีปริมาณสาร dioscorealide B น้อย และปริมาณสารเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 6-10 สัปดาห์ และสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงยอดนาน 10 และ 12 สัปดาห์ (1.90 ± 0.18 และ 1.72 ± 0.06 % w/w ตามลำดับ) หลังจากนั้นในสัปดาห์ที่ 14 และ 16 ของการเพาะเลี้ยงปริมาณสารดังกล่าวจะลดลง ในขณะที่การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของ *Hypericum perforatum* ในอาหารเหลวพบว่าหลังจากการเพาะเลี้ยง 10 วัน เซลล์มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว และมีการสร้างสารฟลาโวนอยด์ (flavonoid) เพิ่มขึ้น โดยในวันที่ 25 ของการเพาะเลี้ยงมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์สูงสุด (16 mg/g DW) และค่อย ๆ ลดลงหลังจากการเพาะเลี้ยงนาน 30 วัน [10] จากการทดลองดังกล่าวจะเห็นได้ว่าระยะเวลาเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมจะทำให้สามารถผลิตสารทุติยภูมิหรือสารต้านอนุมูลอิสระได้ในปริมาณสูง ซึ่งระยะเวลาดังกล่าวจะต่างกันไปในพืชแต่ละชนิด ดังนั้นในการทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของยอดหัวข้าวเย็นเหนือที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อ

2. อุปกรณ์และวิธีการ

นำยอดหัวข้าวเย็นเหนือที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog) ที่เติม BA ความเข้มข้น 1.0 mg/L ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 0.5 mg/L และน้ำมะพร้าวความเข้มข้น 15 % (v/v) มาขยายเลี้ยง (subculture) โดยตัดแบ่งให้แต่ละข้อยาวประมาณ 1 cm ทุก 4 สัปดาห์ เมื่อได้ยอด

มากเพียงพอต่อการทดลอง นำยอดมาตัดและเพาะเลี้ยงขึ้นส่วนข้อบนอาหารสูตรเดิมเป็นระยะเวลานาน 4, 6, 8, 10 และ 12 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design มี 5 สิ่งทดลอง แต่ละสิ่งทดลองมี 3 ซ้ำ และแต่ละซ้ำมีจำนวนยอดมากพอที่จะให้น้ำหนักแห้ง 2 g โดยอาหารที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 3 % (w/v) ผงวุ้น (agar) 0.8 % (w/v) pH ของอาหารอยู่ในช่วง 5.6-5.8 ปรับด้วย NaOH ความเข้มข้น 1 N ก่อนนำอาหารเพาะเลี้ยงไปนึ่งกำจัดเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

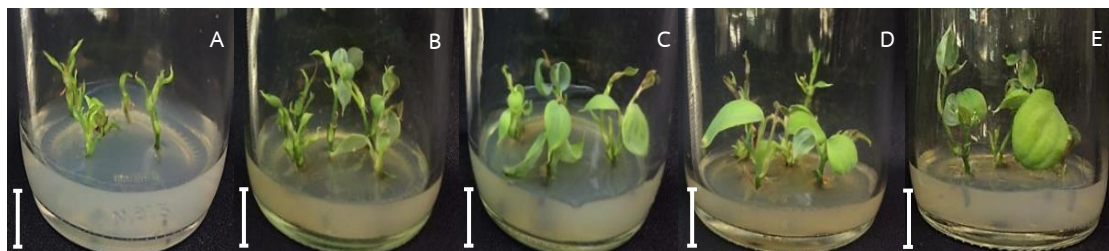
เมื่อครบกำหนดระยะเวลาของการเพาะเลี้ยง ชั่งน้ำหนักสดยอด และนำไปอบที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักแห้งยอด จากนั้นนำตัวอย่างแห้งมาสกัดตามวิธีของ Jaiarree [12] ด้วย ethanol ความเข้มข้น 95 % ใช้ตัวอย่างแห้งและ ethanol อัตรา 1:3 สกัดซ้ำ 3 ครั้ง แต่ละครั้งสกัดนาน 3 วัน นำสารสกัดที่ได้มาระเหยใน hot air oven ที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง จนกว่าสารสกัดตัวอย่างจะมีน้ำหนักคงที่ นำสารสกัดที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity ตามวิธีการวิเคราะห์ที่ได้อธิบายโดย เจริมอรุณ และคณะ [13] นำข้อมูลมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) ตามวิธีการ CRD เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยใช้โปรแกรม SAS

3. ผลและวิจารณ์ผล

3.1 น้ำหนักสดและแห้งยอด

การเพาะเลี้ยงข้อหัวข้าวเย็นเหนียวบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1.0 mg/L ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 0.5 mg/L และน้ำมะพร้าวความเข้มข้น 15 % (v/v) เป็นระยะเวลา 4, 6, 8, 10 และ 12 สัปดาห์ พบว่ายอดหัวข้าวเย็นเหนียวที่พัฒนาในแต่ละระยะเวลามีความสำคัญยิ่งทางสถิติ (รูปที่ 1 และ 2) โดยยอดที่เพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ มีน้ำหนักสดและแห้งน้อยที่สุดเท่ากับ 27.21 ± 2.96 และ 4.50 ± 0.45 mg/shoot ตามลำดับ ซึ่งน้อยกว่าอย่างมีนัย

สำคัญยิ่งทางสถิติกับน้ำหนักสดและแห้งของยอดที่เพาะเลี้ยงนาน 6-12 สัปดาห์ (38.34 ± 5.51 ถึง 42.66 ± 1.25 และ 6.55 ± 0.87 ถึง 9.28 ± 0.87 mg/shoot ตามลำดับ) โดยยอดที่เพาะเลี้ยงนาน 8 สัปดาห์มีน้ำหนักสดและแห้งสูงสุด 42.66 ± 1.25 และ 9.28 ± 0.87 mg/shoot ตามลำดับ แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับน้ำหนักสดและแห้งของยอดที่เพาะเลี้ยงนาน 10 (41.40 ± 5.34 และ 8.48 ± 0.94 mg/shoot ตามลำดับ) และ 12 สัปดาห์ (38.34 ± 5.51 และ 8.54 ± 0.17 mg/shoot ตามลำดับ)

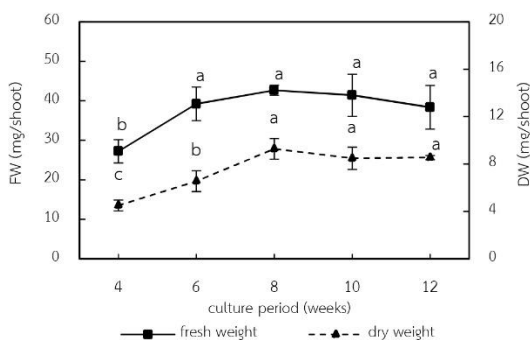


รูปที่ 1 ยอดหัวข้าวเย็นเหนียวที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1.0 mg/L ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 0.5 mg/L และน้ำมะพร้าวความเข้มข้น 15 % (v/v) เป็นเวลานาน (A) 4 (B) 6 (C) 8 (D) 10 และ (E) 12 สัปดาห์ (scale bar = 1 cm)

การทดลองครั้งนี้เห็นได้ว่าในช่วง 4 สัปดาห์แรกของการเพาะเลี้ยง ยอดที่พัฒนามีน้ำหนักสดและแห้งน้อยที่สุด อาจเนื่องจากเป็นระยะที่ขึ้นส่วนพืชเริ่มปรับตัวให้เข้ากับอาหาร และสภาพแวดล้อมที่เพาะเลี้ยงเพื่อเตรียมพร้อมสำหรับการเจริญเติบโต [14] ในขณะที่ยอดที่เพาะเลี้ยงนาน 6-8 สัปดาห์เป็นระยะที่เซลล์พืชเกิดการแบ่งตัวและเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว อีกทั้งอาหารเพาะเลี้ยงที่มีองค์ประกอบของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสม จะกระตุ้นให้พืชเกิดการเพิ่มจำนวนเซลล์ ตลอดจนเกิดการขยายขนาดและยืดยาวของเซลล์ ส่งผลให้ยอดที่พัฒนามีขนาดน้ำหนักสดและแห้งเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว [15] อย่างไรก็ตาม เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 10-12 สัปดาห์ ยอดที่พัฒนา

เริ่มมีน้ำหนักสดและแห้งลดลง ถึงแม้จะไม่แตกต่างกันทางสถิติ (รูปที่ 2) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะสารต่าง ๆ ในอาหารเพาะเลี้ยงเริ่มไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของพืช ซึ่งสอดคล้องกับ Rout และคณะ [16] ที่ได้กล่าวไว้ว่าหากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานานเกินไปส่งผลให้พืชมีการเจริญเติบโตลดลง เนื่องจากพืชดูดใช้ธาตุอาหารต่าง ๆ ในอาหารเพาะเลี้ยงจนหมด อีกทั้งปล่อยสารพิษที่ยับยั้งการเจริญเติบโตออกมาบริเวณรอบผล ผลการทดลองนี้เป็นไปในทิศทางเดียวกับรายงานของยอดหัวข้าวเย็นใต้ (*D. membranacea*) ที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อนาน 4-16 สัปดาห์ พบว่ายอดที่เพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ มีน้ำหนักสดและแห้งน้อยที่สุด จากนั้นน้ำหนักสดและแห้งของยอดเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดย

ยอดที่เพาะเลี้ยงนาน 12 สัปดาห์ มีน้ำหนักสดและแห้งสูงสุด อย่างไรก็ตาม น้ำหนักสดและแห้งเริ่มลดลงเมื่อเพาะเลี้ยงนาน 14-16 สัปดาห์ [11] ส่วนรัชนิวรรณและคณะ [17] ที่เพาะเลี้ยงข้อหัวข้าวเย็น (*D. birmanica*) ในสภาพปลอดเชื้อเป็นเวลานาน 4-12 สัปดาห์ พบว่ายอดที่เพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ มีน้ำหนักสดและแห้งน้อยที่สุด ในขณะที่ช่วงสัปดาห์ที่ 6-10 ของการเพาะเลี้ยงยอดที่พัฒนามีน้ำหนักสดและแห้งเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเพาะเลี้ยงนาน 12 สัปดาห์ หรือ Wang และคณะ [10] ที่เพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของ *H. perforatum* เป็นเวลา 5-30 วัน พบว่าเซลล์มีการเจริญเติบโตช้าในช่วง 10 วันแรกของการเพาะเลี้ยง (lag phase) แต่หลังจากการเพาะเลี้ยง 10 วัน พบว่าเซลล์มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว (exponential phase) และในวันที่ 20 ของการเพาะเลี้ยง เซลล์มีน้ำหนักแห้งสูงสุดเท่ากับ 8.2 g/l หลังจากนั้นน้ำหนักแห้งของเซลล์จะคงที่ และลดลงเมื่อเพาะเลี้ยงนาน 25 วัน (stationary phase) ดังนั้นระยะเวลาในการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืชในสภาพปลอดเชื้อจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของพืช และเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยง



รูปที่ 2 น้ำหนักสดและแห้งของยอดหัวข้าวเย็นเหนือที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อเป็นเวลานาน 4-12 สัปดาห์

3.2 ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ

3.2.1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของยอดหัวข้าวเย็นเหนือที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อนาน 4-12 สัปดาห์ พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติเมื่อยอดหัวข้าวเย็นเหนือพัฒนาในสภาพปลอดเชื้อเป็นระยะเวลาแตกต่างกัน (รูปที่ 3A) โดยยอดที่เพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดน้อยสุดเท่ากับ 36.35 ± 2.11 mg GAE/g dry extract ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติกับปริมาณสารดังกล่าวของยอดที่เพาะเลี้ยงนาน 6 สัปดาห์ (37.31 ± 3.01 mg GAE/g dry extract) และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเพิ่มขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงยอดนาน 8-10 สัปดาห์ (51.79 ± 4.06 และ 52.33 ± 2.36 mg GAE/g dry extract ตามลำดับ) และสารดังกล่าวมีค่าสูงสุด 84.92 ± 5.88 mg GAE/g dry extract เมื่อเพาะเลี้ยงยอดนาน 12 สัปดาห์

การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงมีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของยอดหัวข้าวเย็นเหนือที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อ โดยปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่เพาะเลี้ยง ซึ่งปริมาณสารทุติยภูมิที่เพิ่มขึ้นอาจเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของพืช รวมถึงสารควบคุมการเจริญเติบโตในอาหารเพาะเลี้ยงที่ส่งเสริมการสร้างสารสำคัญ [18] จากการทดลองครั้งนี้สอดคล้องกับรายงานของ Figueiról และคณะ [19] ที่เพาะเลี้ยงยอดของ *H. perforatum* บนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 4.40 mM ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.05 mM เป็นเวลานาน 0-30 วัน พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในช่วงวันที่ 20-30 ของการเพาะเลี้ยง (33.2 - 35.3 mg/g FM ตามลำดับ) เช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยง

แคลลัสของกระเจี๊ยบแดง HS003 บนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 4.54 μM ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 4.44 μM นาน 7-28 วัน พบว่าแคลลัสสร้างสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเพิ่มตามระยะเวลาที่เพาะเลี้ยง โดยแคลลัสที่เพาะเลี้ยงนาน 28 วัน มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุด 55.26 ± 4.72 mg GAE/g dry extract [20] และ Cui และคณะ [21] ที่เพาะเลี้ยงรากพิเศษ (adventitious root) ของ *H. perforatum* อายุ 3 สัปดาห์ บนอาหารสูตร $\frac{1}{2}$ MS ที่เติม kinetin (6-furfuryl-aminopurine) ความเข้มข้น 0.1 mg/L ร่วมกับ IBA (Indole-3-butyric acid) ความเข้มข้น 1 mg/L ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ (bioreactor) นาน 0-5 สัปดาห์ พบว่าตลอดช่วงระยะเวลาการเพาะเลี้ยงรากมีการสร้างสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยในสัปดาห์ที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงรากมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุด 56.47 ± 0.22 mg/g DW ในขณะที่การเพาะเลี้ยงยอดของพืชบางชนิด เช่น หัวข้าวเย็นใต้ (*D. membranacea*) [11] พรหมมี (*Bacopa monnieri*) [13] และหัวข้าวเย็น (*D. birmanica*) [17] ที่พบว่าระยะเวลาเพาะเลี้ยงไม่มีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

อย่างไรก็ตาม ในพืชบางชนิด การเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานานส่งผลเสียต่อการสะสมสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด เช่น การเพาะเลี้ยงยอดของกล้วยหอมทองบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 22.19 μM นาน 2-8 สัปดาห์ พบว่ายอดที่พัฒนามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเพิ่มขึ้นในช่วง 2-6 สัปดาห์ของการเพาะเลี้ยง โดยยอดที่เพาะเลี้ยงนาน 6 สัปดาห์ มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุด (174.47 ± 8.48 mg GAE/g dry extract) และปริมาณสารดังกล่าวลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเพาะเลี้ยงนาน 7 และ 8 สัปดาห์

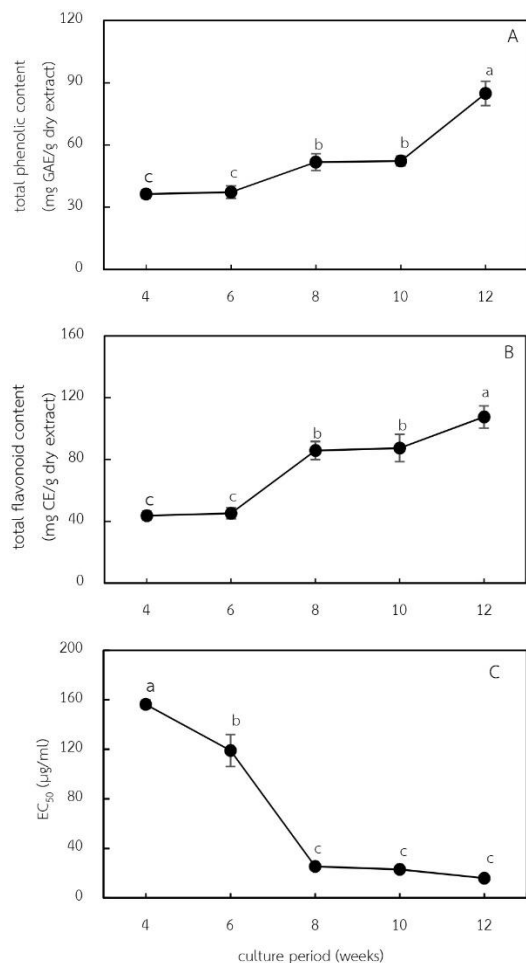
[22] เช่นเดียวกับรายงานของ Szopa และคณะ [23] ที่เพาะเลี้ยงยอดของ *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. ในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3 mg/L และ NAA ความเข้มข้น 1 mg/L นาน 10-60 วัน พบว่ายอดที่พัฒนามีปริมาณกรดฟีนอลิกเพิ่มขึ้นในช่วง 10-30 วันของการเพาะเลี้ยง โดยยอดที่เพาะเลี้ยงนาน 30 วัน มีปริมาณกรดฟีนอลิกสูงสุด (38.46 ± 3.60 mg/100 g DW) และหลังจากนั้นปริมาณสารดังกล่าวเริ่มลดลงเมื่อเพาะเลี้ยงนาน 40-60 วัน หรือการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของ *Celastrus paniculatus* ในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม 2, 4-D ความเข้มข้น 1.5 mg/L นาน 24-72 ชั่วโมง พบว่าเซลล์แขวนลอยมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุดที่ 48 ชั่วโมง (22.45 ± 0.63 $\mu\text{g/g}$) และลดลงเมื่อเพาะเลี้ยงนาน 72 ชั่วโมง [24]

3.2.2 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของยอดหัวข้าวเย็นเหนือมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานานต่างกัน (รูปที่ 3B) โดยยอดที่เพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดน้อยสุด 43.65 ± 2.92 mg CE/g dry extract ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติกับปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของยอดที่เพาะเลี้ยงนาน 6 สัปดาห์ (45.19 ± 3.58 mg CE/g dry extract) จากนั้นในช่วง 8-10 สัปดาห์ ยอดมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงขึ้น (85.83 ± 5.87 และ 87.46 ± 8.84 mg CE/g dry extract ตามลำดับ) และสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงยอดนาน 12 สัปดาห์ โดยมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด 107.56 ± 7.19 mg CE/g dry extract แสดงให้เห็นว่ายอดหัวข้าวเย็นเหนือที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่เพาะเลี้ยง ซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับ

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และสอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในพืชอื่น ๆ เช่น ในแคลลัสกระเจี๊ยบแดง HS003 พบว่าแคลลัสที่เพาะเลี้ยงนาน 28 วัน มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงสุด 20.00 ± 2.19 mg CE/g dry extract ซึ่งสูงกว่าปริมาณดังกล่าวของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7-21 วัน [20] เช่นเดียวกับรากพิเศษของ *H. perforatum* ที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อมีการสะสมสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่เพาะเลี้ยง โดยรากที่เพาะเลี้ยงนาน 5 สัปดาห์ มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงสุด 35.01 ± 1.26 mg/g DW [21] ในขณะที่ยอดของ *H. perforatum* ที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อนาน 5-30 วัน มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ (2.84 - 4.52 mg/g FM) [19] ส่วนยอดของกล้วยหอมทองที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อเป็นเวลานาน 2-8 สัปดาห์ พบว่าในช่วง 2-5 สัปดาห์ของการเพาะเลี้ยง ยอดมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่ปริมาณสารดังกล่าวมีค่าสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงนาน 6 สัปดาห์ (158.13 ± 13.92 mg CE/g dry extract) จากนั้นในช่วงสัปดาห์ที่ 7-8 ปริมาณสารดังกล่าวลดลงอย่างมีนัยสำคัญ [22] นอกจากนี้ Szopa และคณะ [23] รายงานว่ายอดของ *S. chinensis* ที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อนาน 30 วัน มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์สูงสุด 17.21 ± 2.15 mg/100 g DW และปริมาณสารดังกล่าวค่อย ๆ ลดลงหลังจากการเพาะเลี้ยงนาน 40-60 วัน ดังนั้นจะเห็นได้ว่าระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการสร้างและสะสมสารทุติยภูมิจะแตกต่างกันไปในพืชแต่ละชนิด ซึ่งนอกจากระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงแล้ว ชนิดพืช อาหารเพาะเลี้ยง และรูปแบบการเพาะเลี้ยงถือเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการสร้างสารทุติยภูมิด้วยเช่นกัน [8]

3.2.3ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH



รูปที่ 3 ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ (A) สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (B) ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (C) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (EC₅₀) ของยอดหัวข้าวเย็นเหนือที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อเป็นเวลานาน 4-12 สัปดาห์

ยอดหัวข้าวเย็นเหนือที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อเป็นระยะเวลานานต่างกันมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (รูปที่ 3C) โดยยอดที่เพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH น้อยสุด โดยมีค่า EC₅₀ เท่ากับ 156.33 ± 3.47 μg/mL จากนั้นฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของยอดหัวข้าวเย็นเหนือดีขึ้นตามระยะเวลาที่เพาะ

เลี้ยงในสัปดาห์ที่ 8-10 (ค่า EC_{50} เท่ากับ 25.44 ± 0.12 ถึง 23.00 ± 2.60 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ) และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุดโดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 15.93 ± 0.70 $\mu\text{g/mL}$ เมื่อเพาะเลี้ยงยอดนาน 12 สัปดาห์ ส่วน BHT ซึ่งเป็นสารแอนติออกซิแดนซ์มาตรฐานมีค่า EC_{50} เท่ากับ 15.73 ± 0.77 $\mu\text{g/mL}$ แสดงให้เห็นได้ว่ายอดหัวข้าวเย็นเหนือที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีขึ้นตามระยะเวลาที่เพาะเลี้ยงซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้นที่มีค่าสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงนาน 12 สัปดาห์ ในขณะที่พืชบางชนิด ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงไม่มีผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้แก่ หัวข้าวเย็นใต้ (*D. membranacea*) [11] พรหมมี [13] หัวข้าวเย็น (*D. birmanica*) [17] เป็นต้น

เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของยอดหัวข้าวเย็นเหนือที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อที่ระยะเวลาเพาะเลี้ยงต่าง ๆ จากการทดลองนี้กับฤทธิ์ของเหง้าที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติที่รายงานโดย Ruangnoo [26] พบว่าเหง้าที่เจริญเติบโตตามธรรมชาติมีค่า EC_{50} เท่ากับ 3.91 ± 0.03 $\mu\text{g/mL}$ ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีกว่ายอดหัวข้าวเย็นเหนือที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อ โดยมีรายงานพืชสมุนไพรหลายชนิดที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อมีปริมาณสารทุติยภูมิน้อยกว่าและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำกว่าต้นที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ ดังรายงานของ อรุณา [27] ที่พบว่าเหง้าของหัวข้าวเย็น (*D. birmanica*) อายุมากกว่า 1 ปี ที่พัฒนาในสภาพธรรมชาติดีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (259.27 ± 7.34 mg GAE/g dry extract) และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (EC_{50} เท่ากับ 9.35 ± 0.62 $\mu\text{g/mL}$) สูงกว่าค่าดังกล่าวของยอดหัวข้าวเย็นอายุ 2 เดือน ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (44.24 ± 8.47

mg GAE/g dry extract และ EC_{50} เท่ากับ 53.67 ± 4.16 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ) หรือพรมมิที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (686.5 $\mu\text{g/mL}$) สารฟลาโวนอยด์ (585.5 $\mu\text{g/mL}$) และมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH (76.55 %) สูงกว่าปริมาณที่พบในแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบในสภาพปลอดเชื้อ (660.5 $\mu\text{g/mL}$, 535 $\mu\text{g/mL}$ และ 71.17 % ตามลำดับ) [28] การที่ยอดหัวข้าวเย็นเหนือที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH น้อยกว่าเหง้าที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาตินั้น อาจเนื่องมาจากยอดหัวข้าวเย็นเหนือที่เพาะเลี้ยงยังมีอายุน้อยและเป็นส่วนยอดจึงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำกว่าเหง้าที่มีอายุมากกว่าและเป็นส่วนที่สะสมสารทุติยภูมิของต้นที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ ดังที่ Banthorpe [29] ได้รายงานไว้ว่าการสังเคราะห์สารทุติยภูมิในพืชมีความสัมพันธ์กับระยะเวลาการเจริญเติบโตของพืช โดยในช่วงที่พืชเจริญเติบโตเต็มที่หรือในระยะที่พืชยังมีอายุน้อยอาจมีการสังเคราะห์และสะสมสารทุติยภูมิบางชนิดในปริมาณมาก ซึ่งความสัมพันธ์นี้จะแตกต่างกันไปในพืชแต่ละชนิด อย่างไรก็ตามเทคนิคทางชีวภาพ เช่น การเติมสารตั้งต้น การเติมสารกระตุ้น หรือการตรึงเซลล์ สามารถนำมาประยุกต์ใช้ร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อให้พืชที่เพาะเลี้ยงผลิตสารทุติยภูมิที่สำคัญให้มีปริมาณสูง [30] โดยปริมาณสารทุติยภูมิของพืชที่ผลิตในสภาพปลอดเชื่อนี้จะไม่แปรผันตามสภาพภูมิประเทศและสภาพภูมิอากาศ [8]

3.2.4 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของยอดหัว

ข้าวเย็นเหนือที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อเป็นเวลานาน 4 ถึง 12 สัปดาห์ พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (r เท่ากับ 0.877) (ตารางที่ 1) นอกจากนี้ สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดมีความสัมพันธ์เชิงลบกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (r เท่ากับ -0.735 และ -0.924 ตามลำดับ) แสดงให้เห็นว่า เมื่อยอดหัวข้าวเย็นเหนือมีสาร

ประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเพิ่มขึ้นจะส่งผลให้มีสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเพิ่มขึ้น และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีขึ้นด้วย ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Makowczynska และคณะ [25] ที่พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ละสารฟลาโวนอยด์ในยอด *Ballota nigra* L. มีความสัมพันธ์เชิงลบกับฤทธิ์อนุมูลอิสระ DPPH (r เท่ากับ -0.862 และ -0.670 ตามลำดับ)

ตารางที่ 1 ค่าสหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) ระหว่างปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH

	total phenolic content	total flavonoid content	DPPH
total phenolic content	-	0.877**	-0.735**
total flavonoid content		-	-0.924**
DPPH			-

**มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่ายอดหัวข้าวเย็นเหนือที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อมีสารต้านอนุมูลอิสระเช่นเดียวกับเหง้าที่ปลูกในธรรมชาติ ถึงแม้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่า แต่หากพิจารณาระยะเวลาในการผลิตสารจากยอดที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อพบว่าสามารถสร้างเร็วกว่าเพียง 12 สัปดาห์ ในขณะที่เหง้าที่ปลูกตามธรรมชาติใช้เวลามากกว่า 1 ปี นอกจากนี้การผลิตสารจากยอดในสภาพปลอดเชื้อจะสามารถผลิตอย่างต่อเนื่อง การศึกษาต่อไปก็จะนำสารสกัดที่ได้จากยอดหัวข้าวเย็นเหนือที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อนี้ไปทดสอบกับเซลล์มะเร็งเพิ่มเติมอีกด้วย

4. สรุปผลการทดลอง

ยอดหัวข้าวเย็นเหนือที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อมีน้ำหนักรากและแห้ง รวมถึงปริมาณสารประกอบ

ฟีนอลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (EC_{50}) เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง โดยยอดที่เพาะเลี้ยงนาน 12 สัปดาห์ มีปริมาณสารฟีนอลิกสูงสุด และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ทนสนับสนุนการวิจัยจากกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ภายใต้ “ทุนวิจัยทั่วไป” ตามสัญญาเลขที่ ทป 2/7/2560

6. รายการอ้างอิง

- [1] Shi-Chao, C., Ying-Xiong, Q., Ai-Li, W., Cameron, K.M. and Cheng-Xin, F., 2006, A phylogenetic analysis of the Smilacaceae

- based on morphological data, *Acta Phytotaxon. Sin.* 44: 113-125.
- [2] แก้ว กาญจนนา, 2547, ตำราสมุนไพรบำบัดโรค ชุดที่ 2 สูตรลับตำรับสมุนไพรรักษาโรคเบาหวาน, สำนักพิมพ์น็อนบุ๊คมีเดีย, นนทบุรี, 100 น.
- [3] เพ็ญญา ททรัพย์เจริญ, 2549, สมุนไพรในอุทยานแห่งชาติภาคกลาง, มุลินีการแพทย์แผนไทยพัฒนา, พิมพ์ครั้งที่ 2, บริษัทสามเจริญพาณิชย์, กรุงเทพฯ, 228 น.
- [4] Itharat, A., Houghton, P. J., Ammgusye, E. E., Burke, P. J., Sampson, J. H. and Raman, A., 2004, *In vitro* cytotoxic activity of Thai medicinal plants used traditionally to treat cancer, *J. Ethnopharmacol.* 90: 33-38.
- [5] Li, S.Y., Fuchino, H., Kawahara, N., Sekita, S. and Satake, M., 2002, New phenolic constituents from *Smilax bracteata*, *J. Nat. Prod.* 65: 262-266.
- [6] Ruangnoo, S., Jaiaree, N., Makchuchit, S., Panthong, S., Thongdeeying, P. and Itharat, A., 2012, An *in vitro* inhibitory effect on RAW 264. 7 cells by antiinflammatory compounds from *Smilax corbularia* Kunth, *Asian Pac. J. Allergy Immunol.* 30: 268-74.
- [7] Yuan, J.Z., Dou, D.Q., Chen, Y.J., Li, W., Kazuo, K., Tamotsu, N. and Yao, X.S., 2004, Studies on dihydroflavonol glycosides from rhizome of *Smilax glabra*, *China J. Chin. Mate. Med.* 29: 867-870.
- [8] วราภรณ์ ภูตะลุน, 2551, การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสมุนไพร แนวทางการศึกษาเพื่อผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา, ขอนแก่นพิมพ์พัฒนา, ขอนแก่น, 120 น.
- [9] Jirakiattikul, Y., Rithichai, P. and Itharat, A., 2013, Effects of medium salt strength and plant growth regulators on shoot multiplication and root induction of *Smilax corbularia*, *Pharmacologyonline* 3: 1-7.
- [10] Wang, J., Qian, J., Yao, L. and Lu, Y., 2015, Enhanced production of flavonoids by methyl jasmonate elicitation in cell suspension culture of *Hypericum perforatum*, *Bioresour. Bioprocess* 2: 1-9.
- [11] ทิพย์สุคนธ์ บุญเย็น, 2557, ผลของ Jasmonic acid และ Salicylic acid ต่อปริมาณ Dioscorealide B ในการเพาะเลี้ยงยอดของข้าวเย็นใต้ (*Dioscorea membranacea* Pierre ex Prain & Burkill), วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์, ปทุมธานี.
- [12] Jaiaree, N., 2010, Biological activities of *Dioscorea birmanica* Prain & Burkill extract and its active ingredients, Ph.D. Thesis, Thammasat University, Pathum Thani.
- [13] เจิมอรุณ อุทัยแจ่มศรีผล, เขียวพา จิระเกียรติกุล, ภาณุมาศ ฤทธิไชย และอรุณพร อธิรัตน์, 2560, ผลของระยะเวลาเพาะเลี้ยงต่อปริมาณสารทุติยภูมิและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของยอดพรมมิในสภาพปลอดเชื้อ, *ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี* 25: 443-452.
- [14] Taiz, L. and Zeiger, E., 2006, *Plant Physiology*, 4th Ed., Sinauer Associates, Inc., Sunderland, 700 p.

- [15] ลิลลี่ กาวีต๊ะ, 2546, การเปลี่ยนแปลงสัณฐานและพัฒนาการพืช, โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ, 319 น.
- [16] Rout, G.R., Samantaray, S. and Das, P., 2000, *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants, *Biotechnol. Adv.* 18: 91-120.
- [17] รัชนีวรรณ จิระพงศ์พัฒนา, เยาวพา จิระเกียรติกุล, ภาณุมาศ ฤทธิไชย, ศรีโสภา เรืองหนู และอรุณพร อิฐรัตน์, 2559, ปริมาณสารทุติยภูมิของยอดหัวข้าวเย็น (*Dioscorea birmanica* Prain & Burkill) ในสภาพปลอดเชื้อที่ระยะเวลาเพาะเลี้ยงต่างกัน, *ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี* 24: 40-48.
- [18] Sabater- Jara, A. , Souliman- Youssef, S. , Novo-Uzal, E., Almagro, L., Belchi-Navarro, S. and Pedreno, M. , 2013, Biotechnological approaches to enhance the biosynthesis of ginkgolides and bilobalide in *Ginkgo biloba*, *Phytochem. Rev.* 12: 191-205.
- [19] Figueiról, A.D.A., Correal, C.M., Astarital, L.V. and Santarém, E.R., 2010, Long-term maintenance of *in vitro* cultures affects growth and secondary metabolism of *St. John's Wort*, *Cienc. Rural.* 40: 2115-2121.
- [20] ปพิชญา ขวานทอง, 2559, ผลของ Phenylalanine และ Jasmonic acid ต่อปริมาณสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ของแคลลัสกระเจี๊ยบแดง (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) ในสภาพปลอดเชื้อ, *วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์, ปทุมธานี.*
- [21] Cui, X.H., Chakrabarty, D., Lee, E.J. and Paek, K.Y., 2010, Production of adventitious roots and secondary metabolites by *Hypericum perforatum* L. in a bioreactor, *Bioresour. Technol.* 101: 4708-4716.
- [22] กนกวรรณ ส่งเสริม, 2561, ผลของระยะเวลาเพาะเลี้ยงและ Salicylic Acid ต่อปริมาณสารทุติยภูมิของยอดกล้วยหอมทอง (*Musa acuminata* AAA group 'Gros Michel') ในสภาพปลอดเชื้อ, *ปัญหาพิเศษปริญญาโท, มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์, ปทุมธานี.*
- [23] Szopa, A., Kokotkiewicz, A., Bednarz, M., Luczkiewicz, M. and Ekiert, H. , 2017, Studies on the accumulation of phenolic acids and flavonoids in different *in vitro* culture systems of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. using a DAD-HPLC method, *Phytochem. Lett.* 20: 462-469.
- [24] Anusha, T.S., Joseph, M.V. and Elyas, K.K., 2016, Callus induction and elicitation of total phenolics in callus cell suspension culture of *Celastrus paniculatus* – wild, an endangered medicinal plant in India, *Pharmacogn. J.* 8: 471-475.
- [25] Makowczyńska, J., Grzegorzczak-Karolak, I. and Wysokińska, H. , 2015, Antioxidant activity of tissue culture- raised *Ballota nigra* L. plants grown *ex vitro*, *Acta Pol. Pharm.* 72: 769-775.
- [26] Ruangnoo, S. , 2011, Stability and formulation development of Hua-Khao-Yen extracts as anticancer drug, *Ph.D. Thesis, Thammasat University, Pathum Thani.*

- [27] อรุณา สองศรี, 2556, การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหัวข้าวเย็น (*Dioscorea birmanica* Prain & Burkill) และการสะสมสารทุติยภูมิ, วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์, ปทุมธานี.
- [28] Mohan, N. , Jassal P. S. , Kumar, V. and Singh, R.P., 2011, Comparative *in vitro* and *in vivo* study of antioxidants and phytochemical content in *Bacopa monnieri*, Recent Res. Sci. Technol. 3: 78-83.
- [29] Banthorpe, B. V. , 1994, Secondary metabolism in plant tissue culture: Scope and limitations, Nat. Prod. Rep. 11: 303-328.
- [30] ศุภวรรณ บุญระเทพ, 2549, การผลิตสารทุติยภูมิโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชและเทคโนโลยีชีวภาพ, ว.วิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ 20: 185-196.