บทที่ 2
การตรวจเอกสาร

ผักดีด (Pak Deed)

ผักดีด หรือ ต้อยตั่ง มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Solanum spirale* Roxb. จัดอยู่ในวงศ์ Solanaceae เป็นไม้พุ่ม และมีแหล่งการกระจายพันธุ์พบอยู่ในป่าฝนเขตร้อนที่ระดับความสูงประมาณ 500-1900 เมตรจากระดับน้ำทะเล ตั้งแต่ตอนใต้ของประเทศจีน อินเดีย พม่า ไทย ลาว เวียดนาม อินโดนีเซีย ถึงตอนเหนือของรัฐควีนแลนด์ ประเทศออสเตรเลีย (Knapp, 2002)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของผักดีด

ไม้พุ่มขนาดเล็ก ลำต้นทรงสี่เหลี่ยมแข็งมีข้อห่างๆ ตั้งตรง สูงประมาณ 1-3 เมตร ใบเดี่ยว เรียงสลับ รูปวงรีหรือรูปวงรีแกมรูปไข่กลับ ใบกว้าง 5-8 เซนติเมตร ยาว 9-15 เซนติเมตร ดอกช่อออกเหนือซอกใบ ก้านดอกยาว ดอกย่อยเรียงสลับกลีบดอกสีขาว (ภาพที่ 1) ผลรูปทรงกลม ผิวเรียบสีเขียวออกเป็นช่อคล้ายมะเขือพวง เมื่อแก่จะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองส้ม ออกดอกในเดือนพฤษภาคม-กรกฎาคม ผลสุกในเดือนธันวาคม-มกราคม

ภาพที่ 1 ผักดีด หรือ ต้อยตั่ง

การจัดจำแนกตามอนุกรมวิธานของผักดีด

Kingdom: Plantae

Order: Solanales

Family: Solanaceae

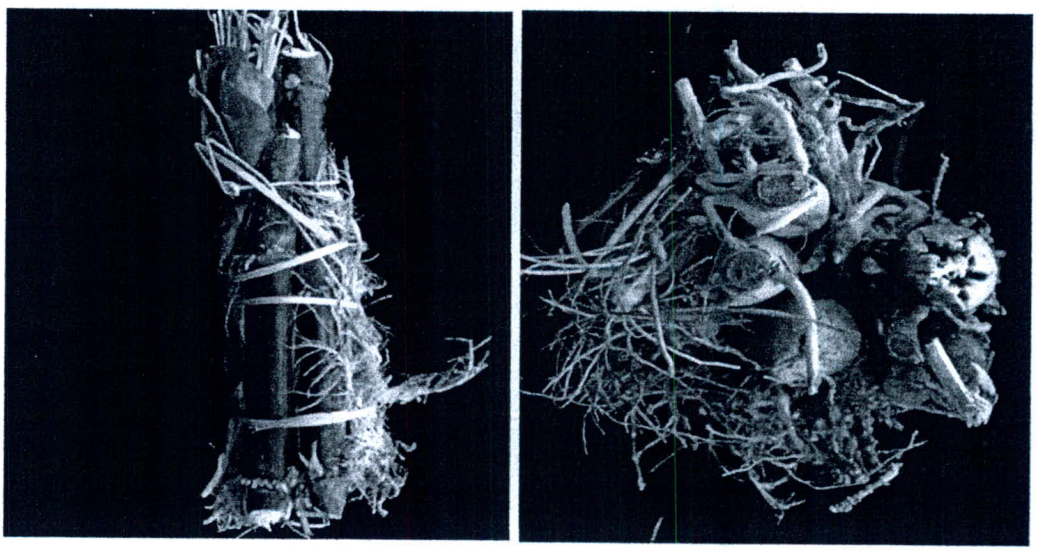
Genus: *Solanum*

Species: *S. spirale*

การใช้ประโยชน์ของผักดีด

สำหรับในประเทศไทยพบได้ในบริเวณภาคเหนือ โดยชาวบ้านนำใบอ่อน ยอดอ่อนของผักดีดมาเป็นส่วนประกอบในการปรุงอาหาร เช่น แกงเห็ดโคน แกงขนุน และเป็นส่วนประกอบในตำรับยาลดไข้ตามภูมิปัญญาชาวบ้าน (ภาพที่ 2) มีฤทธิ์เป็นยาเย็น โดยใช้ใบ และรากผักดีดสดมัดรวมกับหญ้าปากควาย ต้นตะไคร้ ใบหญ้าแพรก และอ้อยดำ นำมาแช่น้ำดื่มใช้ลดไข้ในเด็กเล็ก (วิทยาลัยการแพทย์พื้นบ้านและการแพทย์ทางเลือก, 2547) และในประเทศอินเดียใช้รากเป็นยาขับปัสสาวะ และรักษาอาการ narcotic ส่วนในประเทศลาวนำลำต้นมาแช่น้ำให้เปลือกเปื่อยยุ่ยใช้เป็นยาลดไข้ (Knapp, 2002)

นอกจากนี้ในการศึกษาพฤกษศาสตร์พื้นบ้านของ Borkataki และคณะ (2008) ในรัฐอัสสัมของประเทศอินเดีย พบว่าผักดีดเป็นพืชที่ปลูกไว้ริมรั้ว (Live fencing หรือ Biofencing)



ภาพที่ 2 ยาลดไข้ตามภูมิปัญญาชาวบ้าน ประกอบด้วยใบ และรากผักดีดสด หญ้าปากควาย ต้นตะไคร้ ใบหญ้าแพรก และอ้อยดำ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และเซลล์พืช

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นเทคนิคขั้นตอนพื้นฐานในการเพิ่มผลผลิตจากพืช นอกเหนือจากเพาะปลูกตามธรรมชาติ ซึ่งเกิดจากความสามารถของเซลล์พืชที่มีคุณสมบัติ totipotent จึงสามารถเจริญในอาหารแข็งและอาหารเหลว อีกทั้งเซลล์พืชเป็นแหล่งสำคัญของ เมตาบอลิซึมของเซลล์ (cellular metabolism) เช่น การแบ่งเซลล์ การสังเคราะห์ดีเอ็นเอ เป็นต้น ซึ่งเป็นสิ่งจำเป็นในการถ่ายทอดพันธุกรรมไปสู่รุ่นลูกหลาน

พืชสมุนไพรจัดว่าเป็นแหล่งผลิตสารเคมีจากธรรมชาติที่สำคัญในด้านเภสัชกรรม อาหาร เกษตรกรรม ตลอดจนเครื่องสำอางค์ ส่วนใหญ่เป็นสารจำพวกสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) ได้แก่ สารจำพวก อัลคาลอยด์ (alkaloid) ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) ฟีนอลิก (phenolic) สเตอรอยด์ (steroid) เทอร์ปีนอยด์ (terpenoid) น้ำมันหอมระเหย (volatile oil) เป็นต้น (ตารางที่ 1) สารทุติยภูมิที่ได้จากพืชนั้นส่วนมากมีราคาแพง โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารที่ออกฤทธิ์ต่อกระบวนการชีววิทยาของสิ่งมีชีวิต (biologically active compounds) เช่น ยารักษาโรค สารแต่งกลิ่นอาหาร เป็นต้น ในธรรมชาติพืชจะผลิตสารทุติยภูมิในปริมาณน้อยมาก ตลอดจนขั้นตอนในการสกัด การแยกสาร และการทำให้สารบริสุทธิ์มักจะยุ่งยากและใช้เวลานาน ดังนั้นการเพิ่มผลผลิตของสารทุติยภูมิเหล่านี้จึงเป็นสิ่งที่สำคัญ เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นวิธีหนึ่งที่นำมาใช้เพื่อแผนการผลิตทางอุตสาหกรรม เนื่องจากมีข้อได้เปรียบหลายประการเมื่อเทียบกับการผลิตจากต้นพืชในธรรมชาติ ดังนี้

1. สามารถขยายพันธุ์พืชได้จำนวนมากในพื้นที่จำกัดในระยะเวลาอันสั้น
2. ได้ต้นพืชที่ยังคงลักษณะทางพันธุกรรมของสายพันธุ์เดิม
3. ได้ต้นพืชปลอดภัยจากยาฆ่าแมลงศัตรูพืช และโรคพืช
4. ไม่ขึ้นอยู่กับปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมได้แก่ ภูมิอากาศ ศัตรูพืช โรคพืช และฤดูกาล เป็นต้น
5. สามารถควบคุมการผลิตทั้งในด้านปริมาณและเวลาที่ต้องการ ซึ่งนำไปถึงความสามารถควบคุมด้านการตลาดได้ดียิ่งขึ้น
6. สามารถสร้างผลผลิตที่มีคุณภาพและปริมาณแน่นอน ซึ่งสามารถคัดเลือกเซลล์เดี่ยวหรือเซลล์เกาะกลุ่มทำให้ได้โคลนของเซลล์พืชเพาะเลี้ยงที่สามารถผลิตสารผลิตภัณฑ์เป้าหมายได้มากกว่าในพืชจากธรรมชาติ อีกทั้งสามารถชักนำให้เซลล์พืชเพาะเลี้ยงผลิตสารผลิตภัณฑ์ที่ต้องการโดยจำเพาะ ประหยัดเวลา และสะดวกต่อกระบวนการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์และการทำให้บริสุทธิ์

ตารางที่ 1 พืชสมุนไพรบางชนิดที่ผลิตสารทุติยภูมิและการประยุกต์ใช้ (Endress, 1994)

Metabolite	Application	Species
	Drugs	
Ajmalicine	Circulation	*Catharanthus roseus*
Atropine	Anti-cholinergic	*Atropa belladonna*
Hyoscyamine		*Hyoscyamus* spp.
Hyoscine		*Datura* spp.
Theophylline		*Camellia sinensis*
Diosgenin	Contraceptive	*Dioscorea* spp.
Quinine	Anti-malarial	*Cinchona* spp.
Eugenol	Local anesthetic	*Syzygium aromaticum*
Morphine	Analgesics	*Papaver somniferum*
Codeine		
Thebaine		
Digoxin	Cardiatonic	*Digitalis* spp.
Eucalyptol	Anthelmintic	*Artemisia pauciflora*
Sabinol		*Juniperus Sabina*
	Flavours	
Capsaicin	Chilli	*Capsicum frutescens*
Crocin, picocrocin	Saffron	*Crocus sativus*
Humulene	Beer	*Humulus lupulus*
Glycyrrhizin	Licorice	*Gycyrrhiza*
Vanilin	Vanilla	*Vanilla* spp.
Quinine	Bittering agent	*Cinchona* spp.

ตารางที่ 1 (ต่อ)

Metabolite	Application	Species
	Pigments	
		Grapes *(Vitis* sp.)
Anthocyanins	Red/blue	Purple mazie
		Beta vulgaris
Anthraquinones	Red	*Morinda citrifolia*
Saffron	Yellow	*Crocus sativa*
Shinkonin	Red	*Lithospermum erythrorhizon*
Xanthophylls	Yellow	*Curcuma longa*
	Agrochemicals	
Cederene	Repellent	*Juniperus virginiana*
Nicotine	Insecticides	*Nicotiana tabacum*
Piperine	Contact insecticides	*Piper nigrum*
Various pyrethroids		*Chrysanthemum* spp.

ผักดีดเป็นผักพื้นบ้านอีกหนึ่งชนิดที่มีความสามารถในการขจัดอนุมูลอิสระสูง แต่จากการค้นคว้าเอกสารที่เกี่ยวข้องของผักดีดพบการใช้ประโยชน์ และการเพาะปลูกขยายพันธุ์ผักดีดยังมีน้อยมาก ซึ่งจากรายงานวิจัย ดังตารางที่ 2 แสดงรายละเอียดที่อ้างถึงการชักนำให้เกิดยอดเพื่อการขยายพันธุ์พืชในหลอดทดลองจากพืชสกุล *Solanum* และสกุลอื่นๆ เพื่อนำมาใช้เป็นแนวทางเบื้องต้นในการดัดแปลงสูตรอาหารให้เหมาะสมต่อการขยายพันธุ์ผักดีดในหลอดทดลอง

ตารางที่ 2 งานวิจัยที่ชักนำการเกิดยอดในหลอดทดลองเพื่อการขยายพันธุ์พืชสกุล *Solanum* และสกุลอื่นๆ

ชื่อพืช	ชิ้นส่วนพืช	การชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา/การขยายพันธุ์พืช	สูตรอาหารเพาะเลี้ยง	อ้างอิง
มะแว้งนก	ปล้อง	shoot direct regeneration	B5 ที่เติม BA 0.5 mg/L	Hassanein and Soltan, 2000
S. surattense Bum.	ปล้อง	shoot direct regeneration	MS ที่เติม BA 0.5 mg/L	Rahman *et al.*, 2011
S. villosum Mill.	ปล้อง	shoot organogenesis	MS ที่เติม BA 2 mg/L ร่วมกับ NAA 1 mg/L	Hussein and Aqlan, 2011
มะแว้งนก	ใบ	shoot formation	MS ที่เติม kinetin 1.5 mg/L	Bhat *et al.*, 2010
มะเขือเทศ	ใบ	shoot multiplication	MS ที่เติม BA 2.5 mg/L ร่วมกับ NAA 1.5 mg/L	Khan *et al.*, 2010
S. villosum Mill.	ใบ	shoot organogenesis	MS ที่เติม BA 2 mg/L ร่วมกับ NAA 1 mg/L	Hussein and Aqlan, 2011

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ชื่อพืช	ชิ้นส่วนพืช	การชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา/การขยายพันธุ์พืช	สูตรอาหารเพาะเลี้ยง	อ้างอิง
มะเขือยาว	ใบ	plantlets regeneration	MS ที่เติม BA 0.05 mg/L ร่วมกับ NAA 1 mg/L	Hossain *et al.*, 2007
Nicotiana tabacum L. สายพันธุ์ SPTG-172	แคลลัส	shoot regeneration	MS ที่เติม BA 2 mg/L ร่วมกับ NAA 0.2 mg/L	Ali *et al.*, 2007
Withania somnifera (L.) Dunal.	ใบ	shoot organogenesis	MS ที่เติม BA 1 mg/L ร่วมกับ IAA 1 mg/L	Kulkarni *et al.*, 1996
มะแว้งนก	ข้อ	shoot multiplication	MS ที่เติม BA 1 mg/L	Verma *et al.*, 2010
มะแว้งนก	ข้อ	shoot multiplication	MS ที่เติม 2,4-D 2.5 mg/L ร่วมกับ NAA 2 mg/L	Khan *et al.*, 2010
มันฝรั่ง	ข้อ	shoot multiplication	MS ที่เติม BA 2. mg/L	Khan *et al.*, 2010

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ชื่อพืช	ชิ้นส่วนพืช	การชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา/การขยายพันธุ์พืช	สูตรอาหารเพาะเลี้ยง	อ้างอิง
S. sessiliflorum สายพันธุ์ Santa luzia	ข้อ	shoot organogenesis	MS ที่เติม kinetin 0.64 mg/L ร่วมกับ IAA 0.01 mg/L	Boufleuher *et al.*, 2008
S. sessiliflorum สายพันธุ์ Santa luzia	ลำต้นใต้ใบเลี้ยง	shoot formation	MS ที่เติม kinetin 10 หรือ 20 mg/L ร่วมกับ IAA 0.02 mg/L	Schuelter *et al.*, 2009
Withania somnifera (L.) Dunal.	ตาข้าง	shoot regeneration	MS ที่เติม BA 1 mg/L ร่วมกับ kinetin 1 mg/L	Sabir *et al.*, 2007
S. capsicoides All.	ปลายยอด	shoot regeneration	MS ที่เติม BA 2 mg/L	Anish *et al.*, 2010

การเจริญและการชักนำให้เกิดเนื้อเยื่อพืชในหลอดทดลอง

การนำชิ้นส่วนของพืชมาวางเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นพืชต้นใหม่ที่สมบูรณ์ในสภาวะปลอดเชื้อ โดยกระบวนการเมตาบอลิซึมภายในเซลล์จะถูกกระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์ และการเปลี่ยนแปลงทางสันฐานวิทยาของเซลล์จากเนื้อเยื่อธรรมดา (organized tissue) เช่น ลำต้น ใบ และราก พัฒนาไปเป็นเนื้อเยื่อที่จะเกิดเป็นจุดเริ่มต้นของยอดหรือรากได้โดยตรง หรือไม่ประกอบเป็นอวัยวะ (unorganized tissue) คือ แคลลัส ซึ่งเป็นกลุ่มเซลล์ที่ยังไม่พัฒนาเป็นเนื้อเยื่อ (undifferentiated mass) เมื่อแคลลัสได้รับอาหาร และสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมก็สามารถเกิดเป็นยอด รากได้ (สมพร ประเสริฐส่งสกุล, 2549)

แคลลัส เป็นกลุ่มเซลล์ที่ประกอบด้วยเซลล์พาเรนไคมา มีขนาดและรูปร่างไม่แน่นอน โดยที่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นอวัยวะ หรือ เนื้อเยื่อชนิดต่างๆ ภายในเซลล์มีเปอร์เซ็นต์ของแวคิวโอล (vacuole) สูง แคลลัสที่เซลล์เกาะตัวกันแน่น เรียกว่า compact callus ถ้าเซลล์เกาะกันอย่างหลวม อ่อนนุ่ม ชุ่มน้ำ เรียกว่า friable callus (ประศาสตร์ เกื้อมณี, 2536) แคลลัสส่วนใหญ่จะไม่มีรงควัตถุ (pigment) มีเป็นส่วนน้อยที่พบว่ามีสีเขียว สีเหลือง และสีม่วง ซึ่งปริมาณและชนิดของรงควัตถุขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ธาตุอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง และปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมของการเพาะเลี้ยง โดยเฉพาะปัจจัยของแสง อีกทั้งการกระตุ้นให้เกิดแคลลัสขึ้นอยู่กับชนิดของเนื้อเยื่อ หรือสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (ประศาสตร์ เกื้อมณี, 2536)

เนื้อเยื่อบางชนิดไม่จำเป็นต้องอาศัยสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชก็สามารถเกิดแคลลัสได้ เนื้อเยื่อดังกล่าว คือ vascular cambium เพราะเซลล์มีการแบ่งตัวในอัตราที่สูง ดังนั้นแคลลัสมักจะเกิดขึ้นมาจากเนื้อเยื่อที่มีส่วนของแคมเบียมรวมอยู่ด้วย เช่น ส่วนของเอมบริโอ ใบเลี้ยง ราก ใบอ่อน ดอกอ่อน เป็นต้น (สมพร ประเสริฐส่งสกุล, 2549)

เซลล์แขวนลอย เป็นเซลล์เดี่ยว หรือกลุ่มของเซลล์ (aggregate cell) ผสมกันในอาหารเหลวที่เขย่าตลอดเวลาซึ่งเซลล์เหล่านี้จะมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว มีนิวเคลียสและไซโทพลาซึมชัดเจน และยังพบอีกว่าเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเหลวมักสูญเสียความสามารถในการเกิดต้นพืช ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช พืชบางชนิดแม้เลี้ยงในสภาวะเซลล์แขวนลอยก็ยังสามารถพัฒนาเป็นต้นพืชได้ (Chawla, 2003)

การเจริญของเซลล์แขวนลอยมีลักษณะดังนี้ (Chawla, 2003)

ระยะที่ 1 lag phase เป็นระยะแรกหลังจากเซลล์ได้รับอาหารใหม่ ยังไม่มีการแบ่งเซลล์ ไม่มีการเติบโต มีแต่การเปลี่ยนแปลงทางเคมีเพื่อเตรียมพร้อมสำหรับการแบ่งเซลล์

ระยะที่ 2 exponential phase เป็นระยะที่เซลล์มีการแบ่งตัวเพิ่มขึ้นด้วยอัตราเร่งสูงจึงทำให้ได้จำนวนเซลล์มากขึ้นตามไปด้วย

ระยะที่ 3 linear phase เป็นระยะที่เซลล์มีการขยายขนาดเพิ่มขึ้น รวมทั้งเซลล์จะสร้างสารประกอบต่างๆ ของผนังเซลล์จึงทำให้เซลล์มีน้ำหนักสด และแห้งมากที่สุด

ระยะที่ 4 progressive deceleration phase เป็นระยะที่เซลล์มีการแบ่งเซลล์และขนาดของเซลล์ลดลง

ระยะที่ 5 stationary phase เป็นระยะที่ไม่มีการเพิ่มจำนวน หรือ ขนาดของเซลล์คงที่แล้ว หยุดการเติบโต

การวัดการเติบโตของเซลล์ วิธีที่ง่ายที่สุด และสะดวกสบายจะใช้วิธีการชั่งน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง เมื่อสร้างกราฟการเติบโตซึ่งเป็นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักของเซลล์และช่วงเวลาที่เพาะเลี้ยง สามารถพบรูปแบบการเติบโตเป็นแบบซิกมอยด์ (sigmoid curve)

สำหรับการศึกษาการเลี้ยงเซลล์พืชและเนื้อเยื่อพืชในสกุล *Solanum* และสกุลอื่นๆมีรายงานวิจัยดังในตารางที่ 3 ซึ่งเป็นกระบวนการเพาะเลี้ยงแคลลัส และเซลล์แขวนลอยเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตสารทุติยภูมิ

ตารางที่ 3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเพาะเลี้ยงแคลลัส และเซลล์แขวนลอยของพืชสกุล *Solanum* และสกุลอื่นๆ

ชื่อพืช	ชิ้นส่วนพืช	การเพาะเลี้ยง	ผลการวิจัย	สูตรอาหารเพาะเลี้ยง	อ้างอิง
มันฝรั่ง (*S. tuberosum* L.)	eye buds	แคลลัส	สารสกัดของแคลลัสมีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งของเต้านม เม็ดเลือดขาว กล่องเสียง ตับ ปากมดลูก, ลำไส้ใหญ่ และสมอง ให้ค่า IC_{50} สูง ดังนี้ คือ 2.7, 3.7, 6.0, 6.7, 10.0, 13.6, และ 22.3 µl/ml ตามลำดับ และมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้สูง 76.4% อีกทั้งยังผลิตสาร glycoalkaloid สูงกว่าสารสกัดจากแคลลัส และจากหัวมันฝรั่งในธรรมชาติ	MS ที่เติม IAA 2 mg/L ร่วมกับ BA 0.5 mg/L	Al-Ashaal, 2010
S. chrysotrichum Schldl.	ลำต้นใต้ใบเลี้ยง	เซลล์แขวนลอย	ผลิตสาร antifungal spirostanol saponin (SC-1)	MS ที่เติม 2,4-D 2 mg/L ร่วมกับ kinetin 2 mg/L	Villarreal *et al.*, 1997
Gossypium hirsutum L.	ลำต้นใต้ใบเลี้ยง	แคลลัส	แคลลัสสามารถสะสมสาร gossypol ได้จากอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 0.1 mg/L ร่วมกับ kinetin 0.1 mg/L	MS ที่เติม 2,4-D 0.1 mg/L ร่วมกับ kinetin 0.1 mg/L	Baksha *et al.*, 2006

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ชื่อพืช	ชิ้นส่วนพืช	การเพาะเลี้ยง	ผลการวิจัย	สูตรอาหารเพาะเลี้ยง	อ้างอิง
S. khasianum C. B. Clark.	ลำต้น	เซลล์แขวนลอย	ผลิตสาร hydroxycinnamoylamides and α-hydroxyacetovanillone	MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 1.5% และ2,4-D 1 mg/L ร่วม กับ kinetin 1 mg/L	Muhlenbeck *et al.*, 1996
S. hainanense Hance.	ลำต้น	เซลล์แขวนลอย	น้ำหนักเซลล์รวม (cell biomass) มากที่สุด 18.47 g ในสัปดาห์ที่ 4 และได้ปริมาณสาร solasodine (121.01 mg/g) สูงกว่ารากจากต้นในธรรมชาติที่มีอายุ 1 ปี ถึง 6 เท่า	MS ที่เติม 2,4-D 1 mg/L ร่วมกับ BA 0.1 mg/L และน้ำตาลซูโครส 3%	Loc and Thanh, 2011
S. lyratum Thunb.	ลำต้น	เซลล์แขวนลอย	ออกซินมีผลทำให้ปริมาณสาร solanidine และ solasodine สูง และเซลล์มีการเจริญเติบโตได้เร็วกว่าเซลล์ที่เลี้ยงในสูตรชุดควบคุม	MS ที่เติม IBA 5 mg/L และ IBA 1 mg/L	Kuo *et al.*, 2012

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ชื่อพืช	ชิ้นส่วนพืช	การเพาะเลี้ยง	ผลการวิจัย	สูตรอาหารเพาะเลี้ยง	อ้างอิง
Tripterygium wilfordii Hook.f.	ลำต้น	เซลล์แขวนลอย	กลุ่มเซลล์ที่มีขนาดใหญ่กว่า 2 mm เซลล์จะเติบโตอย่างรวดเร็ว ส่วนการสะสมสาร ก้อนเซลล์ที่มีขนาด 0.5-2 mm ให้ปริมาณสาร triptolide มากที่สุด ในขณะที่ก้อนเซลล์ขนาดเล็ก 0.1-0.5 mm มีการสะสมของคลอโรพลาสต์ได้น้ำหนักมวลรวมต่ำ (cell biomass) และเซลล์เติบโตช้า	PRL-4 medium ที่เติม 2,4-D 2 mg/L ร่วมกับ kinetin 0.1 mg/L และเติม casein 250 mg/L และน้ำตาลซูโครส 20 g/L	Miao *et al.*, 2012
Rhodiola sachalinensis A. Bor.	ลำต้น	เซลล์แขวนลอย	เซลล์แขวนลอยของกลุ่มก้อน compact callus เพื่อการผลิตสาร salidroside กลุ่มก้อนแคลลัสประกอบด้วย เซลล์รูปทรงกลม ผิวเรียบ มีขนาด 2-7 mm ช่วงการเติบโตของ exponential phase มีระยะเวลาสั้น และมีช่วงของ linear ยาวนานที่สุดในวัฏจักรของการเลี้ยงเซลล์	MS ที่เติม NAA 0.3 mg/L ร่วมกับ BA 3 mg/L และเติมน้ำตาลซูโครส 3% (w/v)	Xu *et al.*, 1998

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ชื่อพืช	ชิ้นส่วนพืช	การเพาะเลี้ยง	ผลการวิจัย	สูตรอาหารเพาะเลี้ยง	อ้างอิง
มะเขือยาว	ใบ	เซลล์แขวนลอย	ชักนำให้เกิด somatic embryogenic	MS ที่เติม NAA 1 mg/L ร่วมกับ BA 0.05 mg/L	Hossain *et al.*, 2007
Withania somnifera (L.) Dunal.	ใบ	เซลล์แขวนลอย	สภาวะที่เหมาะสมของการเลี้ยงเซลล์แขวนลอย คือ ความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้น 10 g/L และ pH 5.8 จะได้เซลล์แขวนลอยมีการเติบโต และมีปริมาณสาร withanolide A สูงสุดในสัปดาห์ที่ 4	MS ที่เติม 2,4-D 2 mg/L ร่วมกับ kinetin 0.5 mg/L และน้ำตาลซูโครส 3% (w/v)	Nagella and Murthy, 2010
Nicotiana tabacum L. สายพันธุ์ SPTG-172	ใบ	แคลลัส	การใช้สัดส่วนของออกซินต่อไซโตไคนินสูง สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้สำเร็จ	MS ที่เติม NAA 3 mg/L ร่วมกับ BA 0.2 mg/L	Ali *et al.*, 2007

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ชื่อพืช	ชิ้นส่วนพืช	การเพาะเลี้ยง	ผลการวิจัย	สูตรอาหารเพาะเลี้ยง	อ้างอิง
Glycyrrhiza glabra L.	ใบ	แคลลัส และเซลล์แขวนลอย	เกิด embryogenic callus ไปเลี้ยงแบบเซลล์แขวนลอยซึ่งมีช่วงการเติบโตจำกัด เนื่องจากเกิด browning ระหว่างการเพาะเลี้ยง ดังนั้น จึงต้องมีการย้ายเลี้ยงลงอาหารใหม่สูตรเดิมทุก 2 สัปดาห์ เพื่อทำให้ช่วงเวลาการมีชีวิตของเซลล์ยืดยาวขึ้น	B5 ที่เติม 2,4-D 1 mg/L ร่วมกับ kinetin 1 mg/L และเติมซูโครส 2%	Mousa *et al.*, 2007
Centella asiatica (L.) Urb.	ใบ	แคลลัส และเซลล์แขวนลอย	แคลลัสที่ได้มีสีเขียว เซลล์เกาะกันแบบหลวม (friable callus) และเซลล์แขวนลอยมีการเจริญเติบโต (cell growth) เร็วกว่าแคลลัส อีกทั้งให้ปริมาณสาร asiaticoside (494.62 mg/g) สูงกว่าแคลลัส และส่วนของใบจากธรรมชาติ	MS ที่เติม NAA 1 mg/L ร่วมกับ BA 1 mg/L	Nath and Buragohain, 2005

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ชื่อพืช	ชิ้นส่วนพืช	การเพาะเลี้ยง	ผลการวิจัย	สูตรอาหารเพาะเลี้ยง	อ้างอิง
Melastoma malabathricum L.	ใบ	แคลลัส และเซลล์แขวนลอย	สารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้เลี้ยงแคลลัสเกิดแคลลัสหลวม (friable callus) และจากนั้นเลี้ยงเซลล์แขวนลอยใช้เซลล์เริ่มต้นที่อยู่ในช่วง 0.25-0.5 g ให้น้ำหนักสดสูงถึง 6.150 g ซึ่งเซลล์จะเริ่มเติบโตในช่วงวันที่ 9-15 หลังจากเริ่มทำการเลี้ยง	MS ที่เติม NAA 6 mg/L ร่วมกับ BA 1 mg/L (แคลลัส) MS ที่เติม NAA 0.5 mg/L ร่วมกับ BA 0.25 mg/L (เซลล์แขวนลอย)	Keng *et al.*, 2008
Saussurea medusa Maxim.	ใบ	แคลลัส และเซลล์แขวนลอย	ปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงแคลลัส และเซลล์แขวนลอยต้องใช้แสง Blue light, 3% sucrose กับ 1% glucose และการใช้ NAA ความเข้มข้นสูงจะทำให้เซลล์มีอัตราการเจริญเติบโต และมีปริมาณสารเพิ่มมากขึ้น	MS ที่เติม NAA 0.2 mg/L ร่วมกับ BA 2 mg/L	Zhao *et al.*, 2001

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ชื่อพืช	ชิ้นส่วนพืช	การเพาะเลี้ยง	ผลการวิจัย	สูตรอาหารเพาะเลี้ยง	อ้างอิง
Silybum marianum L.	ใบเลี้ยง	แคลลัส	น้ำหนักมวลรวมของแคลลัสที่ให้ milk clotting peptidases สูงสุดในช่วง exponential phase ในวันที่ 14 และเซลล์เจริญเติบโตคงที่ (stationary phase) ในวันที่ 35 ของการเพาะ เลี้ยง	B5 ที่เติม 2,4-D 0.5 mg/Lร่วมกับ BA 0.05 mg/L	Cimino *et al.*, 2006
Gymnema sylvestre R. Br.	ข้อ และ ปล้อง	แคลลัส และ เซลล์แขวนลอย	สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสที่มีสีเหลืองอ่อน และเซลล์เติบโตอย่างรวดเร็วในช่วงเวลา 2-3 สัปดาห์ซึ่งได้น้ำหนักมวลรวมของแคลลัสและเซลล์แขวนลอยเพิ่มขึ้น	MS ที่เติม 2,4-D 0.5 mg/L ร่วมกับ NAA 2.5 mg/L	Gopi and Vatsala, 2006
Cistanche deserticola Y. C. Ma.	เมล็ด	เซลล์แขวนลอย	เซลล์แขวนลอยมีการเติบโตสูงสุดในวันที่ 21 ได้น้ำหนักแห้งมากที่สุด 8.03 g และมีการสะสมสาร Phenylethanoid glycosides (PeGs) มากที่สุด 97 mg นอกจากนี้ยังพบว่า เซลล์แขวนลอยสามารถขจัดอนุมูล DPPH ได้มากกว่าใบในหลอดทดลอง และแคลลัสถึง 1.1 และ 2.2 เท่า ตามลำดับ	MS ที่เติม NAA 1 mg/L และ 2,4-D 0.25 mg/L ร่วมกับ BA 2 mg/L และเติมน้ำตาลซูโครส 30 g/L	Cheng *et al.*, 2005

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ชื่อพืช	ชิ้นส่วนพืช	การเพาะเลี้ยง	ผลการวิจัย	สูตรอาหารเพาะเลี้ยง	อ้างอิง
Pueraria candollei var. *candollei* และ var. *mirifica*	ราก	เซลล์แขวนลอย	เซลล์แขวนลอยมีการเติบโตเพิ่มขึ้นจนถึง stationary phase ในระยะเวลา 15-24 วัน โดยเซลล์แขวนลอยของ var. *mirifica* จากรากมีน้ำหนักมวลรวมมากกว่าใบ และลำต้น ตามลำดับ นอกจากนี้เซลล์แขวนลอยมีปริมาณ isoflavonoid สูงกว่าหัวใต้ดินจากธรรมชาติ	MS ที่เติม 2,4-D 1 mg/L	Boonsnong-cheep *et al.*, 2010
Psoralea corylifolia L.	ราก	แคลลัส	แคลลัสจากรากให้ปริมาณสาร isoflavone และเติบโต (growth index) สูงที่สุด รวมทั้งมีค่า EC_{50} 104.89 µg/ml และปริมาณฟีนอลิค 39.00 mg GAE/g dry weight สูงกว่าพืชในธรรมชาติ	สูตร MS ที่เติม IAA 1 mg/L ร่วมกับ BA 1 mg/L	Shinde *et al.*, 2010

ลักษณะและธรรมชาติของเซลล์พืช

1. ขนาดและความไวต่อแรงเฉือน (shear sensitivity)

เซลล์พืชเพาะเลี้ยงมีขนาดใหญ่กว่าเซลล์จุลินทรีย์ประมาณ 10-100 เท่า กล่าวคือ เซลล์พืชเพาะเลี้ยงมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ในช่วง 20-40 ไมโครเมตร และมีความยาวของเซลล์อยู่ในช่วง 100-200 ไมโครเมตร อีกทั้งมีรูปทรงหลากหลาย ตั้งแต่ทรงกลมจนถึงทรงกระบอก ขนาดและรูปทรงแปรตามขั้นของการเจริญ โดยในการเจริญขั้นทวีคูณ (log) เซลล์จะมีแวคิวโอเล็กๆ จำนวนมาก และไซโตพลาซึมข้น ขณะที่เมื่อเซลล์แก่จะมีแวคิวโอขนาดใหญ่อันเดียว และไซโตพลาซึมเจือจาง การเปลี่ยนแปลงของอัตราส่วนระหว่างแวคิวโอกับของเหลวในเซลล์ทำให้เซลล์ไวต่อการเปลี่ยนแปลงความดันออสโตซิส (osmotic potential) และแรงกดดันทางกายภาพ (physical stress) และอาจเป็นไปได้ที่จะปล่อยของเสียที่สะสมในแวคิวโอ เข้าสู่ไซโตพลาซึม อย่างไรก็ดีลักษณะของผนังเซลล์ซึ่งมีองค์ประกอบของเซลลูโลสเป็นหลัก อันมีคุณสมบัติแข็งและความตึงตัวสูง (high tensile strength) ทำให้เซลล์พืชทนต่อแรงเฉือนต่ำ (low shear resistance) (กนกวรรณ รัตนสโนบล, 2536)

2. การจับกันเป็นกลุ่มของเซลล์ (aggregate formation)

ในการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย ปกติเซลล์พืชมักจะจับกันเป็นกลุ่มก้อนของเซลล์ (clump) ซึ่งอาจมีขนาดตั้งแต่กลุ่มละ 2-300 เซลล์ ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช การเปลี่ยนย้ายอาหาร (subculture) สภาวะแวดล้อม และองค์ประกอบของอาหาร การจับกันเป็นกลุ่มก้อนของเซลล์ขนาดใหญ่ทำให้เกิดความแตกต่างระหว่างเซลล์ที่อยู่บริเวณรอบนอกกับเซลล์บริเวณตรงกลางของกลุ่มทั้งในด้านสภาพแวดล้อม การนำสารอาหารเข้าเซลล์ (nutrient uptake) และการหลั่งสารทุติยภูมิ อีกทั้งขนาดที่ใหญ่และมีน้ำหนักกว่าเซลล์เดี่ยวทำให้การแขวนลอยไม่คงตัว ตกตะกอนเร็ว และเมื่อเซลล์เจริญมากขึ้นทำให้เกิดความหนืดสูง (high viscosity) ดังนั้น แรงเฉือนที่เกิดขึ้นต้องไม่รุนแรงจนเซลล์แตก และควรให้การเกิดการขนถ่ายมวล (mass transfer) ได้ดีโดยเฉพาะออกซิเจน

อย่างไรก็ดี การจับกันเป็นกลุ่มของเซลล์ก็อาจมีประโยชน์ในแง่สรีรวิทยาและชีวเคมีของการร่วมกันสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ของเซลล์พืช การเกิดความแตกต่างของสภาวะแวดล้อมและการแพร่ของสารอาหารอาจทำให้เซลล์บริเวณตรงกลางเกิดการพัฒนา (differentiation) ไปเป็นเซลล์

ป้อน (feeder) ไปกระตุ้นเซลล์อื่นๆ ที่อยู่ล้อมรอบตัวเอง การแก้ปัญหาการจับกันเป็นกลุ่มของเซลล์ทำได้โดยการแยกเอาเซลล์เดี่ยวจากเซลล์มีโซฟิลล์ในแผ่นใบ ทำได้ 2 วิธี คือ วิธีทางกายภาพ เช่น การบดหรือปั่นใบพืช เป็นต้น และวิธีการใช้เอนไซม์เพคทิเนส เป็นต้น

3. ความต้องการออกซิเจน

เซลล์พืชเป็นเซลล์ที่ต้องการออกซิเจนในการเติบโต แต่เนื่องด้วยอัตราการหายใจของเซลล์ต่ำ จึงต้องการออกซิเจนน้อย (maximum oxygen uptake rate อยู่ในช่วง 1-9 mmol/h) การเลี้ยงเซลล์แขวนลอยแบบเขย่าช่วยให้กลุ่มเซลล์ที่มีเซลล์ต่างชนิดกันผสมกันอยู่ (heterogeneous) กระจายตัวออกจากกันเป็นกลุ่มเซลล์เล็กๆ ทำให้ได้รับธาตุอาหาร และออกซิเจนเพิ่มมากขึ้น (Tapia *et al*., 2003)

ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของเซลล์พืชและเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง

1. สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช

กระบวนการเจริญเติบโตของพืชเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองเป็นผลที่เกิดจากสัดส่วนของออกซินต่อไซโตไคนิน ซึ่งพืชจะควบคุมระดับของออกซินและไซโตไคนินภายในต้นพืช (hormone autotrophy) ทั้งที่อยู่ในรูป free active และ conjugation (Endress, 1994) เพื่อให้เกิดความสมดุลของระดับฮอร์โมนภายในต้นพืชและฮอร์โมนพืชสังเคราะห์ที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Robert and Dennis, 2005) ซึ่งถ้าหากสัดส่วนของฮอร์โมนที่อยู่ในต้นพืชสมดุลกับปริมาณของสารสังเคราะห์ที่เติมในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อจะทำให้ชิ้นส่วนพืชที่ต้องการเลี้ยงเจริญเป็นยอดหรือรากหรือแคลลัสก็ได้

ออกซิน

โดยปกติการเจริญเติบโตและความมีชีวิตของพืชเพาะเลี้ยงเกิดจากการเติมออกซินสังเคราะห์ ได้แก่ 2,4-D และ NAA ซึ่งจะช่วยชักนำให้เกิดการสร้างเอนไซม์ที่จำเพาะต่อการสังเคราะห์ RNA ในการตอบสนองของพืชต่อออกซินแต่ละชนิดมีระดับความเข้มข้นที่ใช้แตกต่างกัน เช่น 2,4-D มีความแรงกว่า IAA ถึง 20 เท่า ดังนั้น 2,4-D จึงได้ชื่อว่า dedifferentiating hormone (Endress, 1994)

ไซโตไคนิน

ไซโตไคนินเป็นฮอร์โมนที่ใช้ร่วมกับออกซินเพื่อส่งเสริมให้เกิดการเจริญเติบโตของแคลลัส เซลล์แขวนลอย และอวัยวะ รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาแบบทางตรง (George, *et al.*, 2008) เช่น kinetin ช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์เพาะเลี้ยง ส่วน BA และ Zeatin ช่วยเหนี่ยวนำและเพาะเลี้ยง (maintain) แคลลัสและเซลล์แขวนลอยได้ดี (Endress, 1994)

2. องค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยง

องค์ประกอบของอาหารได้แก่ แหล่งคาร์บอน และธาตุอาหารต่างๆ มีผลต่อการสังเคราะห์สารทุติยภูมิ โดยสูตรอาหารที่ให้การเจริญสูงสุดอาจแตกต่างไปจากสูตรอาหารที่ให้การสังเคราะห์สารทุติยภูมิสูงสุด การที่จะพัฒนาสูตรอาหารเพื่อการผลิต (production medium) มักมุ่งเน้นไปที่แหล่งและปริมาณคาร์บอน ไนโตรเจน และฟอสเฟต (Endress, 1994)

3. ปัจจัยทางกายภาพที่มีอิทธิพลต่อการเจริญของเซลล์ และเนื้อเยื่อพืช

ปัจจัยทางแสง ประกอบด้วย ช่วงความยาวแสง (day length) ชนิดแสง (light quality) และความเข้มแสง (light intensity) ดังนั้นจึงนิยมเลือกใช้ปัจจัยของช่วงความยาวแสงให้เหมือนสภาพที่พืชนั้นขึ้นอยู่ในธรรมชาติ ความเข้มแสงที่เหมาะสมและนิยมใช้ คือ 1,000-4,000 ลักซ์ ส่วนชนิดของแสงสีต่างๆจะช่วยกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของพืชที่เลี้ยงต่างกัน เช่น การเกิดยอดหรือรากจากแคลลัสยาสูบ พบว่าแสงสีน้ำเงินและม่วงส่งเสริมการเกิดยอด ในขณะที่แสงสีแดงส่งเสริมการเกิดราก (คำนูญ กาญจนภูมิ, 2544)

อุณหภูมิและความชื้นภายในห้องเพาะเลี้ยงมีการติดตั้งเครื่องปรับอากาศซึ่งอุณหภูมิที่พอเหมาะอยู่ที่ 24-26 °C ส่วนความชื้นควรมีความชื้นสัมพัทธ์ประมาณร้อยละ 70 เพื่อหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ (คำนูญ กาญจนภูมิ, 2544)

นอกจากนี้การให้ออกซิเจนในการเติบโตของเซลล์ และเนื้อเยื่อนิยมวางบนเครื่องเขย่า เพื่อเพิ่มปริมาณออกซิเจนให้กับเซลล์ โดยเลี้ยงเซลล์บนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 100-120 รอบต่อนาที (คำนูญ กาญจนภูมิ, 2544)

อนุมูลอิสระ และสารต้านอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ คือ อะตอม โมเลกุล หรือสารประกอบที่มีอิเลคตรอนเดี่ยวอยู่ในออร์บิทัลวงนอกสุดที่มีระดับพลังงานสูง (ตารางที่ 4) อิเลคตรอนเดี่ยวนี้จะไม่เสถียรและพยายามจับคู่กับอิเลคตรอนเดี่ยวอื่น จึงทำให้อนุมูลอิสระมีความไวสูงในการเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นอย่างต่อเนื่อง อย่างไรก็ตามยังคงมีอนุมูลอิสระบางชนิดที่มีความสำคัญในทางชีวภาพ ได้แก่ อนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์แอนอิออน ($O_2^{-\bullet}$) อนุมูลไฮดรอกซี ($^{\bullet}OH$) และอนุมูลเปอร์ไฮดรอกซี ($HO_2^{\bullet}$) ซึ่งเป็นอนุมูลที่ไวในการเกิดปฏิกิริยาสูงมาก ขณะที่อนุมูลอิสระที่มีความไวสูงรองลงมา ได้แก่ อนุมูลไนตริกออกไซด์ ($^{\bullet}NO$) อนุมูลวิตามินอี และอนุมูลวิตามินซี โมเลกุลดังกล่าวจะเป็นตัวก่อเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ในร่างกาย ซึ่งการเผาผลาญอาหารประเภทเนื้อสัตว์ทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในร่างกายจะมีของเสียที่เรียกว่าอนุมูลอิสระเป็นจำนวนมาก

ตารางที่ 4 อนุมูลอิสระ (โอภา วัชระคุปต์, 2549)

อนุมูลอิสระ	
Reactive oxygen species (ROS)	
Superoxide, Superoxide anion	$O_2^{-\bullet}$
Hydroxyl	$^{\bullet}OH$
Hydroperoxyl	$HO_2^{\bullet}$
Peroxyl	$RO_2^{\bullet}$
Alkoxyl	$RO^{\bullet}$
Carbonate	$CO_3^{-\bullet}$
Carbon dioxide	$CO_2^{-\bullet}$
Reactive nitrogen species (RNS)	
Nitric oxide	$^{\bullet}NO$
Nitrogen dioxide	$NO_2^{\bullet}$ $NO_2^{-\bullet}$

ตารางที่ 4 (ต่อ)

	อนุมูลอิสระ
Reactive chlorine species (RCS)	
Atomic chlorine	Cl
Others	
Thioyl radical	RS•

การเกิดอนุมูลอิสระ

การเกิดอนุมูลอิสระมีได้หลายกลไกที่แตกต่างกัน ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 กลไกการเกิดอนุมูลอิสระ (นวลศรี รักอริยะธรรม และอัญชนา เจนวิถีสุข, 2545)

สารตั้งต้น $\longrightarrow$ R•	โมเลกุลของสารตั้งต้นถูกกระตุ้นด้วยความร้อน แสง หรือได้รับอิเลคตรอนจากสารรีดิวซิง หรือถูกกระตุ้นด้วยเอนไซม์ ทำให้เกิดอนุมูลอิสระ (R•)
$R^{\bullet} + O_2 \longrightarrow ROO^{\bullet}$	อนุมูลอิสระ (R•) ทำปฏิกิริยากับออกซิเจน ได้อนุมูลอิสระเปอร์ออกซิล (ROO•)
$ROO^{\bullet} + RH \longrightarrow ROOH + R^{\bullet}_{(ใหม่)}$	อนุมูลอิสระเปอร์ออกซิลทำปฏิกิริยากับไขมัน (RH) ได้ไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (ROOH) และอนุมูลอิสระตัวใหม่ ($R^{\bullet}_{(ใหม่)}$)
$ROO^{\bullet} + ROO^{\bullet} \longrightarrow$ โมเลกุลที่คงตัว	เมื่อใดก็ตามที่อนุมูลอิสระ 2 ตัวมาเจอกันก็จะรวมกันเป็นโมเลกุลที่คงตัว

ผลของอนุมูลอิสระก่อให้เกิดความเสียหายและอันตรายต่อร่างกาย อันนำไปสู่ภาวะพยาธิสภาพของโรคบางโรค หรือเซลล์ทำงานผิดปกติ ซึ่งร่างกายที่มีปริมาณอนุมูลอิสระสะสมอยู่ในระดับสูงทำให้เกิดโรคมะเร็ง โรคหลอดเลือดหัวใจ โรคเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันทำงานผิดปกติ โรค

ข้ออักเสบ โรคแก่ก่อนวัย โรคต้อกระจก โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer) โรคพาร์กินสัน (Parkinson) เป็นต้น

สารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระ หรือ สารต้านออกซิเดชัน เป็นสารที่ทำหน้าที่ยับยั้งหรือต่อต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน หรือสารที่สามารถขจัดอนุมูลอิสระจากร่างกาย แต่ถ้าในสภาวะที่เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันสูงมาก (oxidative stress) ระบบสารต้านอนุมูลอิสระที่ร่างกายสร้างขึ้นยับยั้งหรือต่อต้านอนุมูลอิสระไม่ทันจะส่งผลกระทบต่อเซลล์ และทำลายเซลล์ในอวัยวะส่วนต่างๆ ซึ่งประกอบด้วยโปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต และดีเอ็นเอ จึงก่อให้เกิดโรคดังที่กล่าวมาข้างต้น

โดยปกติสารต้านอนุมูลอิสระจะมีอยู่ 2 ลักษณะ คือ สารที่พบในร่างกาย และสารที่พบในธรรมชาติ

สารต้านอนุมูลอิสระที่พบในร่างกาย แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

1. สารที่เป็นเอนไซม์ เช่น superoxide dismutase: SOD, catalase: CAT, glutathione peroxidase: GPX, glulathione reductase: GR และ glutathione S-transferase: GST
2. สารที่ไม่เป็นเอนไซม์ เช่น glutathione, lipoic acid, ceruloplasmin, albumin transferring, haptoglobin, hemopexin, uric acid, bilirubin และ cysteine

สารต้านอนุมูลอิสระที่พบในธรรมชาติและไม่จัดว่าเป็นเอนไซม์ ได้มาจากการบริโภคผักผลไม้ เช่น วิตามินอี (tocopherols) แคโรทีนอยด์ (carotenoids) วิตามินซี (ascorbic acid) สารประกอบในกลุ่มโพลีฟีนอลิกได้แก่ สเตียรอยด์ (stearoids) ยูบิควิโนน (ubiquinone) ไทออล (thiols) อินโนซิน (imosine) ทัวรีน (taurine) ไพรูเวต (pyruvate) กรดแกลลิก (gallic acid) ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) เป็นต้น จากรายงานการวิจัยสารสกัดจากพืชสมุนไพร และผักพื้นบ้าน ทั้งพืชเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง และพืชในธรรมชาติ (ตารางที่ 6) โดยการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น cytotoxicity antioxidant และ antiparasitic เป็นต้น ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างมากในทางการแพทย์ต่อไป

ตารางที่ 6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา antioxidant activity ของพืชในสกุล *Solanum* และสกุลอื่นๆ

ชื่อพืช	งานวิจัย	ผลการวิจัย	อ้างอิง
S. surattense Bum.	ตรวจสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบ ลำต้น ผล และราก	-รากที่สกัดด้วยตัวทำละลาย acetone มีฤทธิ์ในการขจัดอนุมูลอิสระสูง เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH, $ABTS^{\cdot+}$, $^{\cdot}OH$ radical scavenging และ phosphormolybdenum reduction รวมทั้งมีปริมาณฟีนอลิก และ tannin สูงด้วยเช่นกัน -ส่วนสารสกัดด้วยตัวทำละลาย methanol จากรากและลำต้นมีความสามารถในการ reducing ferric และ metal chelation ได้ดีที่สุด นอกจากนี้พบว่าสารสกัดของรากที่ได้จากตัวทำละลาย acetone และ methanol มีผลในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา peroxodation และ antihemolytic activity ซึ่งช่วยยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระ	Joseph *et al.*, 2011
S. nigrum L. และ *S. torvum* L.	ทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของผักพื้นบ้านในประเทศอินเดียจากสารสกัดใบและผล	ส่วนผลของ *S. torvum* ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย chloroform มีปริมาณฟีนอลิกมากกว่าส่วนผลของ *S. nigrum* ในขณะที่ส่วนผลของ *S. nigrum* ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย methanol มีความสามารถในการขจัดอนุมูลอิสระ และ reducing oxidants ที่ทดสอบด้วยวิธี FRAP และ $ABTS^{\cdot+}$ สูงที่สุด	Loganayaki *et al.*, 2010

ตารางที่ 6 (ต่อ)

ชื่อพืช	งานวิจัย	ผลการวิจัย	อ้างอิง
Ocimum sanctum L.	เปรียบเทียบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของส่วนใบ ลำต้น และดอกในธรรมชาติ กับแคลลัสจากชิ้นส่วนใบ ลำต้น และดอก	แคลลัสจากชิ้นส่วนใบที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 1 mg/L ร่วมกับ kinetin 0.1 mg/L ให้เปอร์เซ็นต์ของการชักนำให้เกิดแคลลัสได้มากที่สุด 99.1±1.4% และแคลลัสมีความสามารถในการขจัดอนุมูลอิสระได้สูงกว่าพืชในธรรมชาติ โดยแคลลัสจากชิ้นส่วนใบมีปริมาณฟีนอลิก 40 mg/ml ของสารสกัด และมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระได้สูงด้วยเช่นกัน	Hakkim *et al.*, 2007
Rosmarinus officinalis L.	ตรวจสอบปริมาณฟีนอลิก และ antioxidant activity ของสารสกัดจากแคลลัส	ชิ้นส่วนลำต้นที่เลี้ยงในอาหารสูตร WPM ที่เติม NAA 1 mg/L สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้น้ำหนักสดมากที่สุด 18.6 g และสารสกัดที่อุณหภูมิ 50 °C จะทำให้ได้ปริมาณฟีนอลิกสูงที่สุด 34.4 mg/g dry weight และมีความสามารถในการขจัดอนุมูลอิสระได้สูงกว่าชุดการทดลองอื่น	Celiktas *et al.*, 2007

ตารางที่ 6 (ต่อ)

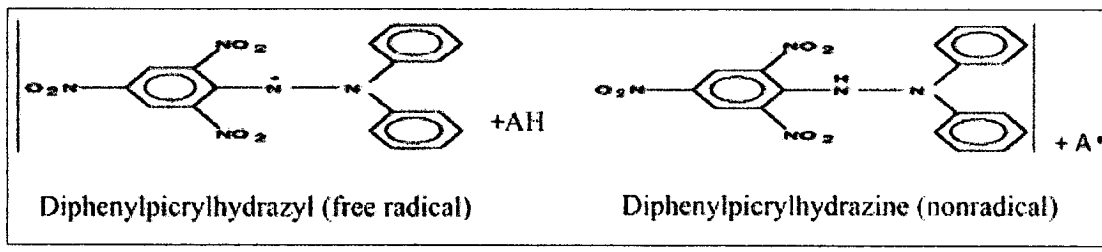
ชื่อพืช	งานวิจัย	ผลการวิจัย	อ้างอิง
Salvia officinalis L.	ตรวจสอบปริมาณฟีนอลิกของแคลลัส และเซลล์แขวนลอยจากชิ้นส่วนปล้อง	แคลลัส และเซลล์แขวนลอยเติบโตได้ดีที่สุดในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 0.05 mg/L ร่วมกับ Zeatin 1.5 mg/L ในขณะที่ปริมาณฟีนอลิกที่สะสมอยู่ในแคลลัสจากอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 0.05 mg/L ร่วมกับ BA 1.5 mg/L มีปริมาณฟีนอลิกสูงกว่าเซลล์แขวนลอยที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 0.05 mg/L ร่วมกับ kinetin 0.5 mg/L	Santos-Gomes *et al.*, 2003
Salvia officinalis L.	ตรวจสอบ antioxidant activity ของสารสกัดจากการเพาะ เลี้ยงในหลอดทดลอง และในธรรมชาติ	สารสกัดด้วยตัวทำละลาย methanol ของ hairy root และรากที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองมีความสามารถในการ reducing Mo และขจัดอนุมูล DPPH ได้ดีที่สุด ตามลำดับ ในขณะที่สารสกัดด้วยตัวทำละลาย acetone ของยอดเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองสามารถต่อต้านปฏิกิริยาการเกิด linoleic acid ได้ดีเท่ากับสารสกัดจากยอด และรากในธรรมชาติ นอกจากนี้ยังพบว่า hairy root มีปริมาณสาร rosmarinic acid มากที่สุด การตรวจสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay จะเกิด ปฏิกิริยาได้ดี เมื่อสารสกัดที่นำมาทดสอบเป็นพวกมีขั้ว	Grzegorczyk *et al.*, 2007

ตารางที่ 6 (ต่อ)

ชื่อพืช	งานวิจัย	ผลการวิจัย	อ้างอิง
ถั่วเหลือง (*Glycine max* (L.) Merril)	ศึกษาฤทธิ์ในการขจัดอนุมูลอิสระในเปลือกหุ้มเมล็ดสีน้ำตาลของถั่วเหลืองที่ผลิตสาร procyanidins	ถั่วเหลืองที่มีเปลือกหุ้มเมล็ดสีดำ สีน้ำตาล และสีแดง-น้ำตาลมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูง ตามลำดับซึ่งให้ผลที่สัมพันธ์กับปริมาณสาร procyanidins ที่พบมากที่สุดในสายพันธุ์ที่มีเปลือกหุ้มเมล็ดสีดำ	Takahata *et al.*, 2001

อนุมูลอิสระที่ใช้ในการศึกษา

1,1 diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH radical) เป็นสารประกอบที่มีอิเลคตรอนอยู่ที่ตำแหน่งของไนโตรเจน และมีความเสถียรจากโครงสร้างเรโซแนนซ์ DPPH• มีลักษณะเป็นของแข็งสีม่วง (free radical) เมื่อถูกรีดิวซ์ด้วยสารต้านอนุมูลอิสระจะทำให้เกิดการเปลี่ยนสีเป็นไม่มีสี (non radical) (ภาพที่ 3) ซึ่งสามารถตรวจสอบได้ด้วยเครื่องวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 517 nm และคำนวณหาค่า EC_{50} (ความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถทำให้ความเข้มข้นของอนุมูล DPPH ลดลงครึ่งหนึ่ง, 50%) ดังนั้น DPPH• รีเอเจนต์ที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสามารถทำได้สะดวก รวดเร็วและง่ายต่อการทดสอบเบื้องต้น (โอภา วัชระคุปต์, 2549)



ภาพที่ 3 ปฏิกิริยาการขจัดอนุมูล DPPH (1,1 diphenyl-2-picrylhydrazyl radical)