สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การเพาะเลี้ยงรากหม่อนเพื่อผลิตสารต้านอนุมูลอิสระ

นายธรรมรัตน์ รักษ์เรืองนาม
นายภาณุพงศ์ กลิ่นบุบผา

ปพ.
ธ353ก
2550
เลขหมู่
เลขทะเบียน 83982
วัน.เดือน.ปี 23 ก.ย. 2551
b. 11983310
i.

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2550

Mulberry Root Culture for Antioxidant Production

Mr. Thammarat Rukrangnam

Mr. Panuphong Klinbubpha

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement

for the Degree of Bachelor of Science

Biotechnology Program

Department of Applied Biology, Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2007

หัวข้อโครงงานพิเศษเรื่อง **การเพาะเลี้ยงรากหม่อนเพื่อผลิตสารต้านอนุมูลอิสระ**
นักศึกษา นายธรรมรัตน์ รักษ์เรืองนาม รหัส 47050129
นายภาณุพงศ์ กลิ่นบุบผา รหัส 47050149
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์
อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้ทำโครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม	
กรรมการ ผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี	
กรรมการ ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์	

....
(รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง)
หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

โครงงานพิเศษเรื่อง การเพาะเลี้ยงรากหม่อนเพื่อผลิตสารต้านอนุมูลอิสระ
นักศึกษา ธรรมรัตน์ รักษ์เรืองนาม 47050129
ภาณุพงศ์ กลิ่นบุบผา 47050149
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์
ปีการศึกษา พ.ศ. 2550
อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร. พนา โลหะทรัพย์ทวี

บทคัดย่อ

จากการทดลองเพาะเลี้ยงรากหม่อนในอาหารเหลวสูตร MS ที่มีการแปรผันความเข้มข้นของฮอร์โมน NAA (0 , 0.1 , 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร)โดยเลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีแสงเปรียบเทียบกับสภาวะไร้แสง หลังจากการเลี้ยงพบว่า สภาวะที่มี NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้รากของต้นหม่อนมีการเจริญเติบโตดีที่สุด คือ ให้ความยาวของรากและน้ำหนักแห้งของรากหม่อนมากที่สุด จากนั้นนำสารสกัดจากรากหม่อนมาทำการวิเคราะห์คุณสมบัติของสารแอนติออกซิแดน โดยวัดกิจกรรมของสารแอนติออกซิแดนด้วยวิธี ABTS และ DPPH ทดสอบปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกด้วยวิธี Folin-Ciocalteu

จากผลการทดลองพบว่า การเจริญของรากหม่อนในอาหารเหลวสูตร MS ที่มี NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายใต้สภาวะที่มีแสง จะให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและค่ากิจกรรมของสารแอนติออกซิแตนสูงสุด

Special Project Title	Mulberry Root Culture for Antioxidant Production		
Name	Thammarat	Rukrangnam	47050129
	Panuphong	Klinbubpha	47050149
Program	Biotechnology		
Department	Applied Biology		
Academic Year	2007		
Seminar Advisor	Assist. Prof.Dr. Pana Lohasupthawee		

Abstract

The growth of mulberry roots in liquid MS media with different concentrations of NAA (0 , 0.1 , 0.5 and 1 mg/l) cultured in the light were comparable to those of mulberry roots cultured under dark condition. The highest increase in dry weight and root length were observed in roots grown in a MS medium containing 0.5 mg/l NAA under light condition. The antioxidant properties and total phenolic contents of methanol extracts of mulberry roots cultured in different conditions were examined. The ABTS and DPPH assays were used for determining the antioxidant activity. The total phenolic content of the extracts was determined by Folin-Ciocalteu method.

The results showed that the highest phenolic content and antioxidant activity were found in roots grown in a MS medium containing 0.1 mg/l NAA under light condition

กิตติกรรมประกาศ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความกรุณาและคำแนะนำจากอาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร. พนา โลหะทรัพย์ทวี ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ ตลอดจนให้ความรู้และประสบการณ์ที่ดีแก่ข้าพเจ้า ข้าพเจ้ามีความซาบซึ้งในความกรุณาที่ได้รับจากอาจารย์ ขอกราบขอบพระคุณ ณ ที่นี้เป็นอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ประธานกรรมการสอบปริญญานิพนธ์ ผศ.ดร. พนา โลหะทรัพย์ทวี และ ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ กรรมการสอบปริญญานิพนธ์ รวมทั้งให้คำแนะนำ ตรวจสอบและชี้แนะในการแก้ไขปริญญานิพนธ์ให้มีความเรียบร้อยสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ ดร.วรรณนพ วิเศษสงวน ที่สอนและให้ความรู้ในเรื่องการทดสอบสารต้านอนุมูลอิสระ และคุณมงคล ยะไชย ที่คอยดูแลและให้คำแนะนำที่ดีเสมอมา

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ธุรการ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาคชีววิทยาประยุกต์ทุกท่านที่ช่วยอำนวยความสะดวกในด้านการติดต่อประสานงาน และอำนวยความสะดวกด้านอุปกรณ์และสารเคมี

ขอขอบคุณเพื่อน พี่ และน้องทุกคนที่คอยให้ความช่วยเหลือในทุกเรื่อง ให้ข้อคิดเห็น กำลังใจ และมิตรภาพที่ดีตลอดมา

ธรรมรัตน์ รักษ์เรืองนาม
ภาณุพงศ์ กลิ่นบุบผา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ข
กิตติกรรมประกาศ ค
สารบัญ ง
สารบัญตาราง จ
สารบัญรูป ฉ

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ 1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ 2
1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ 2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2

บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ

2.1 หม่อน 3
    2.1.1 ลักษณะทั่วไปของหม่อน 3
    2.1.2 สรรพคุณพื้นบ้านของหม่อน 3
    2.1.3 สารสำคัญในใบหม่อน 4
2.2 อนุมูลอิสระหรืออนุพันธ์ออกซิเจนที่ว่องไว 5
    2.2.1 กลไกการทำงานของอนุมูลอิสระ 7
2.3 สารต้านอนุมูลอิสระ 9
    2.3.1 กลไกการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระ 9
    2.3.2 หลักการหาขีดของความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระ 12
2.4 สารประกอบฟีนอล 13

สารบัญ (ต่อ)

หน้า
2.5 ฟลาโวนอยด์ 14
2.5.1 คุณสมบัติ 14
2.5.2 ชนิดของฟลาโวนอยด์ 15
2.5.3 การสกัดและการตรวจสอบฟลาโวนอยด์ในพืช 19
2.5.4 ประโยชน์ของสารฟลาโวนอยด์ 19
2.6 อาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช 20
2.6.1 ประเภทของอาหาร 20
2.6.2 ส่วนประกอบและหน้าที่ของสารอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 21
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย
3.1 พืชที่ใช้ 23
3.2 สารเคมี 23
3.3 วัตถุดิบและอุปกรณ์ 23
3.4 วิธีการทดลอง 24
3.4.1 การเพิ่มปริมาณต้นหม่อนโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสูตรอาหาร MS 24
3.4.1.1 การเตรียมอาหารแข็ง MS 24
3.4.1.2 การเตรียมอาหารเหลว MS 24
3.4.1.3 ขั้นตอนการเปลี่ยนอาหารใหม่ 25
3.4.2 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงรากหม่อน 25
3.4.3 การวัดการเจริญเติบโตของราหม่อนในสูตรอาหารต่างๆ 25
3.4.3.1 การวัดขนาดรากหม่อน 25
3.4.3.2 การหาน้ำหนักรากแห้ง 26
3.4.3.3 การหาปริมาณน้ำตาลที่เหลือ 26
3.4.4 การสกัดสารจากรากหม่อนด้วยเมทานอล 27

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.4.5 การทดสอบคุณสมบัติสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรากหม่อน 28
3.4.5.1 การหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolics) 28
3.4.5.2 การศึกษาคุณสมบัติของสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH 29
3.4.5.3 การศึกษาคุณสมบัติของสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS 30
3.4.6. การวิเคราะห์ทางสถิติ 31

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การเจริญเติบโตของรากหม่อนในอาหารสูตรต่างๆ 32
4.1.1 ความยาวของรากหม่อน 32
4.1.2 น้ำหนักรากหม่อนแห้ง 42
4.1.3 ปริมาณน้ำตาลที่เหลือในการเพาะเลี้ยงรากหม่อน 53
4.2 การทดสอบคุณสมบัติสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรากหม่อน 64
4.2.1 การหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด 64
4.2.2 การศึกษาคุณสมบัติของสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH 68
4.2.3 การศึกษาคุณสมบัติของสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS 79
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง 90
เอกสารอ้างอิง 92
ภาคผนวก ก 95
ภาคผนวก ข 96
ภาคผนวก ค 105
ภาคผนวก ง 114

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่

4.1 แสดงความยาวของรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรMS สภาวะที่ให้แสง ที่เก็บทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 35 วัน 33
4.2 แสดงความยาวของรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรMS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สภาวะที่ให้แสง ที่เก็บทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 35 วัน 34
4.3 แสดงความยาวของรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรMS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สภาวะที่ให้แสง ที่เก็บทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 35 วัน 35
4.4 แสดงความยาวของรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรMS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สภาวะที่ให้แสง ที่เก็บทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 35 วัน 36
4.5 แสดงความยาวของรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรMS สภาวะที่ไม่ให้แสง ที่เก็บทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 35 วัน 37
4.6 แสดงความยาวของรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรMS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สภาวะที่ไม่ให้แสง ที่เก็บทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 35 วัน 38
4.7 แสดงความยาวของรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรMS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สภาวะที่ไม่ให้แสง ที่เก็บทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 35 วัน 39
4.8 แสดงความยาวของรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรMS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สภาวะที่ไม่ให้แสง ที่เก็บทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 35 วัน 40
4.9 แสดงดัชนีความยาวของรากหม่อนเฉลี่ยที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรและสภาวะต่างๆ ของวันที่ 35 41
4.10 แสดงน้ำหนักรากหม่อนแห้งที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรMS สภาวะที่ให้แสง เก็บทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 35 วัน 43
4.11 แสดงน้ำหนักรากหม่อนแห้งที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรMS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สภาวะที่ให้แสง ที่เก็บทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 35 44

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ตารางที่

4.12 แสดงน้ำหนักรากหม่อนแห้งที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรMS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สภาวะที่ให้แสง ที่เก็บทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 35 45
4.13 แสดงน้ำหนักรากหม่อนแห้งที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรMS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สภาวะที่ให้แสง ที่เก็บทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 35 46
4.14 แสดงน้ำหนักรากหม่อนแห้งที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรMS สภาวะที่ไม่ให้แสง เก็บทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 35 วัน 47
4.15 แสดงน้ำหนักรากหม่อนแห้งที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรMS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สภาวะที่ไม่ให้แสง ที่เก็บทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 35 48
4.16 แสดงน้ำหนักรากหม่อนแห้งที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรMS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สภาวะที่ไม่ให้แสง ที่เก็บทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 35 49
4.17 แสดงน้ำหนักรากหม่อนแห้งที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรMS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สภาวะที่ไม่ให้แสง ที่เก็บทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 35 50
4.18 แสดงดัชนีน้ำหนักรากแห้งเฉลี่ยที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรและสภาวะต่างๆ กัน ของวันที่ 35 51
4.19 แสดงความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสต่อค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร 54
4.20 แสดงปริมาณน้ำตาลที่เหลือในอาหารสูตรMS สภาวะที่ให้แสง ที่เก็บทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 35 วัน 55
4.21 แสดงปริมาณน้ำตาลที่เหลือในอาหารสูตรMS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สภาวะที่ให้แสง ที่เก็บทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 35 วัน 56
4.22 แสดงปริมาณน้ำตาลที่เหลือในอาหารสูตรMS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สภาวะที่ให้แสง ที่เก็บทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 35 วัน 57
4.23 แสดงปริมาณน้ำตาลที่เหลือในอาหารสูตรMS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สภาวะที่ให้แสง ที่เก็บทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 35 วัน 58

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ตารางที่

4.24 แสดงปริมาณน้ำตาลที่เหลือในอาหารสูตรMS สภาวะที่ไม่ให้แสง ที่เก็บทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 35 วัน 59
4.25 แสดงปริมาณน้ำตาลที่เหลือในอาหารสูตรMS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สภาวะที่ไม่ให้แสง ที่เก็บทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 35 วัน 60
4.26 แสดงปริมาณน้ำตาลที่เหลือในอาหารสูตรMS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สภาวะที่ไม่ให้แสง ที่เก็บทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 35 วัน 61
4.27 แสดงปริมาณน้ำตาลที่เหลือในอาหารสูตรMS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สภาวะที่ไม่ให้แสง ที่เก็บทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 35 วัน 62
4.28 แสดงปริมาณน้ำตาลที่เหลือเฉลี่ยที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรและสภาวะต่างๆ กัน ที่เก็บทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 35 วัน 63
4.29 แสดงความเข้มข้นของกรดแกลลิกที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร 65
4.30 แสดงปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดจากสารสกัดรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ให้แสง กับอาหารสูตรต่างๆ 66
4.31 แสดงปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดจากสารสกัดรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ไม่ให้แสง กับอาหารสูตรต่างๆ 67
4.32 แสดงปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเฉลี่ยจากสารสกัดรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร และสภาวะต่างๆ กัน 68
4.33 แสดงความเข้มข้นของสารสกัดรากหม่อนในอาหารสูตร MS สภาวะที่ให้แสง กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 515 นาโนเมตร และค่าเปอร์เซ็นต์ DPPH ที่ลดลง 70
4.34 แสดงความเข้มข้นของสารสกัดรากหม่อนในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สภาวะที่ให้แสงกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 515 นาโนเมตรและค่าเปอร์เซ็นต์ DPPH ที่ลดลง 71

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ตารางที่

4.35 แสดงความเข้มข้นของสารสกัดรากหม่อนในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สภาวะที่ให้แสงกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 515 นาโนเมตรและค่าเปอร์เซ็นต์ DPPH ที่ลดลง 72
4.36 แสดงความเข้มข้นของสารสกัดรากหม่อนในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สภาวะที่ให้แสงกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 515 นาโนเมตรและค่าเปอร์เซ็นต์ DPPH ที่ลดลง 73
4.37 แสดงความเข้มข้นของสารสกัดรากหม่อนในอาหารสูตร MS สภาวะที่ไม่ให้แสงกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 515 นาโนเมตร และค่าเปอร์เซ็นต์ DPPH ที่ลดลง 74
4.38 แสดงความเข้มข้นของสารสกัดรากหม่อนในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สภาวะที่ไม่ให้แสงกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 515 นาโนเมตรและค่าเปอร์เซ็นต์ DPPH ที่ลดลง 75
4.39 แสดงความเข้มข้นของสารสกัดรากหม่อนในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สภาวะที่ไม่ให้แสงกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 515 นาโนเมตรและค่าเปอร์เซ็นต์ DPPH ที่ลดลง 76
4.40 แสดงความเข้มข้นของสารสกัดรากหม่อนในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สภาวะที่ไม่ให้แสงกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 515 นาโนเมตรและค่าเปอร์เซ็นต์ DPPH ที่ลดลง 77
4.41 แสดงความเข้มข้นของสารละลาย Trolox กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 515 นาโนเมตร และค่าเปอร์เซ็นต์ DPPH ที่ลดลง 78
4.42 แสดงค่า IC_{50} ของ DPPH จากสารสกัดรากหม่อนในอาหารสูตรและสภาวะต่างๆ กัน 79
4.43 แสดงความเข้มข้นของสารสกัดรากหม่อนในอาหารสูตร MS สภาวะที่ให้แสงกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร และค่าเปอร์เซ็นต์ ABTS ที่ลดลง 80

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ตารางที่

4.44 แสดงความเข้มข้นของสารสกัดรากหม่อนในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สภาวะที่ให้แสงกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร และค่าเปอร์เซ็นต์ ABTS ที่ลดลง 81
4.45 แสดงความเข้มข้นของสารสกัดรากหม่อนในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สภาวะที่ให้แสงกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร และค่าเปอร์เซ็นต์ ABTS ที่ลดลง 82
4.46 แสดงความเข้มข้นของสารสกัดรากหม่อนในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สภาวะที่ให้แสงกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร และค่าเปอร์เซ็นต์ ABTS ที่ลดลง 83
4.47 แสดงความเข้มข้นของสารสกัดรากหม่อนในอาหารสูตร MS สภาวะที่ไม่ให้แสงกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร และค่าเปอร์เซ็นต์ ABTS ที่ลดลง 84
4.48 แสดงความเข้มข้นของสารสกัดรากหม่อนในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สภาวะที่ไม่ให้แสงกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร และค่าเปอร์เซ็นต์ ABTS ที่ลดลง 85
4.49 แสดงความเข้มข้นของสารสกัดรากหม่อนในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สภาวะที่ไม่ให้แสงกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร และค่าเปอร์เซ็นต์ ABTS ที่ลดลง 86
4.50 แสดงความเข้มข้นของสารสกัดรากหม่อนในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สภาวะที่ไม่ให้แสงกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร และค่าเปอร์เซ็นต์ ABTS ที่ลดลง 87
4.51 แสดงความเข้มข้นของสารละลาย Trolox กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร และค่าเปอร์เซ็นต์ ABTS ที่ลดลง 88
4.52 แสดงค่า IC_{50} ของ ABTS จากสารสกัดรากหม่อนในอาหารสูตรและสภาวะต่างๆ กัน 89

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่

2.1 ลักษณะของต้นหม่อน 4

2.2 การเกิดอนุมูลอิสระของอะตอมออกซิเจน 5

2.3 หลักการหาขีดความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการเป็นตัวต้านอนุมูลอิสระ 13

2.4 โครงสร้างพื้นฐานของฟลาโวนอยด์ 15

2.5 โครงสร้างพื้นฐานและตัวอย่างของฟลาโวนอยด์ 17

2.6 โครงสร้างสาร benzo-γ-pyrone 19

3.1 แสดงการบดรากหม่อนแห้งด้วยโกร่ง 27

3.2 แสดงสารสกัดของรากหม่อนแห้งที่ได้จากการสกัดเป็นเวลา 3 วัน 28

4.1 แสดงดัชนีความยาวของรากหม่อนต่อวันที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ ในสภาวะที่ให้แสง 41

4.2 แสดงดัชนีความยาวของรากหม่อนต่อวันที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ ในสภาวะที่ไม่ให้แสง 42

4.3 แสดงค่าดัชนีน้ำหนักรากหม่อนแห้งต่อวันที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ ในสภาวะที่ให้แสง 51

4.4 แสดงค่าดัชนีน้ำหนักรากหม่อนแห้งต่อวันที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ ในสภาวะที่ไม่ให้แสง 52

4.5 แสดงลักษณะรากหม่อนแห้ง 52

4.6 แสดงกราฟมาตรฐานน้ำตาลซูโครสระหว่างความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสต่อค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร 54

4.7 แสดงปริมาณน้ำตาลที่เหลือต่อวันที่เพาะเลี้ยงรากหม่อนในอาหารสูตรต่างๆ ในสภาวะที่ให้แสง 63

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

หน้า

รูปที่

4.8 แสดงปริมาณน้ำตาลที่เหลือต่อวันที่เพาะเลี้ยงรากหม่อนในอาหารสูตรต่างๆ ในสภาวะที่ไม่ให้แสง 66
4.9 แสดงกราฟมาตรฐานกรดแกลลิกต่อค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร 65
4.10 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ DPPH ที่ลดลง ต่อสารสกัดรากหม่อนในสูตรอาหาร MS สภาวะที่ให้แสง 70
4.11 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ DPPH ที่ลดลง ต่อสารสกัดรากหม่อนในสูตรอาหาร MS ที่เติมสาร NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาวะที่ให้แสง 71
4.12 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ DPPH ที่ลดลง ต่อสารสกัดรากหม่อนในสูตรอาหาร MS ที่เติมสาร NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาวะที่ให้แสง 72
4.13 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ DPPH ที่ลดลง ต่อสารสกัดรากหม่อนในสูตรอาหาร MS ที่เติมสาร NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาวะที่ให้แสง 73
4.14 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ DPPH ที่ลดลง ต่อสารสกัดรากหม่อนในสูตรอาหาร MS สภาวะที่ไม่ให้แสง 74
4.15 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ DPPH ที่ลดลง ต่อสารสกัดรากหม่อนในสูตรอาหาร MS ที่เติมสาร NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาวะที่ไม่ให้แสง 75
4.16 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ DPPH ที่ลดลง ต่อสารสกัดรากหม่อนในสูตรอาหาร MS ที่เติมสาร NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาวะที่ไม่ให้แสง 76
4.17 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ DPPH ที่ลดลง ต่อสารสกัดรากหม่อนในสูตรอาหาร MS ที่เติมสาร NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาวะที่ไม่ให้แสง 77
4.18 แสดงกราฟมาตรฐานสารละลาย Trolox ระหว่างปริมาณสาร Trolox ต่อค่าค่าเปอร์เซ็นต์ DPPH ที่ลดลง 78
4.19 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ ABTS ที่ลดลง ต่อสารสกัดรากหม่อนในสูตรอาหาร MS สภาวะที่ให้แสง 80

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

หน้า

รูปที่

4.20 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ ABTS ที่ลดลง ต่อสารสกัดรากหม่อนในสูตรอาหาร MS ที่เติมสาร NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาวะที่ให้แสง 81
4.21 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ ABTS ที่ลดลง ต่อสารสกัดรากหม่อนในสูตรอาหาร MS ที่เติมสาร NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาวะที่ให้แสง 82
4.22 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ ABTS ที่ลดลง ต่อสารสกัดรากหม่อนในสูตรอาหาร MS ที่เติมสาร NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาวะที่ให้แสง 83
4.23 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ ABTS ที่ลดลง ต่อสารสกัดรากหม่อนในสูตรอาหาร MS สภาวะที่ไม่ให้แสง 84
4.24 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ ABTS ที่ลดลง ต่อสารสกัดรากหม่อนในสูตรอาหาร MS ที่เติมสาร NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาวะที่ไม่ให้แสง 85
4.25 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ ABTS ที่ลดลง ต่อสารสกัดรากหม่อนในสูตรอาหาร MS ที่เติมสาร NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาวะที่ไม่ให้แสง 86
4.26 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ ABTS ที่ลดลง ต่อสารสกัดรากหม่อนในสูตรอาหาร MS ที่เติมสาร NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาวะที่ไม่ให้แสง 87
4.27 แสดงกราฟมาตรฐานสารละลาย Trolox ระหว่างปริมาณสาร Trolox ต่อค่าค่าเปอร์เซ็นต์ ABTS ที่ลดลง 88

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidation) เป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นอยู่ตลอดเวลาในร่างกายมนุษย์ ซึ่งภายในอาหารก็เกิดเช่นกัน โดยเฉพาะอาหารที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัว (polyunsaturated fatty acids) มีผลทำให้คุณค่าทางอาหารลดลง (Farag และคณะ, 1989) เนื่องจากเกิดสารอนุมูลอิสระ (free radical) เช่น อนุมูลไฮดรอกซิล (hydroxyl radical) และอนุมูลเปอร์ออกซี (peroxyl radical) เป็นต้น ซึ่งอนุมูลอิสระที่เกิดภายในร่างกายก็มีผลทำให้ ผิวหนังเสียหาย, ความชรา, โรคหัวใจ และโรคมะเร็ง (Cosgrove และคณะ, 1987) ในร่างกายมนุษย์เองก็มีสารที่ยับยั้งสารอนุมูลอิสระเช่นกัน คือ สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระมีภายในร่างกายแล้วยังสามารถรับได้จากภายนอกเช่นกัน คือ อาหาร, เครื่องสำอาง และยา เป็นต้น ซึ่งเป็นตัวเสริมทำให้ร่างกายได้รับสารต้านอนุมูลอิสระอย่างเพียงพอ ได้มีการทำเป็นกลุ่มอาหารเสริม ที่เหมาะกับผู้สูงอายุ (Shukla และคณะ, 1997) ซึ่งช่วยลดการเกิดความเสียหายภายในเซลล์ สารต้านอนุมูลอิสระที่นิยมใช้ คือ butylated hydroxytoluene (BHT) และ butylated hydroxyanisole (BHA) ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่ปัจจุบันได้ห้ามใช้ เนื่องจากเป็นสารก่อมะเร็ง จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้สารต้านอนุมูลอิสระที่มาจากธรรมชาติเป็นที่สนใจ เนื่องด้วยมีปลอดภัยและมาจากธรรมชาติ (Gazzani และคณะ, 1998; Namiki, 1990)

ในปัจจุบันพืชทางธรรมชาติได้รับความสนใจอย่างมาก เพื่อนำมาใช้เป็นแหล่งสารต้านอนุมูลอิสระ, สารยับยั้งการชักนำ (antimutagents) และสารต้านก่อมะเร็ง (anticacinogens) (Dillard และ German, 2000) ได้มีการศึกษาในพืชหลายชนิด เช่น โรสแมรี, สะระแหน่ และพืชที่ให้กลิ่นหอม โดยมีการนำไปใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติในอาหารและพัฒนาอย่างมากในอาหาร, เครื่องสำอาง และอื่นๆ

หม่อน (Mulberry) เป็นพืชกึ่งเมืองร้อน (sub-tropical) แต่สามารถขึ้นในแถบโซนร้อนทั่วไปได้ (กรมวิชาการเกษตร, 2523) มีการใช้ประโยชน์อย่างมาก โดยใบหม่อนใช้เป็นอาหารสัตว์และแมลง, ยา เช่น ยาขับปัสสาวะ, ยาลดน้ำตาลในเลือด และยาความดันโลหิตต่ำ เป็นต้น (Kelkar และคณะ, 1996; Sastri, 1962) และเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพ ด้วยเหตุที่ใบหม่อนมีประโยชน์, รสชาติดีและไม่เป็นพิษ มีรายงานว่าใบหม่อนประกอบด้วย โปรตีน, คาร์โบไฮเดรต, แคลเซียม, เหล็ก, กรดแอสคอร์บิก, เบต้า-เคโรทีน, วิตามิน บี1, กรดโฟลิก และ วิตามิน ดี (Bose, 1989) แล้วต่อมาพบว่ามี

รายงานเกี่ยวกับสารในใบหม่อนที่พบ คือ rutin, quercetin ,isoquercetin และ flavonoids (Zhishem และคณะ, 1999) หม่อนจึงเป็นพืชที่มีความสนใจอย่างมากในการศึกษาด้วยคุณประโยชน์มากมายของพืชชนิดนี้ที่ยังต้องมีการศึกษาต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1.2.1 หาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของรากหม่อน

1.2.2 เพื่อทดสอบคุณสมบัติของสารต้านอนุมูลอิสระของรากหม่อนในแต่ละสูตรอาหารและหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

การหาสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรากหม่อน (*Morus rotanbiloba*) ที่เหมาะสม จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว 4 สูตร คือ อาหารสูตร MS, อาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร, อาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และในอาหาร 4 สูตรทำการเลี้ยงใน 2 สภาวะ คือ ให้แสงและไม่ให้แสงในการเพาะเลี้ยง โดยทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 35 วัน เก็บผลทุกๆ 7 วัน ทำ 3 ซ้ำ โดยทำการวัดการเจริญเติบโตจากความยาวของราก, น้ำหนักรากแห้ง และปริมาณน้ำตาลที่เหลือ

การศึกษาคุณสมบัติของสารต้านอนุมูลอิสระในรากหม่อน และหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด โดยการนำรากหม่อนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารแต่ละสูตรมาสกัดด้วยเมทานอล เป็นเวลา 3 วัน แล้วนำมาหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดโดยวิธี Folin-Ciocalteu และทดสอบคุณสมบัติสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ABTS

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทราบถึงสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงรากหม่อน

1.4.2 ทราบถึงความสามารถต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของรากหม่อนในอาหารแต่ละสูตร

1.4.3 สามารถนำสารสกัดที่ได้ไปใช้ประโยชน์ต่อไป เช่น ผสมในเครื่องสำอาง เป็นต้น

บทที่ 2

ทฤษฎีและหลักการ

2.1 หม่อน กรมวิชาการเกษตร (2523)

2.1.1 ลักษณะทั่วไปของหม่อน

หม่อนมีชื่อภาษาอังกฤษว่า Mulberry และมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Morus sp.* หม่อนเป็นต้นไม้ยืนต้น หม่อนที่รู้จักกันอยู่ในขณะนี้มีอยู่ 2 ชนิด คือ พวกหม่อนที่ปลูกเพื่อรับประทานผล (Black mulberry, *Morus nigra*) มีผลโตเป็นช่อ เวลาผลสุกแล้วมีสีดำรสเปรี้ยวอมหวานใช้รับประทานทำแยมได้ อีกชนิดหนึ่งก็คือ หม่อนที่ใช้ปลูกเลี้ยงไหม (White mulberry, *Morus alba Linn*) หม่อนชนิดนี้มีผลเป็นช่อเล็ก เมื่อสุกแล้วมีสีแดงรสเปรี้ยวไม่ค่อยมี ผู้นิยมรับประทานกัน แต่มีใบโตและมีใบมากใช้ใบเป็นอาหารของไหมได้ดี

หม่อนเป็นพืชที่มีถิ่นกำเนิดในแถบเอเชียเป็นส่วนใหญ่ โดยเฉพาะในประเทศจีนและญี่ปุ่นและทางตอนเหนือของประเทศไทยก็มีหม่อนที่ขึ้นตามธรรมชาติ หม่อนจัดได้ว่าเป็นพืชกึ่งเมืองร้อน (sub-Tropical) แต่สามารถขึ้นในแถบโซนร้อนทั่วไปๆ ได้ ฉะนั้นหม่อนจึงขึ้นได้ดีทั่วประเทศไทย หม่อนต้องการความชุ่มชื้นเล็กน้อยในระยะตั้งตัว แต่เมื่อต้นหม่อนโตเต็มที่หม่อนก็เป็นพืชทนต่อความแห้งแล้งได้ดีพอสมควร อาจจะกล่าวได้ว่าหม่อนขึ้นได้ดีในดินเกือบทุกชนิด แต่โดยทั่วไปแล้วมักจะเลือกดินที่ค่อนข้างเหลวสำหรับปลูกหม่อน ถ้าดินมีความอุดมสมบูรณ์ต้นหม่อนก็จะให้ผลผลิตสูง หม่อนเป็นพืชที่ชอบดินร่วนปนทราย ดูดซึมน้ำได้ดี และดินที่มีลักษณะค่อน ข้างจะเป็นด่าง

ใบหม่อนโดยทั่วไปมีรูปลักษณะปลายแหลม และขอบใบหยัก ฐานใบลักษณะคล้ายใบโพธิ์ ตามผิวใบมีเยื่อคิวติเคิล (cuticle) ซึ่งช่วยกันการระเหยของน้ำจากใบได้ ดอกหม่อนจะรวมกันอยู่เป็นช่อ 4-10 ดอก และอาจเป็นดอกที่มีดอกตัวผู้ดอกตัวเมียแยกกันโดยรวมกันอยู่ในช่อดอกเดียวกันหรือคนละช่อ หม่อนบางพันธุ์ก็มีดอกเป็นดอกสมบูรณ์คือมีเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมียอยู่ในดอกเดียวกัน (รูปที่ 2.1)

2.1.2 สรรพคุณพื้นบ้านของหม่อน

สรรพคุณพื้นบ้านของหม่อนที่มีบันทึกไว้ ได้แก่ ใบมีรสจืดเย็น ใช้เป็นยาขับเหงื่อ แก้เจ็บคอ ต้มดื่มแก้ไข้ ตัวร้อน แก้ร้อนในกระหายน้ำ แก้ไอ ระงับประสาท ผลหม่อนต้มกิน เป็นยาเย็น ยาระบายอ่อนๆ แก้ธาตุไม่ปกติ ดับร้อน ทำให้ชุ่มคอ และบำรุงไต ทำให้เส้นประสาทตาดี สายตาแจ่มใส รักษาโรคไขข้อ บำรุงหัวใจ บำรุงผมให้ดกดำ ตำราสมุนไพรจีนกล่าวถึงสรรพคุณ

ของหม่อนไว้อย่างมากมาย เช่น ยอดหม่อนนำมาต้มใช้ดื่มและล้างตาเพื่อบำรุงสายตา เปลือกรากแก้ไอ แก้หอบหืด ขับเสมหะ ขับปัสสาวะ และเป็นยาระบาย กิ่งหม่อนช่วยทำให้เลือดไหลเวียนสะดวก รักษาอาการปัสสาวะสีเหลืองกลิ่นฉุนอันเกิดจากความร้อนภายในทำให้ลำไส้ทำงานดี ขจัดความร้อนในปอดและกระเพาะอาหารขจัดการหมักหม่นในกระเพาะอาหาร นอกจากนี้ยังใช้รักษาอาการปวดมือ เท้าเป็นตะคริว เหน็บชา โดยใช้กิ่งหม่อนและโคนต้นหม่อนเก่าๆ มาตัดเป็นท่อน ผึ่งไว้ให้แห้ง นำมาต้มดื่มก็สามารถขจัดโรคดังกล่าวได้ (วิโรจน์, 2543)

รูปที่ 2.1 ลักษณะของต้นหม่อน

ที่มา: http://www.moac.go.th/builder/mu/index.php?page=414&clicksub=414&sub=124

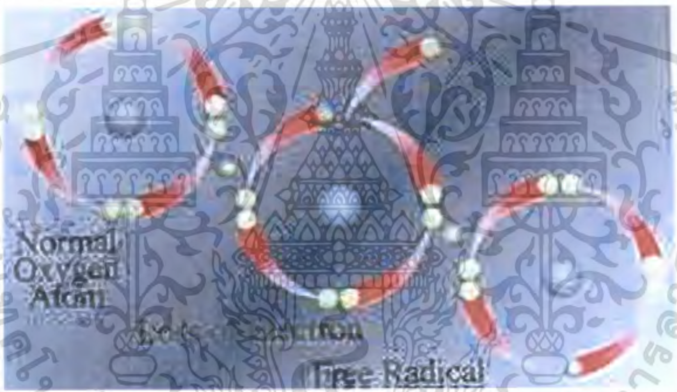
2.1.3 สารสำคัญในใบหม่อน

สารสำคัญในใบหม่อน ได้แก่ สารประเภท phytosterol glycoside เช่น b-sitosterol, b-sitosterol-b-D-glucoside, compesterol, b-ecdysone, inokosterone สารประเภท flavanoids เช่น rutin, quercetin, quercetin-3-*O*-b-D-glucopyranoside, kaempferol-3-*O*-b-D-glucopyranoside สารประเภทน้ำตาลที่มีไนโตรเจนในโมเลกุล เช่น 1-deoxynojirimycin (DNJ), N-methyl-DNJ, 2-O-a-Dgalactopyranosyl DNJ, fagomine, 1,4-dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol,1,2a,3b,4a-tetrahydroxy nortropane (calystegin B2) นอกจากนี้ยังมีสารประเภท coumarin, organic acids, amino acids, saccharides, วิตามิน และแร่ธาตุ

2.2 อนุมูลอิสระ (Free radical) หรืออนุพันธ์ออกซิเจนที่ว่องไว (Reactive oxygen species, ROS)

พรทิพย์ (2550)

อนุมูลอิสระ (Free radical) หรืออนุพันธ์ออกซิเจนที่ว่องไว (Reactive oxygen species, ROS) คือ โมเลกุลหรืออิเล็กตรอนที่มีอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยวอยู่รอบนอกและมีอายุสั้นประมาณ 1 หรือ 10^{-3}-10^{-10} วินาที จึงจัดว่าเป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียรและว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมี แสดงการเกิดอนุมูลอิสระในรูปที่ 2.2 โดยสามารถตรวจวัดด้วย Electron Spin Resonance (ESR) โมเลกุลหรืออิออนชนิดนี้เป็นตัวก่อให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ ตัวอย่างของอนุมูลอิสระ หรือ ROS มีดังนี้ Superoxide anion radical $O^{\bullet}_2$, Hydroxyl radical $HO^{\bullet}$, Peroxide radical $ROO^{\bullet}$, Peroxyl radical $LOO^{\bullet}$, Hydrogen peroxide H_2O_2, Ozone O_3, Singlet oxygen $1O_2$, Hydrogen radical $H^{\bullet}$, Methal radical $CH^{\bullet}_3$



รูปที่ 2.2 การเกิดอนุมูลอิสระของอะตอมออกซิเจน

ที่มา: http://www.healingdaily.com/conditions/free-radicals.htm

ชนิดของอนุมูลอิสระสามารถแบ่งได้อย่างง่ายๆ คือ

1. อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกาย ซึ่งเป็นผลมาจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของร่างกายเอง

2. อนุมูลอิสระจากภายนอกร่างกาย

    2.1. การติดเชื้อทั้งจากแบคทีเรีย และไวรัส

    2.2. การอักเสบชนิดไม่ทราบสาเหตุ (autoummune diseses) เช่น ข้ออักเสบ, รูมาตอยด์, โรคเก๊าท์

3. รังสี

4. สิ่งแวดล้อมที่เป็นมลพิษ เช่น ควันเสีย, เขม่าจากเครื่องยนต์ และ ควันบุหรี่

5. การออกกำลังกายอย่างหักโหม

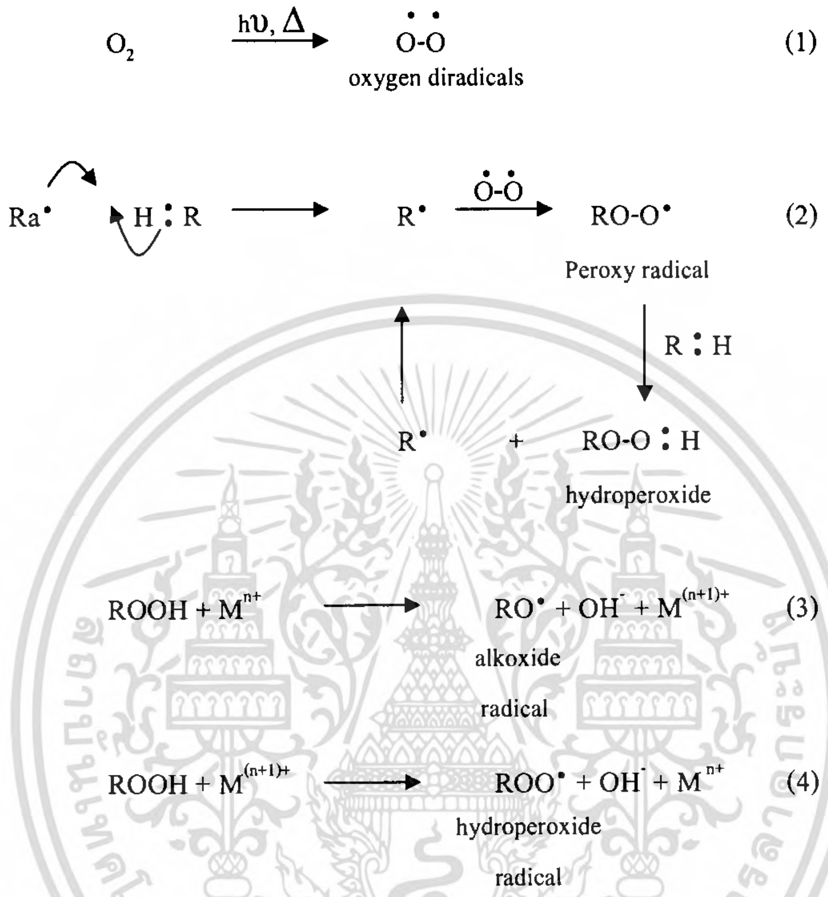
จากที่กล่าวมาแล้วว่าอนุมูลอิสระถูกสร้างขึ้นมาทั้งจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของร่างกายเองและในภาวะที่ผิดปกติ เช่น ภาวะของโรค หรือภาวะที่ร่างกายแวดล้อมด้วยมลพิษโดยภาวะที่ผิดปกติจะส่งผลให้ร่างกายเกิดการสะสมของอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นจำเป็นที่ร่างกายต้องหาทางป้องกันการโดนทำลายจากอนุมูลอิสระเหล่านั้น

ร่างกายมีกลไกที่สามารถป้องกันตัวเองจากอันตรายของอนุมูลอิสระที่สำคัญ 2 วิธี คือ (1) กลไกการซ่อมแซม DNA (DNA repair) การตัด DNA ส่วนที่ผิดปกตินั้นออกไป และการสร้างสาย DNA ที่ปกติขึ้นมาแทนที่และ (2) การใช้สารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งเกิดได้ทั้งจากภายในและภายนอกร่างกาย คือ จากการรับประทานอาหารเข้าไป สารต้านอนุมูลอิสระจะเป็นตัวจัดการกับอนุมูลอิสระเหล่านั้น ก่อนที่มันจะเข้าทำลายต่อ DNA จากข้อมูลทางระบาดวิทยาพบว่าประชากรที่บริโภคพืชผัก ผลไม้ ที่มีสารต้านอนุมูลอิสระ จะเป็นโรคมะเร็งน้อยมาก สารต้านอนุมูลอิสระ เช่น วิตามินซี สามารถลดการเกิดการกลายพันธุ์และการเกิดมะเร็งได้ แต่อย่างไรก็ตามมีบางภาวะที่อนุมูลอิสระมีมากเกินกว่าที่ระบบต้านอนุมูลอิสระจะจัดการได้ จะเกิดสภาวะที่เรียกว่า ภาวะเครียดจากการออกซิเดชัน (oxidative stress) ขึ้นมาซึ่งจะส่งผลต่างๆ ต่อเซลล์สิ่งมีชีวิต

ภาวะเครียดจากการออกซิเดชัน (oxidative stress) คือ สภาวะที่ร่างกายไม่สามารถควบคุมและป้องกันปริมาณของอนุมูลอิสระให้อยู่ในระดับปกติที่ไม่เป็นอันตรายต่อร่างกายได้ โดยอนุมูลอิสระที่มีปริมาณเพิ่มมากขึ้นสามารถเข้าทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลต่างๆ ภายในร่างกาย เช่น การเกิดออกซิเดชันของไขมัน, คาร์โบไฮเดรต, โปรตีน และกรดนิวคลีอิก การสร้างพันธะโควาเลนต์กับโปรตีน เป็นผลทำให้เกิด inactivation ของโปรตีน เป็นต้น และพบว่าอนุมูลอิสระก่อให้เกิดสภาวะทางพยาธิสภาพในโรคสำคัญบางโรค ได้แก่ มะเร็ง, โรคหัวใจ, ไขมันอุดตันในเส้นเลือด,ไขข้ออักเสบ, ต้อกระจก เป็นต้น

การทำลายโมเลกุลที่เป็นต้นเหตุการเกิดของอนุมูลอิสระ นับเป็นกลไกการทำงานของระบบต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญกลไกหนึ่ง ซึ่งเป็นการทำงานที่อาศัยเอนไซม์หรือไม่ก็ได้ สารต้านอนุมูลอิสระที่พบในร่างกายและจัดเป็นเอนไซม์ ได้แก่ Superoxide dismutase (SOD), Catalase (CAT), *Glutathione peroxidase* (GPX), *Glutathione reductase* (GR), *Glutathione S-transferase* (GST) เป็นต้น ส่วนสารต้านอนุมูลอิสระพบในร่างกายแต่ไม่จัดเป็นเอนไซม์ ได้แก่ Glutathione, Haptogobin, Hemopexin, Lipic aicd, Uric acid, Ceruloplasmin, Bilirubin, Cysteine, Albumin, และ Transferrin เป็นต้น สารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้จะทำลายอนุมูลอิสระโดยการจับกับอนุมูลอิสระ ลดการเกิดปฏิกิริยา ณ จุดตั้งต้นหรือยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่

2.2.1 กลไกการทำงานของอนุมูลอิสระ (นงนภัส , 2551)


O2
hυ, Δ
O-O
oxygen diradicals
(1)
Ra•
H : R
R•
O-O
RO-O•
(2)
Peroxy radical
R : H
R•
+
RO-O : H
hydroperoxide
ROOH + Mn+
RO• + OH- + M(n+1)+
(3)
alkoxide
radical
ROOH + M(n+1)+
ROO• + OH- + Mn+
(4)
hydroperoxide
radical

ส่วนใหญ่มักเกิดแบบแรดิคัลหรืออนุมูลอิสระ คือ เมื่อออกซิเจนในอากาศได้รับความร้อนหรือถูกแสงจะเกิดการแตกพันธะแบบเสมอภาค (hemolytic cleavage) ได้เป็นอนุมูลอิสระของออกซิเจนที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยวสองตัว เรียกว่า ไดแรดิคัล (diradicals) ดังสมการที่ 1 และเมื่อมีแรดิคัลอื่นที่เหมาะสม ($Ra^{\cdot}$) มารับไฮโดรเจนจากสารอินทรีย์ไป จะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดังสมการที่ 2 แรดิคัลตัวเริ่มต้น($Ra^{\cdot}$) จะรับเอา H จากโมเลกุลของสารอินทรีย์ (R-H) แล้วให้แอลคิวแรดิคัล ($R^{\cdot}$) ไปรวมกับออกซิเจน กลายเป็นเปอร์ออกซีแรดิคัล ($ROO^{\cdot}$) ซึ่งมีความว่องไวสูงกว่าออกซิเจนไดแรดิคัล ($O\text{-}O^{\cdot}$) จึงสามารถรับเอา H จาก R-H ได้เกิดเป็นไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (ROOH) และให้แอลคิวแรดิคัลเข้าไปทำปฏิกิริยาลูกโซ่ต่อไป กลไกนี้จะเกิดได้เร็วขึ้นเมื่อมีไอออนของโลหะ (M^{n+}) บางชนิด เช่น Fe^{2+} Cu^{2+} หรือ Co^{2+} ร่วมอยู่ด้วย จะทำให้ช่วงเหนี่ยวนำลดลง (สมการที่ 2)โดยไอออนของโลหะทำหน้าที่เป็นตัวให้อิเล็กดรอนกับไฮโดรเปอร์ออกไซด์อย่างรวดเร็ว กลายเป็น

แอลคอกไซด์แรดิคัล (RO$^\bullet$) ดังสมการที่ 3 และเมื่อ M$^{(n+1)+}$ เพิ่มมากขึ้น จะสามารถทำปฏิกิริยากับไฮโดรเปอร์ออกไซด์โมเลกุลอื่น โดยรับอิเล็กตรอน 1 ตัว กลับมาเป็น M^{n+} เข้าไปทำปฏิกิริยาออกซิเดชันต่อไปได้อีก ดังสมการที่ 4 ไอออนของ Fe^{2+} จะเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดีกว่า Fe^{3+} และ Fe^{3+} จะเร่งปฏิกิริยาได้ดีกว่า Cu^{2+} นอกจากนี้ ปฏิกิริยาออโตออกซิเดชัน (autoxidation) เป็นการที่ไขมันกับออกซิเจนในอากาศทำปฏิกิริยากันได้สารประกอบเพอร์ออกไซด์ ซึ่งมีสาเหตุการเกิดจากออกซิเจนและแสง เรียกกลไกนี้ว่า กลไกแบบโฟโตออกซิเดชัน (photooxidation) (ศิวาพร, 2535) โดยกลไกแบบนี้จะไม่มีช่วงเวลาเหนี่ยวนำ ออกซิเจนในสภาวะปกติจะมีอิเล็กตรอนอยู่ในสภาวะที่มีพลังงานต่ำสุดหรือสภาวะพื้น (ground state) การจัดอิเล็กตรอน (electron spin) เป็นแบบ $^3O_2$ (triplet electron state) เมื่อทำปฏิกิริยากับสารอินทรีย์ R-H จะได้เป็นไฮโดรเปอร์ออกไซด์ ดังสมการที่ 5

$$\underset{\uparrow\downarrow}{{}^3O_2} + \underset{\uparrow\downarrow}{R\text{-}H} \longrightarrow \underset{\uparrow\downarrow}{R\text{-}O\text{-}O\text{-}H} \qquad (5)$$

แต่เมื่อปฏิกิริยาออโตออกซิเดชันมีแสงที่ตัวเร่งปฏิกิริยาและมีสารที่ว่องไวต่อปฏิกิริยา (sensitizer) ชนิดอื่น เช่น คลอโรฟิลล์ (chlorophylls) พอร์ไพริน (porphyrins) บิลิรูบิน (bilirubin) หรือ ไรโบฟลาวิน (riboflavin) ร่วมอยู่ในปฏิกิริยาด้วย จะทำให้เกิดโฟโตออกซิเดชันกลไกดังสมการที่ 6

$${}^1\text{Sens} \longrightarrow {}^1\text{Sens(excited)} \longrightarrow {}^3\text{Sens(excited)} \xrightarrow{{}^3O_2} {}^1\text{Sens} + {}^1O_2 \qquad (6)$$

ออกซิเจนที่สภาวะ $^3O_2$ จะถูกกระตุ้นให้มีพลังงานสูงขึ้น มีการเปลี่ยนแปลงการจัดอิเล็กตรอนไปเป็นแบบ $^1O_2$ (singlet electron state) ซึ่งทำปฏิกิริยากับสารอินทรีย์ประเภทไขมันไม่อิ่มตัว (polyunsaturated fatty acid) ได้เป็นไฮโดรเปอร์ออกไซด์ นอกจากนี้ปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลไฮโดรเปอร์ออกไซด์ในสภาวะที่ให้แสงจะเร่งการเกิดได้มากกว่าไม่ให้แสงถึง 1,500 เท่า ไฮโดรเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นจะสลายตัวต่อไปเป็นไฮโดรคาร์บอน แอลกอฮอล์ แอลดีไฮด์และคีโตนที่ระเหยได้เป็นสาเหตุของกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ในอาหาร (Wikipedia, 2007)

2.3 สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) (จักรพงศ์ ,2543)

สารต้านอนุมูลอิสระ คือ สารที่ทำหน้าที่ต่อต้านหรือยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ในที่นี้ หมายถึง สารที่สามารถยับยั้งและควบคุมป้องกันอนุมูลอิสระไม่ให้ไปกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Gordon, 1990)

สารต้านอนุมูลอิสระ คือ สารที่มีในปริมาณน้อยเทียบกับสารที่สามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ซึ่งสามารถยับยั้งหรือหน่วงเหนี่ยวให้ปฏิกิริยาออกซิเดชันไม่เกิดขึ้น

สารที่จัดเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีกลไกการทำงาน ดังนี้

1. กำจัดกลุ่มอนุมูลออกซิเจน (ROS)
2. กำจัดอนุมูลอิสระ
3. กำจัดโลหะไอออน

สารต้านอนุมูลอิสระที่พบในธรรมชาติ แบ่งได้เป็น 4 ประเภท คือ

1. เอนไซม์ที่ผลิตขึ้นในร่างกาย ได้แก่ ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส คาตาเลส กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส และเมทไธโอนีนรีดักเทส (methionine reductase) เป็นต้น
2. วิตามินต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ วิตามินอี ในถั่ว ธัญพืช รำ ข้าวกล้อง งา และวิตามินซี ในผลไม้ ผักสด เป็นต้น
3. แร่ธาตุ เช่น ซิลิเนียม และสังกะสีเป็นโคแฟคเตอร์ (Co-factors) ของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ
4. สารพฤกษเคมี (phytochemicals) เป็นสารเคมีจากพืชที่ไม่ใช่วิตามินและสารอาหาร เช่น แคโรทีน (carotene) ไลโคพีน (lycopene) แซนโธฟิล (xanthophyl) แทนนิน (tannin) และฟลาโวนอยด์ (flavonoid) เป็นต้น

2.3.1 กลไกการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระสามารถจำแนกได้อย่างกว้างๆ จากกลไกของสารต้านอนุมูลอิสระปฐมภูมิและสารต้านอนุมูลอิสระทุติยภูมิ บางปฏิกิริยาของสารต้านอนุมูลอิสระมีกลไกการทำงานมากกว่า 1 กลไกและจะทำหน้าที่หลายๆ อย่างในแต่ละกลไก ปฏิกิริยาต่างๆ ของสารต้านอนุมูลอิสระค่อนข้างผันแปรมากและสามารถทำปฏิกิริยาได้ทุกขั้นตอนในปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระปฐมภูมิ เป็นตัวรับอนุพันธ์อิสระที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาออโตออกซิเดชัน ในขั้นตอนแรกเกิดความล่าช้าหรือถูกยับยั้งได้ การเริ่มต้นของปฏิกิริยาออโตออกซิเดชัน เริ่มแรกจะเกิดขึ้นเมื่อโมเลกุลของ α-methylenic hydrogen ถูกดึงจากกรดไขมันไม่อิ่มตัวออกมาอยู่ในรูปของกรดไขมันอิสระ ($R^{\cdot}$) ดังสมการที่ 1

$$RH \longrightarrow R^{\cdot} + H^{\cdot} \qquad (1)$$

กรดไขมันอิสระนี้จะเกิดปฏิกิริยาได้สูง สามารถทำปฏิกิริยากับออกซิเจนเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของเปอร์ออกไซด์แรดิคัล ($ROO^{\cdot}$) ดังสมการที่ 2

$$R^{\cdot} + O_2 \longrightarrow ROO^{\cdot} + H^{\cdot} \qquad (2)$$

ในระหว่างปฏิกิริยาการถ่ายทอดอนุมูลเปอร์ออกไซด์จะทำปฏิกิริยากับไขมันทำให้เกิดไฮโดรเปอร์ออกไซด์และได้อนุมูลของกรดไขมันอิสระตัวใหม่ที่ไม่เสถียรดังสมการที่ 3 กรดไขมันอิสระนี้จะทำปฏิกิริยากับออกซิเจนให้อนุมูลเปอร์ออกไซด์อิสระอีกตัวหนึ่ง ปฏิกิริยานี้จะมีกลไกดังสมการที่ 4

$$ROO^{\cdot} + RH \longrightarrow ROOH + R^{\cdot} \qquad (3)$$
$$R^{\cdot} + O_2 \longrightarrow ROO + H \qquad (4)$$

ไฮโดรเปอร์ออกไซด์ไม่เสถียรและสามารถแตกสลายให้อนุมูลที่จะไปเร่งปฏิกิริยาต่อไป ปฏิกิริยาเหล่านี้คือปฏิกิริยาลูกโซ่ในสมการที่ 5 และ 6

$$ROOH \longrightarrow RO^{\cdot} + OH^{\cdot} \qquad (5)$$
$$RO^{\cdot} + RH \longrightarrow ROH + R^{\cdot} \qquad (6)$$

ไฮโดรเปอร์ออกไซด์แตกสลายทำให้เกิดกลิ่นและรสชาติไม่ดีคล้ายๆ กับการเกิดกลิ่นเหม็นหืนในปฏิกิริยาออกซิเดชัน สารต้านอนุมูลอิสระปฐมภูมิจะทำปฏิกิริยากับอนุมูลไขมันและเปอร์ออกไซด์แรดิคัลและจะเปลี่ยนแปลงไปอยู่ในรูปที่เสถียรมากขึ้น สารต้านอนุมูลอิสระจะให้อะตอมของไฮโดรเจนแก่กรดไขมันอิสระทำให้เกิดอนุพันธ์ของไขมันและอนุพันธ์อิสระจากสารต้านอนุมูลอิสระ ($A^{\cdot}$) ซึ่งจะมีความเสถียรและมีน้อยลงที่จะไปทำปฏิกิริยาปฏิกิริยาออโตออกซิเดชัน สารต้านอนุมูลอิสระปฐมภูมิในฐานะที่เป็นตัวให้ไฮโดรเจนจะมีความเฉพาะเจาะจงกับเปอร์ออกไซด์แรดิคัลมากกว่าไขมัน ดังนั้นอนุมูลจะอยู่ในรูปของเปอร์ออกซีและออกซีแรดิคัลที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาการถ่ายทอด (ดังสมการ 2 และ 4) และปฏิกิริยาปฏิกิริยาออโตออกซิเดชัน ที่

เกิดขึ้นต่อกันจะถูกยับยั้งโดยสารต้านอนุมูลอิสระปฐมภูมิ (ดังสมการ 7 และ 8) สารต้านอนุมูลอิสระจะมีปฏิกิริยากับกรดไขมันอิสระโดยตรง (ดังสมการ 9)

$$ROO^{\cdot} + AH \longrightarrow ROOH + A^{\cdot} \qquad (7)$$

$$RO^{\cdot} + AH \longrightarrow ROH + A^{\cdot} \qquad (8)$$

$$R^{\cdot} + AH \longrightarrow RH + A^{\cdot} \qquad (9)$$

อนุมูลของสารต้านอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นเมื่อให้ไฮโดรเจนไปแล้วจะมีความเสถียรโดยจะทำปฏิกิริยากับไขมันได้น้อยมากซึ่งจะทำให้เกิดปฏิกิริยาต่อไปได้น้อย อนุมูลของสารต้านออกซิเดชันสามารถเข้าร่วมในปฏิกิริยาสุดท้ายโดยทำปฏิกิริยากับอนุมูลเปอร์ออกซี ($ROO^{\cdot}$) (สมการที่ 10) อนุมูลออกซี ($RO^{\cdot}$) (สมการที่ 11) และสมการต้านอนุมูลอิสระอื่นๆ (สมการที่ 12) ปฏิกิริยาเหล่านี้คือการหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของปฏิกิริยาออโตออกซิเดชัน

$$ROO^{\cdot} + A^{\cdot} \longrightarrow ROOA \qquad (10)$$

$$RO^{\cdot} + A^{\cdot} \longrightarrow ROA \qquad (11)$$

$$A^{\cdot} + A^{\cdot} \longrightarrow AA \qquad (12)$$

ก่อนที่จะเริ่มปฏิกิริยาปฏิกิริยาออโตออกซิเดชันจะต้องผ่านช่วงเวลาเหนี่ยวนำซึ่งจะมีการเกิดอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระถูกใช้ไป ดังนั้น สารต้านอนุมูลอิสระปฐมภูมิจะมีประสิทธิภาพมาก ถ้ามีการเติมลงไปในช่วงแรกของการเกิดออกซิเดชันเมื่อยังไม่เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ต่อไป การเติมสารต้านอนุมูลอิสระลงไปในไขมันซึ่งมีปริมาณเปอร์ออกไซด์สูงอยู่แล้วจะเป็นผลให้สารต้านอนุมูลอิสระสูญเสียการทำงานไปอย่างรวดเร็ว เนื่องจากมีการใช้สารต้านอนุมูลอิสระในปริมาณมาก นอกเหนือจากหน้าที่ในการจับอนุมูลอิสระแล้วสารต้านอนุมูลอิสระปฐมภูมิยังสามารถรีดิวส์ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไปเป็นสารประกอบไฮดรอกซี อย่างไรก็ตามกลไกในการต้านอนุมูลอิสระของสารต้านก็คือการจับกับอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระปฐมภูมิเป็น Mono หรือ Polyhydroxy phenols ที่มีหลายวงแหวนแทนที่หมู่ที่ให้อิเล็กตรอน (ortho และ para) ไปเป็นหมู่ไฮดรอกซีของฟีนอลจะช่วยกิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระ การแทนที่ของหมู่ Butyl หรือหมู่ Ethyl para ไปเป็นหมู่ Hydroxyl จะช่วยเพิ่มกิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระ ส่วนใหญ่สารต้านอนุมูลอิสระปฐมภูมิในอาหารจะเป็นสารประกอบที่สังเคราะห์ขึ้น ตัวอย่างความสำคัญของฟีนอลิกซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระปฐมภูมิจะ

ประกอบด้วย Butylated hydroxyanisole (BHA), Butylatd hydroxytoluene (BHT), Propyl gallate (PG) และ Tertiary butylhydrogiunone (TBHQ) อย่างไรก็ตามองค์ประกอบธรรมชาติในอาหารจะมีกระบวนการทำงานเหมือนกับสารต้านอนุมูลอิสระปฐมภูมิ วิตามินอีส่วนใหญ่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระปฐมภูมิตามธรรมชาติ แคโรทีนอยด์ก็เป็นสารต้านอนุมูลอิสระปฐมภูมิจากธรรมชาติถึงแม้ว่ากลไกการทำงานจะแตกต่างกับสารต้านอนุมูลอิสระที่อยู่ในรูปของสารประกอบฟีนอลก็ตาม

2.3.2 หลักการหาขีดความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระ

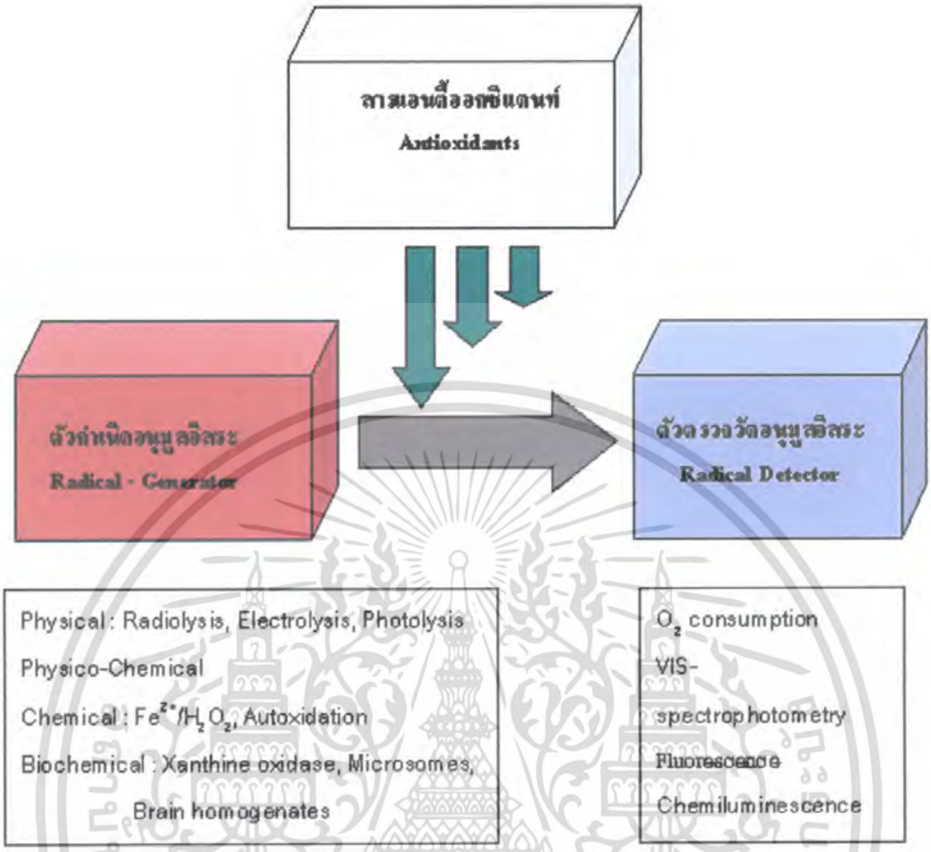
หลักการหาขีดความสามารถในการเป็นตัวต้านอนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระ ส่วนใหญ่ทำโดยอาศัยหลักการดังรูปที่ 2.3 นั่นคือขั้นแรกจะเป็นการสร้างอนุมูลอิสระขึ้นมาก่อน แล้วจึงเติมสารต้านอนุมูลอิสระลงไป จากนั้นทำการตรวจวัดหาอนุมูลที่เหลือหลังจากเกิดปฏิกิริยา ซึ่งหลักการนี้สามารถนำไปใช้ได้อย่างหลากหลายขึ้นกับการเลือกชนิดของตัวกำเนิดอนุมูลอิสระและชนิดของตัวตรวจวัดอนุมูลอิสระ

การตรวจหาคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระ อาทิเช่น การทดสอบสาร DPPH เป็นการตรวจวัดฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ โดยทำการตรวจสอบการลดลงของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร ซึ่งเกิดปฏิกิริยารีดักชัน โดยสารต้านอนุมูลอิสระ (AH) หรือสารตัวอย่างที่ทดสอบทำปฏิกิริยากับ DPPH (สมการที่ 1) และสารอนุมูลอิสระ ($R^{\cdot}$) ทำปฏิกิริยากับ DPPH (สมการที่ 2) ดังสมการ

$$\mathrm{DPPH^{\cdot} + AH \longrightarrow DPPH\text{-}H + A^{\cdot}} \qquad (1)$$

$$\mathrm{DPPH^{\cdot} + R^{\cdot} \longrightarrow DPPH\text{-}R} \qquad (2)$$

ในการตรวจสอบ DPPH ในสารฟีนอล จะเกิดปฏิกิริยาอย่างรวดเร็วในช่วงแรก แต่ต่อมาปฏิกิริยาจะเกิดช้าลง หากในสารสกัดมีสารต้านอนุมูลอิสระจะมีการลดลงของค่าการดูดกลืนแสง ดังนั้นสภาวะที่เสถียรจะเกิดขึ้นโดยใช้เวลาไม่นาน พบว่าจะเกิดหลังจากเวลาผ่านไป 15-30 นาที ทำให้สามารถทราบค่า half maximal effective concentration (EC_{50}) ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นของอนุมูลอิสระที่เหลือ 50 เปอร์เซ็นต์ (Pokorny, 2001)


สารแอนตี้ออกซิแดนท์
Antioxidants
ตัวกำเนิดอนุมูลอิสระ
Radical - Generator
ตัวตรวจวัดอนุมูลอิสระ
Radical Detector
Physical : Radiolysis, Electrolysis, Photolysis
Physico-Chemical
Chemical : Fe^{2+}/H_2O_2, Autoxidation
Biochemical : Xanthine oxidase, Microsomes, Brain homogenates
O_2 consumption
VIS-spectrophotometry
Fluorescence
Chemiluminescence

รูปที่ 2.3 หลักการหาขีดความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการเป็นตัวต้านอนุมูลอิสระ

ที่มา: http://www.gpo.or.th/rdi/html/antioxidants.html

2.4 สารประกอบฟีนอล Bravo (1998)

สารประกอบฟีนอล (Phenolic compounds) เป็นสารในกลุ่ม secondary metabolite ที่ถูกสร้างขึ้นเพื่อประโยชน์ในกระบวนการเจริญเติบโต และการขยายพันธุ์ของพืชแต่ละชนิด ดังนั้นรูปแบบของสารประกอบฟีนอล ในพืชแต่ละชนิดจึงมีความแตกต่างกันออกไป ในปัจจุบันพบว่ามีสารประกอบฟีนอลที่ทราบโครงสร้างแน่นอนแล้วมากกว่า 8,000 ชนิด ตั้งแต่กลุ่มที่มีโครงสร้างอย่างง่าย เช่น กรดฟีนอลิก (phenolic acids) ไปจนถึงกลุ่มที่มีโครงสร้างเป็นโพลิเมอร์ เช่น แทนนิน (tannins) โครงสร้างพื้นฐานของสารประกอบฟีนอลจะเกิดจากการรวมตัวของโมเลกุลน้ำตาลตั้งแต่ 1 โมเลกุลขึ้นไปกับหมู่ไฮดรอกซิล (OH-group) โดยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharides) น้ำตาลโมเลกุลคู่ (disaccharides) หรือโอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharides) ก็ได้ แต่น้ำตาลชนิดที่พบมากที่สุดในโมเลกุลของสารประกอบฟีนอล คือ กลูโคส (glucose) ส่วนน้ำตาลชนิดอื่นที่พบ

ได้แก่ กาแลกโตส (galactose) แรมโนส (rhamnose) ไซโรส (xylose) อะราบิโนส (arabinose) และอนุพันธ์ของน้ำตาลเหล่านี้เช่น กรดกลูโคโรนิก (glucoronic acid) กรดกาแลกตูโรนิก (galacturonic acid) และอื่นๆ นอกจากนี้ยังพบว่าอาจมีการรวมตัวกันระหว่างสารประกอบฟีนอลกับสารประกอบฟีนอลด้วยกันเองหรือสารประกอบฟีนอลกับสารประกอบอื่นๆ เช่น กรดคาร์บอกซิลิก (carboxylic acids) กรดอินทรีย์ (organic acids) อะมีน (amines) และไขมันอีกด้วย

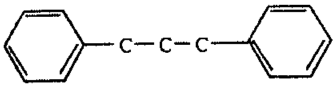
สารประกอบฟีนอลที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำซึ่งสามารถพบได้โดยทั่วไปและมีความสำคัญประกอบด้วย ฟีนอล (phenols, C_6) กรดฟีนอลิก (phenolic acids, C_6-C_1) ฟีนิลโพรพานอยด์ (phenylpropanoids, C_6-C_3), และฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ตัวอย่างของฟีนอล ได้แก่ phenol, cresol , thymol, resorcinol, orcinol และอื่นๆ ซึ่งสามารถพบได้ทั่วไปในพืชที่ถูกนำมาใช้เป็นเครื่องเทศ รวมทั้ง hydroquinone, phloroglucinol และอนุพันธุ์ เช่น arbutine และ sesamol เป็นต้น สำหรับตัวอย่างของกรดฟีนอลิก ได้แก่ gallic acid, vanillic acid, syringic acid, p-hydroxybenzoic acid และอัลดีไฮด์ของกรดฟีนอลิก เช่น vanillin, *p*-hydroxybenzaldehyde syringaldehyde ซึ่งสามารถพบได้ทั่วไปในพืชชั้นสูงและเฟิร์น

2.5 ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) (วันดี ,2536)

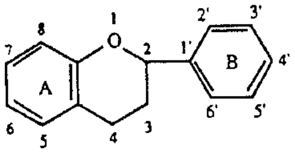
ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) เป็น สารสี (pigments) ที่พบในส่วนต่างๆ ของพืชโดยเฉพาะ ทำให้ดอกไม้มีสีสวยงาม ส่วนใหญ่สีจะออกไปทางสีแดง เหลือง ม่วง และน้ำเงิน ฟลาโวนอยด์เป็นสารประกอบจำพวกโพลีฟีนอล (polyphenolic compound) ในธรรมชาติอาจจะพบอยู่ในรูปอิสระหรือในรูปกลัยโคไซด์ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็น O-glycoside มีบ้างที่เป็น C-glycoside น้ำตาลมักจะมาจับที่ตำแหน่งที่ 3, 5 หรือ 7 ฟลาโวนอล กลัยโคไซด์มักจะพบใน cell sap ของดอกไม้ ผลไม้ และใบไม้โดยอยู่ในรูป soluble pigments สำหรับพวก aglycone มักพบในเนื้อไม้

2.5.1 คุณสมบัติทางเคมี

ฟลาโวนอยด์มีโครงสร้างพื้นฐานเป็น $C_6 - C_3 - C_6$ ส่วนใหญ่จะประกอบด้วย pyran ring จับกับ 3 carbon chain และ 1 benzene ring ดังรูปที่ 2.4 ฟลาโวนอยด์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันที่ oxidation state ของ 3-carbon chain เนื่องจากการเติมกลุ่ม hydroxyl (OH) ลงบน pyran ring



flavonoid skeleton



flavonoid skeleton

รูปที่ 2.4 โครงสร้างพื้นฐานของฟลาโวนอยด์

ที่มา : วันดี, 2536

2.5.2 ชนิดของฟลาโวนอยด์

ฟลาโวนอยด์อาจแบ่งเป็นกลุ่มย่อยตามลักษณะโครงสร้างได้เป็น 12 กลุ่ม (แสดงในรูปที่ 2.5) ดังนี้

1. ฟลาโวนส์ (flavones)
2. ไอโซฟลาโวนส์ (isoflavones)
3. ฟลาโวนอลส์ (flavonols)
4. ฟลาวาโนนส์ (flavanones)
5. ฟลาวาโนนอลส์ (flavanonols)
6. ลิวโคแอนโธไซยานินส์ (leucoanthocyanins)
7. แอนโธไซยานินส์ (anthocyanins)
8. คาทีชินส์ (catechins)
9. ชาลโคนส์ (chalcones)
10. ไดไฮโดรชาลโคนส์ (dihydrochalcones)
11. ออโรนส์ (aurones)
12. แซนโทนส์ (xanthones)

2.5.2.1 ฟลาโวนส์ ไอโซฟลาโวนส์ และฟลาโวนอลส์

ฟลาโวนส์ และฟลาโวนอลส์เป็นสารที่ให้สารสีเหลืองซึ่งพบได้ในพืชเป็นจำนวนมาก (ยกเว้นสีเหลืองเข้มซึ่งมักจะเป็นสารจำพวก carotenoids) สารจำพวกฟลาโวนส์บางตัว เช่น luteolin ใช้เป็นสีย้อมชนิดแรกในยุโรป quercetin และ kaempferol เป็นฟลาโวนอยส์ที่พบบ่อยที่สุดในพืชชั้นสูง ในรา *Aspergillus candidus* พบฟลาโวนอลชื่อ chlorflavonin ซึ่งมีฤทธิ์ต้านจุลชีพได้ ส่วนไอโซฟลาโวนส์เป็นสารไม่มีสีพบได้น้อยในพืช

การเกิดกลัยโคไซด์ของสารทั้งสามกลุ่มนี้ พบว่าฟลาโวนส์ และไอโซฟลาโวนส์ มักจะเกิดกลัยโคไซด์ที่ตำแหน่ง C-7 ส่วนฟลาโวนอลส์ มักจะเกิดที่ C-3 น้ำตาลที่พบมาก คือ กลูโคส กาแล็คโทส และแรมโนส (rhamnose) ฟลาโวนส์บางตัวจะพบเป็น C-glycoside เช่น vitexin

2.5.2.2 ฟลาวาโนนส์

เป็นสารที่ไม่มีสี หรืออาจมีสีเหลืองอ่อนๆ พบได้น้อยในพืช ฟลาวาโนนส์กลัยโคไซด์ที่รู้จักกันดี คือ hesperidin และ naringin ซึ่งพบได้ในเปลือกผลส้ม

2.5.2.3 ฟลาวาโนนอลส์

เป็นสารที่ไม่มีสี หรือมีสีเหลืองอ่อน พบได้น้อยมากในพืช สารจำพวกนี้เมื่อถูกด่างในอุณหภูมิสูง (warm alkali) จะสลายตัวให้ชาลโคนส์ แต่คงตัวในกรดเมื่อมีความร้อน

2.5.2.4 ลิวโคแอนโธไซยานินส์

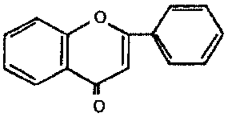
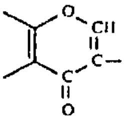
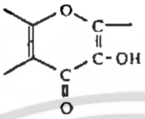
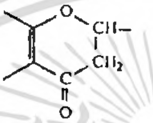
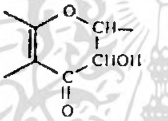
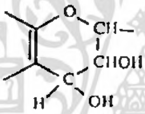
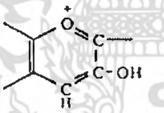
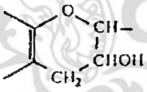
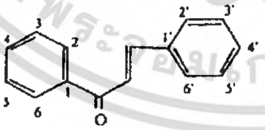
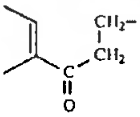
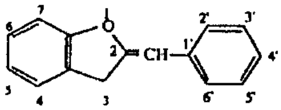
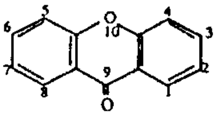
เป็นสารที่ไม่มีสี มีโครงสร้างเป็น polyhydroxyflavan-3,4-diol พบได้น้อยในรูปของกลัยโคไซด์ aglycone ของสารในกลุ่มนี้เรียกลิวโคแอนโธไซยานิดิน(leucoanthocyanidin) ซึ่งเมื่อถูกกรด มีออกซิเจนและมีความร้อน บางส่วนจะถูกเปลี่ยนเป็นแอนโธไซยานิดิน

2.5.2.5 แอนโธไซยานินส์

เป็นสารสีออกชมพู แดง ม่วง จนถึงน้ำเงิน พบได้ในกลีบดอกไม้ และส่วนอื่นๆ ของพืช เช่น กลีบเลี้ยง ใบ เปลือกผล aglycone ของแอนโธไซยานินส์ เรียกว่าแอนโธไซยานิดินส์ (anthocyanidins) ในธรรมชาติมักพบในรูปกลัยโคไซด์ซึ่งมีน้ำตาลมาเกาะที่ตำแหน่ง C-3 หรือ C-5 และยังพบเป็นจำนวนมากที่น้ำตาลมาเกาะทั้งสองตำแหน่งได้เป็น 3,5-diglycosides ซึ่งลักษณะดังกล่าวจะไม่พบในฟลาโวนอยด์ชนิดอื่นๆ

ตัวอย่างของพืชที่มีแอนโธไซยานินส์ ได้แก่ ดอกกุหลาบแดง ดอกอัญชัน ดอกเข็มสีแดง เป็นต้น สีแดงในดอกไม้บางชนิดไม่ใช่สารแอนโธไซยานินส์ แต่เป็นเบต้าไซยานินส์ (betacyanins) เช่น สีแดงของดอกเฟื่องฟ้า หงอนไก่ บานเย็น และหัวบีทรูส ซึ่งเป็นพืชในวงศ์ Nyctaginaceae, Amaranthaceae และ Centrospermae เป็นต้น สีแดงของแอนโธไซยานินส์จะมีคุณสมบัติเป็น indicator ในตัวเอง ทั้งนี้เพราะแอนโธไซยานินส์มีลักษณะเป็นประจุ (ionic) สีที่เกิดขึ้นจะขึ้นอยู่กับ pH ของสารละลาย ในสารละลายที่เป็นกรดแอนโธไซยานินส์จะให้สีแดงปนส้ม ในสารละลายที่เป็นกลางจะอยู่ในสภาพ pseudobase ซึ่งไม่มีสี ในด่างจะอยู่ในสภาพ anhydrobase ซึ่งให้สีม่วง-น้ำเงิน เมื่อ pH เปลี่ยน ปฏิกิริยาเหล่านี้จะเปลี่ยนกลับไปกลับมาได้ แต่ถ้า pH สูงมากๆ ปฏิกิริยาก็จะไม่เปลี่ยนกลับมา

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ชนิดของฟลาโวนอยด์		ตัวอย่างสาร
1. flavones		a) chrysin : dihydroxy 5, 7 b) apigenin : trihydroxy 5, 7, 4' c) luteolin : tetrahydroxy 5, 7, 3', 4'
2. isoflavones		a) genistein : trihydroxy 5, 7, 4' b) orobol : tetrahydroxy 5, 7, 3', 4'
3. flavonols		a) quercetin : tetrahydroxy 5, 7, 3', 4' b) kaempferol : trihydroxy 5, 7, 4' c) myricetin : pentahydroxy 5, 7, 3', 4', 5'
4. flavanones		a) hesperetin : trihydroxy 5, 7, 3', monomethoxy 4' b) butin : trihydroxy 7, 3', 4' c) naringenin : trihydroxy 5, 7, 4'
5. flavanonols		a) taxifolin : tetrahydroxy 5, 7, 3', 4'
6. leucoanthocyanidins		a) melacacidin : tetrahydroxy 7, 8, 3', 4' b) peltogynol : trihydroxy 7, 3', 4'
7. anthocyanidins		a) pelargonidin : trihydroxy 5, 7, 4' b) cyanidin : tetrahydroxy 5, 7, 3', 4' c) delphinidin : pentahydroxy 5, 7, 3', 4', 5'
8. catechins		a) catechin : tetrahydroxy 5, 7, 3', 4' b) gallocatechin : pentahydroxy 5, 7, 3', 4', 5' c) afzelechin : trihydroxy 5, 7, 4'
9. chalcones		a) dahlia chalcone : trihydroxy 2, 4, 4'
10. dihydrochalcones		a) phloretin : tetrahydroxy 2, 4, 6, 4'
11. aurones		a) aureusidin : tetrahydroxy 4, 6, 3', 4' b) sulphuretin : trihydroxy 6, 3', 4'
12. xanthones		a) gentisin : 1, 7 dihydroxy - 3 - methoxyxanthone

รูปที่ 2.5 โครงสร้างพื้นฐานและตัวอย่างของฟลาโวนอยด์

ที่มา : วันดี, 2536

83982

แอนโธไซยานินส์ในสารละลายที่เป็นด่างจะถูกออกซิไดซ์ได้ง่ายโดยอากาศและถูกทำลาย จึงมักทำให้สารละลายอยู่ในสภาวะที่เป็นกรด แอนโธไซยานินส์ชนิดต่างๆ จะต่างกันที่กลุ่ม OH บน ring B ทำให้สีแตกต่างกัน แอนโธไซยานินส์ที่สำคัญ ได้แก่ pelargonidin, cyanidin และ delphinidin

แอนโธไซยานินส์อาจถูก methylated ที่ตำแหน่ง 3’ และ 5’ มีผลทำให้ความแดงของสีเพิ่มขึ้น ในทางตรงข้ามการเติมกลุ่ม OH จะเพิ่มความเป็นสีน้ำเงินมากยิ่งขึ้น

2.5.2.6 คาทีชินส์

มีโครงสร้างเป็น polyhydroxy flavan-3-ol เป็นสารไม่มีสี พบได้ในพืชทั่วไปโดยเฉพาะ woody plant คาทีชินส์เป็นสารตั้งต้นของ condensed tannin มีคุณสมบัติพิเศษคือ เมื่อถูกความร้อน กรด หรือเอ็นไซม์ จะเปลี่ยนจากสารที่ไม่มีสีเป็นสารสีแดง (tannin red) ซึ่งไม่ละลายน้ำ ตัวอย่างของคาทีชินส์ ได้แก่ catechin, gallocatechin

2.5.2.7 ชาลโคนส์ และ ไดไฮโดรชาลโคนส์

เป็นสารกลุ่มเล็กๆ ที่พบได้น้อยในธรรมชาติ ชาลโคนส์เป็น pigment สีเหลืองเข้ม ในสารละลายที่เป็นกรด ชาลโคนส์จะเปลี่ยนเป็นฟลาวาโนนส์ได้ ในสารละลายที่เป็นด่างปฏิกริยาจะเกิดตรงกันข้าม ในด่างสีของชาลโคนส์จะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีส้ม-แดง

ชาลโคนส์ พบได้ในดอกไม้สีเหลืองของพืชในวงศ์ Compositae, Oxalidaceae, Scrophulariaceae, Acanthaceae และ Liliaceae เป็นต้น เมื่อชาลโคนส์ถูก reduce ที่ α-β-double bond จะได้ dihydrochalcones สารในกลุ่มนี้ที่น่าสนใจ คือ phlorizin (aglycone คือ phloretin) ซึ่งเป็นสารที่ทำให้เกิด glycosuria ในสัตว์

2.5.2.8 ออโรนส์

เป็นสารสีเหลืองทอง พบได้ทั้งในรูปอิสระและในรูปกลัยโคไซด์ ในสารละลายที่เป็นด่างสีจะเปลี่ยนเป็นสีแดงกุหลาบ ออโรนส์มีโครงสร้างที่ต่างกับฟลาโวนอยด์ตัวอื่นๆ คือ มีโครงสร้างเป็น 2-benzylidene coumaranone

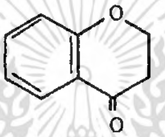
2.5.2.9 แซนโทรน

เป็นสารสีเหลือง มีโครงสร้างเป็นอนุพันธ์ของ benzophenone อาจจะจัดอยู่ในโครงสร้างแบบ C_6-C_3-C_6 ที่จัดสารกลุ่มนี้ไว้ในกลุ่มฟลาโวนอยด์เนื่องจากมีขบวนการชีวสังเคราะห์ที่เกี่ยวข้องกับสารในกลุ่มนี้ สารที่รู้จักดีคือ gentisin ซึ่งพบในรากของ *Gentiana lutea* และ mangiferin ซึ่งเป็นกลัยโคไซด์ของ *Mangifera indica*

2.5.3 การสกัดและการตรวจสอบฟลาโวนอยด์ในพืช

การสกัดฟลาโวนอยด์จากพืชสด นิยมสกัดด้วยเมทธานอลหรือเอทธานอล ทั้งฟลาโวนอยด์กลัยโคไซด์ และ aglycone จะไม่ละลายในปิโตรเลียมอีเทอร์ จึงมักสกัดพืชด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ก่อนเพื่อสกัดเอาไขมันออกก่อนที่จะสกัดด้วยแอลกอฮอล์ ในการคัดแยกเพื่อหาฟลาโวนอยด์มักสกัดด้วย 80 เปอร์เซ็นต์ เอทธานอล, เอธิลอะซิเตต เป็นตัวทำละลายที่เหมาะสำหรับใช้สกัดคาทีชินส์และลิวโคแอนโธไซยานิดินส์ ส่วนเอมิลแอลกอฮอล์มักนิยมใช้สกัดแอนโธไซยานินส์

การตรวจสอบฟลาโวนอยด์มักใช้ปฏิกริยา cyanine reaction ซึ่งใช้ทดสอบ benzo-γ-pyrone nucleus (แสดงในรูปที่ 2.6) แต่ปฏิกิริยานี้จะให้ผลเป็นบวกกับสารอื่นๆ ที่มี nucleus นี้แต่ไม่ใช่ฟลาโวนอยด์ด้วย



benzo-γ-pyrone

รูปที่ 2.6 โครงสร้างสาร benzo-γ-pyrone

ที่มา : วันดี, 2536

วิธีทดสอบทำได้โดยนำสารสกัดแอลกอฮอล์ที่สกัดจากพืชที่ต้องการทดสอบมาเติม magnesium ribbon ชิ้นเล็กๆ ลงไป 2-3 ชิ้น แล้วหยดกรดเกลือเข้มข้น 3-4 หยด ดูสีที่เกิดขึ้นภายใน 1-2 นาที ความเข้มของสีที่เกิดขึ้นอยู่กับปริมาณของฟลาโวนอยด์ ถ้าสีที่เกิดเป็นสีส้ม-แดง แสดงว่ามีฟลาโวนส์ ถ้าสีที่เกิดขึ้นเป็นสีแดง-แดงเลือดหมู แสดงว่ามีฟลาโวนอยลส์ ถ้าเป็นสีเลือดหมู-ม่วง แสดงว่ามีฟลาวาโนนส์ ในบางกรณีสีที่เกิดขึ้นอาจเป็นสีเขียว-น้ำเงิน ก็ถือว่ามีค่าเป็นบวกในการทดสอบ กับ cyanidin reaction ก็คือสีที่เกิดขึ้นไม่ชัดเจน เนื่องจากในพืชมีสารสีอื่นๆ มาปะปน

2.5.4 ประโยชน์ของสารฟลาโวนอยด์

ฟลาโวนอยล์หลายชนิดมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เช่น rutin ใช้รักษาโรคเส้นเลือดฝอยเปราะ ฟลาโวนอยด์ใน Buchu ใช้เป็นยาขับปัสสาวะ ไอโซฟลาโวนส์ใน Clover มีฤทธิ์คล้าย estrogen อ่อนๆ ฟลาโวนอยด์บางชนิดมีฤทธิ์ฆ่าแมลง ต้านเชื้อรา แก้อักเสบ และต้านเซลล์มะเร็ง เป็นต้น

2.6 อาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (พงศ์ยุทธ, 2550)

อาหารเป็นสิ่งจำเป็นของต้นพืชทั่วๆไป เช่นเดียวกันเซลล์และเนื้อเยื่อพืชที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อในขวดทดลอง (*in vitro*) ก็ต้องการอาหารเหมือนกับต้นไม้ที่อยู่ในสภาพธรรมชาติ อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชส่วนใหญ่ประกอบด้วย ธาตุอาหาร สารเร่งการเจริญเติบโตหรือฮอร์โมน และน้ำเป็นหลัก ซึ่งนอกจากจะมีผลต่อการเจริญเติบโตแล้วยังมีผลต่อการพัฒนาของอวัยวะหรือส่วนต่างๆของพืช หรือการพัฒนากลับคืนเป็นต้นใหม่

2.6.1 ประเภทของอาหาร

1. อาหารกึ่งแข็ง (Semi-solid medium) เทคนิคที่ใช้ในยุคแรกๆนั้น ใช้วุ้น (agar) เพื่อปรับสารละลายอาหารให้มีสภาพเป็นของแข็งมากขึ้น โดยนึ่งในหม้อนึ่งความดันเพื่อหลอมละลายอาหารแล้วเทใส่ภาชนะและทิ้งให้แข็งตัวอยู่ในสภาพอาหารกึ่งแข็ง แต่มักพบว่าคุณสมบัติต่างๆ ของสารประกอบเคมีในอาหารอาจไม่ได้รับสูงสุดเท่ากับอาหารเหลว (liquid medium) กระนั้นก็ตามวุ้นยังคงถูกนำมาใช้แต่จำเป็นต้องดัดแปลงให้เหมาะสม และต้องแน่ใจว่ามีความบริสุทธิ์จริงๆ และการใช้วุ้นปริมาณมากเกินไปอาจไปยับยั้งการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อได้ ดังนั้นความเข้มข้นของวุ้นที่พอเหมาะสำหรับอาหารแต่ละชนิดจะต้องมีการทดสอบเสียก่อน อย่างไรก็ตาม ความเข้มข้นที่ใช้กันแพร่หลายและได้ผลดีเพื่อวัตถุประสงค์ส่วนใหญ่คือ 0.8 เปอร์เซ็นต์ สารสังเคราะห์พวก gelatin และ silica gel ได้เคยมีการนำมาใช้ และในปัจจุบันมีการพัฒนาสารประกอบพวก acrylamide gels เช่นเดียวกับ starch co-polyners ก็มีการแนะนำมาใช้แทนวุ้น สารเหล่านี้มีข้อดีที่ไม่จำเป็นต้องต้มให้เดือดเพื่อช่วยให้ละลายน้ำได้ แต่ยังมีปัญหาในเรื่องการปรับค่า pH ในขณะที่สารพวกผงถ่าน (charcoal) ถูกเติมในอาหารหลายสูตร เพื่อช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโต เนื่องจากสามารถดูดซับสารพิษพวก toxic metabolites ที่เกิดจากเนื้อเยื่อพืชที่เลี้ยงได้ดี

2. อาหารเหลว (Liquid medium) อาหารเหลวเป็นที่นิยมใช้อย่างกว้างขวาง เนื่องจากเนื้อเยื่อจะจมหรือแขวนลอยอยู่บนกระดาษกรองที่จุ่มในอาหารเหลวตลอดเวลา ในทางปฏิบัติอาจใช้ glass wool ช่วยพยุงเนื้อเยื่อที่เลี้ยงได้เช่นกัน เช่นเดียวกับการใช้ fabric support (100 เปอร์เซ็นต์ polyester) ที่อิ่มตัวด้วยอาหารเหลว ซึ่งจะช่วยให้การเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานเกิดได้ดีขึ้น เนื้อเยื่อที่จมอยู่ในอาหารเหลวอาจถูกคนที่ความเร็ว 1-150 รอบต่อนาที เพื่อช่วยในการหายใจ นอกจากนี้ ยังพบว่ามีประชากรวิกฤตของเซลล์ที่มีความหนาแน่นน้อยที่สุดในการเลี้ยงเนื้อเยื่อแต่ละชนิดได้อย่างมีประสิทธิภาพ ถ้าเลี้ยงในปริมาณน้อยจะต้องเติมสารบางชนิด เช่น กรดอะมิโน (ซึ่งโดยปกติในการเลี้ยงเซลล์จำนวนมากๆ จะไม่ต้องการ) อิทธิพลของประชากร (population effects) ดังกล่าวนี้เกิดขึ้นในทำนองเดียวกับที่พบในการงอกของละอองเกสรตัวผู้ ซึ่งต้องการความเข้มข้นวิกฤตของธาตุโบรอนหรือแคลเซียม และเป็นไปได้ว่าเซลล์ไม่เพียงแต่จะดูด

รับธาตุอาหารจากอาหารเท่านั้น หากยังสามารถปลดปล่อยสารเมตาโบไลท์ต่างๆ สู่อาหาร และไปมีผลต่อเซลล์อื่นๆ ด้วยเช่นกัน

2.6.2 ส่วนประกอบและหน้าที่ของสารอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Media composition)

2.6.2.1 ธาตุอาหารพวกอนินทรีย์ (Inorganic compounds)

1. ธาตุอาหารที่พืชต้องการในปริมาณมาก (Macronutrients) ได้แก่ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โปตัสเซียม แคลเซียม แมกนีเซียม และซัลเฟอร์

2. ธาตุอาหารที่พืชต้องการในปริมาณที่น้อย (Micronutrients) ส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปของเกลือได้แก่ แมงกานีส ทองแดง โซเดียม เหล็ก โมลิบดีนัม คลอรีน ไอโอดีน โคบอลต์ อลูมิเนียม และนิกเกิล ธาตุอาหารมีความสำคัญในการเจริญเติบโตของเซลล์และเนื้อเยื่อ ซึ่งต้องปรับให้มีความเหมาะสมกับชนิดของพืช

2.6.2.2 ธาตุอาหารพวกอินทรีย์ (Organic compounds)

1. สารเร่งการเจริญเติบโต (Plant growth regulators) หรือฮอร์โมน (Hormones) ทำหน้าที่กระตุ้นและมีส่วนร่วมในกระบวนการต่างๆ ของการเจริญเติบโตของเซลล์ การพัฒนาของต้น ตลอดจนการเปลี่ยนแปลงของเซลล์และเนื้อเยื่อประกอบด้วย

1.1 สารในกลุ่มออกซิน (Auxin) เช่น

- Indole-3-acetic acid (IAA)
- Naphaleneacetic acid (NAA)
- Indolebutyric acid (IBA)
- 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)

1.2 สารในกลุ่มไซโตไคนิน (Cytokinin) เช่น

- N_6-Benzyladenine (BA)
- kinetin
- zeatin
- N6-isopentenyladenine (2iP)

1.3 สารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดอื่น เช่น

- Gibberellic acid (GA)
- paclobutrazol
- Abscisic acid
- picloram

2. วิตามิน (Vitamin) มีส่วนช่วยในการเจริญเติบโตหรือการเปลี่ยนแปลง

ทางสัณฐานวิทยา (morphogenesis) ที่นิยมได้แก่ thiamine, pyridoxine, inositol, biotin, panthothenic acid และ ascorbic acid เป็นต้น

3. กรดอะมิโน (Amino acid) มีหน้าที่ช่วยเสริมการเจริญเติบโต และทำให้เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงพร้อมที่จะเกิดเป็นต้นได้ เช่น glutamine, asparagine, glycine และ casein hydrolysate เป็นต้น

4. สารประกอบอินทรีย์อื่นๆ ส่วนใหญ่จะได้จากธรรมชาติ เช่น น้ำมะพร้าว น้ำต้มมันฝรั่ง น้ำคั้นมะเขือเทศ กล้วยบด หรือน้ำสกัดผัก เป็นต้น

5. วุ้น เป็นสารเพิ่มความแข็งในอาหารที่นิยมกันมากที่สุด เพราะราคาถูก ส่วนใหญ่เป็นสารพวก polysaccharide ที่ได้จากสาหร่าย ปริมาณวุ้นที่ใช้จะขึ้นอยู่กับความต้องการที่จะให้อาหารแข็งมากหรือน้อย ส่วนใหญ่จะใช้ประมาณ 0.3-1 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นอยู่กับคุณภาพของวุ้นและนอก จากนี้ยังมีวุ้นคุณภาพสูง ได้แก่ Gellan gum ซึ่งมีลักษณะใสมาก สามารถมองเห็นการปนเปื้อนของ จุลินทรีย์ได้ชัดเจน และ agarose เหมาะสำหรับเซลล์พืชโปรโตพลาสต์ หรือละอองเกสรตัวผู้

6. น้ำ เป็นองค์ประกอบหลักของอาหาร น้ำที่ใช้ควรเป็นน้ำกลั่น หรือน้ำที่ปราศจากอิออน (deionized water)

7. พีเอช มีผลต่อการดูดใช้ธาตุอาหารของเนื้อเยื่อหรือชิ้นส่วนของพืช ส่วนใหญ่นิยมใช้อยู่ในช่วง 5.0-6.0 กรณีถ้าใช้พีเอชต่ำกว่า 5.0 ซึ่งเป็นกรดอาจทำให้อาหารไม่แข็ง ทำให้ไม่เหมาะกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 พืชที่ใช้

3.1.1 หม่อน (*Morus rotanbiloba*)

3.2 สารเคมี

3.2.1 อาหารผงสำเร็จรูป Murashige and Skoog medium (MS) ของ Sigma

3.2.2 N_6-Benzyladenine (BA) ของ Sigma

3.2.3 α-Naphaleneacetic acid (NAA) ของ Sigma

3.2.4 Anthrone ของ Fluka

3.2.5 Folin-ciocalteu ของ Fluka

3.2.6 Sodium carbonate (Na_2CO_3) ของ Sigma

3.2.7 Gallic acid ของ Fluka

3.2.8 2,2-Diphenyl-l-picrylhydrazy (DPPH) ของ Wako

3.2.9 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (Trolox) ของ Cabbiochem

3.2.10 2,2-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) ของ Wako

3.2.11 Potassiumpersulfate ($K_2S_2O_8$) ของ Wako

3.2.12 Sulfuric acid (H_2SO_4) ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์

3.2.13 Potassium hydroxide (KOH) ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์

3.2.14 Methanol 95 %

3.3 วัตถุดิบและอุปกรณ์

3.3.1 ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

3.3.2 จานเพาะเลี้ยง

3.3.3 ขวดสีชา

3.3.4 มีดผ่าตัด

3.3.5 ปากคีบ

3.3.6 ออโตปีเปตต์

3.3.7 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

3.3.8 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Auticlave)

3.3.9 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow)

3.3.10 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)

3.3.11 สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer)

3.3.12 พีเอชมิเตอร์ (pH meter)

3.3.13 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การเพิ่มปริมาณต้นหม่อนโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสูตรอาหาร MS

3.4.1.1 การเตรียมอาหารแข็ง MS

นำอาหารผงสำเร็จรูป MS มาละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร แบ่งใส่ขวดสีชาขวดละ 100 มิลลิลิตร จำนวน 10 ขวด เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -4 องศาเซลเซียล โดยอาหารในขวดสีชา 1 ขวด เตรียมอาหาร MS ได้ 1 ลิตร

การเตรียมอาหารแข็ง MS 1 ลิตร นำบีกเกอร์ขนาด 1 ลิตร เติมน้ำกลั่นประมาณ 200 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายอาหาร MS จากขวดสีชาปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติมสารที่เป็นแหล่งคาร์บอน คือ น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ปรับปริมาตรสารละลายอาหาร MS ด้วยน้ำกลั่น ให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 0.1 นอร์มอล และโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล ให้ได้ค่าประมาณ 5.6-5.8 เติมวุ้นผง 8 กรัมต่อลิตรแล้วหลอมละลายวุ้นโดยใช้เตาไมโครเวฟ จนวุ้นละลายเป็นเนื้อเดียวกับสารละลายอาหาร MS เทอาหารลงขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขวดละประมาณ 12 มิลลิลิตร ปิดฝา นำอาหารที่บรรจุในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ โดยใช้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3.4.1.2 การเตรียมอาหารเหลว MS

ทำการเตรียมคล้ายข้อ 3.4.1.1 การเตรียมอาหารแข็ง MS แต่เมื่อปรับพีเอชแล้วไม่ต้องเติมวุ้นผง โดยทำการเตรียมอาหารสูตรละ 600 มิลลิลิตร เทอาหารลงขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาดใหญ่ ขวดละ 20 มิลลิลิตร จะได้อาหารสูตรละ 30 ขวด ปิดฝา นำอาหารที่บรรจุในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ โดยใช้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3.4.1.3 ขั้นตอนการเปลี่ยนอาหารใหม่

คัดเลือกต้นหม่อน (*Morus rotanbiloba*) จากห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีอายุครบ 30 วัน ซึ่งเหมาะสมต่อการเปลี่ยนอาหารใหม่ ฆ่าเชื้อภายนอกขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยการเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เปิดฝาขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อภายในตู้ปลอดเชื้อ ใช้ปากคีบนำต้นหม่อนที่ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน ออกมาวางในจานเพาะเลี้ยงที่อบนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ตัดชิ้นส่วนของต้นหม่อนโดยเลือกบริเวณตาข้างและส่วนของปลายยอดไว้ ตัดใบที่มีขนาดใหญ่ทิ้ง ใช้ปากคีบ เคลื่อนย้ายชิ้นส่วนที่คัดเลือกลงอาหารใหม่ที่เตรียมไว้ นำขวดเพาะเลี้ยงวางบนชั้นเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีความเข้มแสง 700 ลักซ์ โดยให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน

3.4.2 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงรากหม่อน

ในการเพาะเลี้ยงรากหม่อนมีสูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง 4 สูตร มีอาหารสูตร MS, อาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร, อาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วเพาะเลี้ยงใน 2 สภาวะ คือ การเพาะเลี้ยงในสภาวะให้แสงและไม่ให้แสง โดยวิธีการเตรียมทำคล้ายข้อ 3.4.1.2 แต่ต้องเติมสารควบคุมการเจริบเติบโตและเลี้ยงตามสภาวะที่กำหนด

วิธีการเพาะเลี้ยงรากหม่อน โดยนำต้นหม่อนที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS เป็นเวลาประมาณ 30 วัน เฉพาะส่วนรากล้างด้วยน้ำที่ฆ่าเชื้อแล้ว จนวุ้นที่ติดหลุดออกหมด แล้วทำการตัดรากหม่อนที่บริเวณปลายรากที่มีสีขาวให้มีความยาว 2 เซนติเมตร นำรากหม่อนที่ตัดแล้วใส่ขวดเพาะเลี้ยงที่มีอาหารเหลวขวดละ 10 ราก ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยต้องทำการวัดการเจริญทุกๆ 7 วันเป็นเวลา 35 วัน คือ 0, 7, 14, 21, 28 และ 35 วัน โดยทำการทดลองในอาหาร 4 สูตร และเพาะเลี้ยงใน 2 สภาวะ สูตรละ 15 ขวด (โดยไม่รวมวันที่ 0) แสดงว่าในการทดลองทั้งหมด 8 วิธี ใช้ 120 ขวดทดลอง แล้ววางบนเครื่องเขย่า สำหรับสูตรอาหารที่ให้แสง ให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน แล้วทำการวัดการเจริญทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 35 วัน

3.4.3 การวัดการเจริญเติบโตของรากหม่อนในสูตรอาหารต่างๆ

3.4.3.1 การวัดความยาวรากหม่อน

นำขวดเพาะเลี้ยงรากหม่อนที่ครบวันเก็บ คือ 0, 7, 14, 21, 28 และ 35 วัน โดยเก็บครั้งละ 3 ขวดเพาะเลี้ยง โดยนำรากหม่อนมาล้างน้ำ แล้วทำการวัดความยาวรากและเก็บผลการทดลองอยู่ในรูปดัชนีการเจริญของความยาวรากหม่อนจากสูตร

$$\text{ดัชนีการเจริญของความยาวราก} = \frac{(\text{ความยาวรากของวันต่างๆ} - \text{ความยาวรากเริ่มต้น})}{\text{ความยาวรากเริ่มต้น}}$$

3.4.3.2 การหาน้ำหนักรากแห้ง

นำรากหม่อนจากข้อ 3.4.3.1 ใส่ในจานเพาะเลี้ยงที่ทราบน้ำหนักแห้งแล้ว ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้ววางทิ้งไว้ในเดซิเคเตอร์เป็นเวลา 1 วัน หลังจากนั้นนำมาชั่งน้ำหนัก เพื่อหาน้ำหนักรากหม่อนแห้งและคำนวณในรูป ดัชนีการเจริญของน้ำหนักรากแห้งจากสูตร

$$\text{ดัชนีการเจริญของน้ำหนักรากแห้ง} = \frac{(\text{น้ำหนักรากแห้งของวันต่างๆ} - \text{น้ำหนักรากแห้งเริ่มต้น})}{\text{น้ำหนักรากแห้งเริ่มต้น}}$$

3.4.3.3 การหาปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (พนา ,2548)

การเตรียมแอนโทรน ชั่งแอนโทรน 150 มิลลิกรัม นำแอนโทรนละลายในสารละลายกรดซัลฟูริก 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร คนจนกระทั่ง แอนโทรนละลายหมด เก็บสารละลายแอนโทรนที่ 4 องศาเซลเซียส จนกระทั่งนำมาใช้และสารละลายแอนโทรนควรใช้ภายใน 2 สัปดาห์ หลังจากที่เตรียม

การทำกราฟมาตรฐานน้ำตาลซูโครส

ปิเปต 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครลิตร จากสารละลายน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 ไมโครลิตร ด้วยน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากันทำการทดลอง 3 ซ้ำ เติม 100 ไมโครลิตร ของสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ ลงในแต่ละหลอดผสมให้เข้ากัน ปิดฝาหลอดแล้วนำไปแช่ในน้ำเดือด 10 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เติมสารละลายแอนโทรน 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณน้ำตาลซูโครส (มิลลิกรัม) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร

การหาปริมาณน้ำตาลซูโครสในอาหารเหลวสูตรต่างๆ โดยทำการปิเปตต์อาหารที่ปั่นเหวี่ยงแล้ว 100 ไมโครลิตร (ถ้าค่าการดูดกลืนแสงสูง ทำการเจือจางด้วยเมทานอล) ทำการทดลองขวดละ 3 ซ้ำ โดยเก็บผลครั้งละ 3 ขวดเพาะเลี้ยง แล้วเติมสารละลายโพแทสเซียม

คลอไรด์ ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ 100 ไมโครลิตร นำไปให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วทิ้งไว้จนเย็น เติมสารละลายแอนโทรน 3 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร โดยแบลงค์ (blank) เป็นอาหารเพาะเลี้ยงของแต่ละสูตร แล้วนำค่าที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานน้ำตาลซูโครส ถ้ามีการเจือจางอาหารต้องคูณค่าความเจือจางกลับด้วยจึงจะได้ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ เป็นหน่วยมิลลิกรัม

3.4.4 การสกัดสารจากรากหม่อนด้วยเมทานอล

การสกัดสารด้วยเมทานอล เมื่อทำการทดลองเก็บรากหม่อนแห้งครบ 35 วันแต่ละสูตรอาหารทั้งหมด 4 สูตร ที่เลี้ยงใน 2 สภาวะ นำมาบดด้วยโกร่งให้เป็นผง (รูปที่ 3.1) และชั่งน้ำหนัก เติมเมทานอล ในอัตราส่วนรากหม่อน 1 กรัม ต่อเมทานอล 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าที่มืดเป็นเวลา 3 วัน นำสารสกัดรากหม่อนไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ทำการเก็บส่วนใส

รูปที่ 3.1 แสดงการบดรากหม่อนแห้งด้วยโกร่ง

การทำสารสกัดแห้ง ปิเปตต์สารสกัดที่ได้ 1 มิลลิลิตร ในหลอด eppendorf แล้ววางทิ้งไว้ให้แห้งเป็นเวลา 1 วัน บ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้ววางทิ้งไว้ในเดซิเคเตอร์ เป็นเวลา 1 วัน หลังจากนั้นนำมาชั่งน้ำหนัก เพื่อหาน้ำหนักสารสกัดแห้ง (รูปที่ 3.2) แล้วทำการเตรียมสารสกัดความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยละลายในเมทานอล เพื่อนำไปหาปริมาณฟีนอลิกและความสามารถต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ABTS ต่อไป

รูปที่ 3.2 แสดงสารสกัดของรากหม่อนแห้งที่ได้จากการสกัดเป็นเวลา 3 วัน

3.4.5 การทดสอบคุณสมบัติสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรากหม่อน

3.4.5.1 การหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (Kahkonen และคณะ,1999)

การหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu

การทำกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก โดยปิเปตต์กรดแกลลิก 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 และ 200 ไมโครลิตร ในหลอดทดลอง ทั้งหมด 10 ความเข้มข้น ทำ 3 ซ้ำ จากกรดแกลลิกความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วเติมเมทานอลจนเป็น 200 ไมโครลิตร ทุกหลอดทดลอง (จะได้กรดแกลลิกปริมาณ 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8 และ 2.0 ไมโครกรัม ตามลำดับ) ทำการเติมสาร Folin-Ciocalteu reagent 1,000 ไมโครลิตร เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 7.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 800 ไมโครลิตร เขย่าและวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ในที่มืด หลังจากนั้นทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร แล้วทำกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก ระหว่างปริมาณกรดแกลลิกหน่วยไมโครกรัม ต่อค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร

การหาฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดโดย ปิเปตต์สารสกัดรากหม่อน 80 ไมโครลิตร ทำ 3 ซ้ำ จากสารสกัดความเข้มข้นเริ่มต้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เติมเมทานอล 120 ไมโครลิตร (จะได้สารสกัดปริมาณ 0.8 มิลลิกรัม) ทำการเติมสาร Folin-Ciocalteu reagent 1,000 ไมโครลิตร เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 7.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 800 ไมโครลิตร เขย่าและวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ในที่มืด หลังจากนั้นทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร แล้วทำการเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก จะได้ค่าฟีนอลิกทั้งหมดอยู่ในหน่วย ไมโครกรัมของกรดแกลลิกต่อสารสกัด 0.8 มิลลิกรัม ทำเป็นหน่วยไมโครกรัมของกรดแกลลิกต่อสารสกัด 1 มิลลิกรัม

3.4.5.2 การศึกษาคุณสมบัติของสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (Brand-Williams และคณะ,1995)

การศึกษาคุณสมบัติของสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

การเตรียมสารละลาย DPPH ทำการชั่ง DPPH 24 มิลลิกรัม แล้วเติมเมทานอล 100 มิลลิลิตร (เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส) นำสาร DPPH ที่ละลายเมทานอลแล้ว 10 มิลลิลิตร เติมเมทานอล 45 มิลลิลิตร แล้วทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 515 นาโนเมตร โดยค่าที่ได้อยู่ในช่วง 1.1±0.2 ถ้าค่าไม่ได้ทำการเจือจางด้วยเมทานอล (ค่าที่ได้เป็น A_0 ในสมการ % DPPH reduction)

ปิเปตต์สารสกัดรากหม่อน 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 135 และ 150 ไมโครลิตร ทั้งหมด 10 ความเข้มข้น ทำ 3 ซ้ำ จากสารสกัดความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วเติมเมทานอลจนเป็น 150 ไมโครลิตร ทุกหลอดทดลอง (จะได้สารสกัดปริมาณ 0.15, 0.30, 0.45, 0.60, 0.75, 0.90, 1.05, 1.20, 1.35 และ 1.50 มิลลิกรัม ตามลำดับ) ทำการเติมสารละลาย DPPH ปริมาตร 2,850 ไมโครลิตร แล้วทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที แล้วทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 515 นาโนเมตร โดยแบลงค์เป็นเมทานอล นำค่าที่ได้คำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ DPPH ที่ลดลง (% DPPH reduction) ตามสูตรและนำค่าที่ได้เขียนกราฟระหว่างปริมาณของสารสกัดหน่วยมิลลิกรัมต่อค่าเปอร์เซ็นต์ DPPH ที่เหลืออยู่ เพื่อหาค่า IC_{50} ของสารสกัดเพื่อนำไปเปรียบเทียบกับค่า IC_{50} ของสาร Trolox

$$\% \text{ DPPH reduction} = [(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$$

เมื่อให้ A_0 = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH

A_1 = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่มีสารสกัด

การศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระของสารละลาย Trolox ด้วยวิธี DPPH

เตรียมสารละลาย Trolox ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ โดยการชั่งสาร Trolox 25.03 มิลลิกรัม ปรับปริมาตรด้วยเมทานอลเป็น 100 มิลลิลิตร (โดยสาร Trolox มีมวลโมเลกุล 250.29) การทดสอบโดยปิเปตต์สารละลาย Trolox 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 135 และ 150 ไมโครลิตร ทั้งหมด 10 ความเข้มข้น ทำ 3 ซ้ำ จากสารละลาย Trolox ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ แล้วเติมเมทานอลจนเป็น 150 ไมโครลิตร ทุกหลอดทดลอง (จะได้สาร Trolox ปริมาณ 3.7545, 7.5090, 11.2635, 15.0180, 18.7725, 22.5270, 26.2815, 30.0360, 33.7905 และ 37.5450 ไมโครกรัม ตามลำดับ) ทำการเติมสารละลาย DPPH ปริมาตร 2,850 ไมโครลิตร แล้วทิ้งไว้ในที่มืด

เป็นเวลา 30 นาที แล้วทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 515 นาโนเมตร โดยแบลงค์เป็นเมทานอล นำค่าที่ได้คำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ DPPH ที่เหลืออยู่ ตามสูตรและนำค่าที่ได้เขียนกราฟระหว่างปริมาณของสารละลาย Trolox หน่วยไมโครกรัม ต่อค่าเปอร์เซ็นต์ DPPH ที่เหลืออยู่ เพื่อหาค่า IC_{50} ของสารละลาย Trolox

3.4.5.3 การศึกษาคุณสมบัติของสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS (Arnao และคณะ, 2001)

การศึกษาคุณสมบัติของสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS

การเตรียมสารละลาย ABTS

เตรียมสาร ABTS ความเข้มข้น 7.5 มิลลิโมลาร์ โดยทำการชั่ง ABTS 0.0381 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำจนเป็น 10 มิลลิลิตร (เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียล) แล้วทำการเตรียมสาร $K_2S_2O_8$ ความเข้มข้น 2.6 มิลลิโมลาร์ โดยทำการชั่งสาร $K_2S_2O_8$ 0.0070 g ปรับปริมาตรด้วยน้ำจนเป็น 10 มิลลิลิตร (เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียล) แล้วนำสารทั้ง 2 ตัว มาผสมกันในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 ทิ้งไว้ในมืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำสาร 1 มิลลิลิตร เติมเมทานอล 60 มิลลิลิตร แล้วทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร โดยค่าที่ได้อยู่ในช่วง 1.1±0.2 ถ้าค่าไม่ได้ทำการเจือจางด้วยเมทานอล (ค่าที่ได้เป็น A_0 ในสมการ % ABTS reduction)

ปิเปตต์สารสกัดรากหม่อน 7.5, 15.0, 22.5, 30.0, 37.5, 45.0, 52.5, 60, 67.5 และ 75 ไมโครลิตร ทั้งหมด 10 ความเข้มข้น ทำ 3 ซ้ำ จากสารสกัดความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วเติมเมทานอลจนเป็น 150 ไมโครลิตร ทุกหลอดทดลอง (จะได้สารสกัดปริมาณ 0.075, 0.150, 0.225, 0.300, 0.375, 0.450, 0.525, 0.600, 0.675 และ 0.750 มิลลิกรัม ตามลำดับ) ทำการเติมสารละลาย ABTS ปริมาตร 2,850 ไมโครลิตร แล้วทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที แล้วทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร โดยแบลงค์เป็นเมทานอล นำค่าที่ได้คำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ ABTS ที่ลดลง (% ABTS reduction) ตามสูตรและนำค่าที่ได้เขียนกราฟระหว่างปริมาณของสารสกัดหน่วยมิลลิกรัมต่อค่าเปอร์เซ็นต์ ABTS ที่เหลืออยู่ เพื่อหาค่า IC_{50} ของสารสกัดเพื่อนำไปเปรียบเทียบกับค่า IC_{50} ของสาร Trolox

$$\% \text{ ABTS reduction} = [(A_0-A_1)/A_0] \times 100$$

เมื่อให้ A_0 = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย ABTS

A_1 = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย ABTS ที่มีสารสกัด

การศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระของสารละลาย Trolox โดยวิธี ABTS

เตรียมสารละลาย Trolox ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ โดยการชั่งสาร

Trolox 25.03 มิลลิกรัม ปรับปริมาตรด้วเมทานอลเป็น 100 มิลลิลิตร (โดยสาร Trolox มีมวลโมเลกุล 250.29) การทดสอบโดยปิเปตต์สารละลาย Trolox 7.5, 15.0, 22.5, 30.0, 37.5, 45.0, 52.5, 60, 67.5 และ 75 ไมโครลิตร ทั้งหมด 10 ความเข้มข้น ทำ 3 ซ้ำ จากสารละลาย Trolox ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ แล้วเติมเมทานอลจนเป็น 150 ไมโครลิตร ทุกหลอดทดลอง (จะได้สาร Trolox ปริมาณ 1.883, 3.7545, 5.6318, 7.5090, 9.3863, 11.2635, 13.1408, 15.0180, 16.8953 และ 18.7725 ไมโครกรัม ตามลำดับ) ทำการเติมสารละลาย ABTS ปริมาตร 2,850 ไมโครลิตร แล้วทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที แล้วทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร โดยแบลงค์เป็นเมทานอล นำค่าที่ได้คำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ ABTS ที่เหลืออยู่ ตามสูตรและนำค่าที่ได้เขียนกราฟระหว่างปริมาณของสารละลาย Trolox หน่วยไมโครกรัม ต่อค่าเปอร์เซ็นต์ ABTS ที่เหลืออยู่ เพื่อหาค่า IC_{50} ของสารละลาย Trolox

3.4.6. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ในการทดลองทำการเก็บผลในรูปค่าเฉลี่ย ซึ่งทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยการวิเคราะห์ทางสถิติใช้โปรแกรม SPSS เวอร์ชั่น 16 โดยใช้การทดลองแบบแฟคทอเรียล ที่มีปัจจัยการทดลอง 2 ปัจจัย แผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ (Randomize Complete Block Design, RCBD) ในทุกการทดลองยกเว้นการหาฟีนอลิกทั้งหมดที่ใช้การทดลองแบบแฟคทอเรียล ที่มีปัจจัยการทดลอง 2 ปัจจัย แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD)

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การเจริญเติบโตของรากหม่อนในอาหารสูตรต่างๆ

4.1.1 ความยาวของรากหม่อน

จากการทดลองเพาะเลี้ยงรากหม่อนในอาหาร 4 สูตร คือ อาหารสูตร MS, อาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร, อาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเพาะเลี้ยงใน 2 สภาวะ คือ การเพาะเลี้ยงในสภาวะให้แสงและไม่ให้แสง โดยทำการวัดการเจริญจากความยาวรากทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 35 วัน แสดงในตารางที่ 4.1-4.8 ส่วนตารางที่ 4.9 แสดงความยาวรากของทุกสูตรอาหารและสภาวะ ของวันที่ 35 และรูปที่ 4.1 และ 4.2 แสดงกราฟการเจริญเติบโตของรากโดยดูจากความยาวรากที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารต่างๆในสภาวะให้แสงและไม่ให้แสงตามลำดับ

จากการทดลอง พบว่ารากหม่อนมีการเจริญสูดสุดหรือความยาวรากสูงสุดในวันที่ 35 ของการทดลอง โดยในสูตรอาหาร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงรากหม่อนในสภาวะให้แสงพบว่ามีดัชนีความยาวรากมากที่สุดเท่ากับ 15.67±1.644 ($p \leq 0.05$) แต่ในอาหารที่มีการเติม NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร กลับทำให้มีค่าดัชนีความยาวรากลดลงและในอาหารที่เติม NAA ทุกความเข้มข้นพบว่าแสงไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตโดยพบว่ารากที่เพาะเลี้ยงในที่มีแสงและไม่มีแสงมีความยาวรากใกล้เคียงกันที่ NAA ความเข้มข้นเดียวกัน แต่แสงมีอิทธิพลต่อการเจริญของรากในกรณีที่ในอาหารไม่มี NAA โดยพบว่ารากที่เจริญในที่ไม่มีแสงมีความยาวรากมากว่าในที่มีแสงอย่างชัดเจน

ตารางที่ 4.1 แสดงความยาวของรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรMS สภาวะที่ให้แสง ที่เก็บทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 35 วัน

สภาวะ	สูตรอาหาร	วันที่	ซ้ำที่	ความยาวราก [a](ซม.)	ดัชนีความยาวราก	ดัชนีความยาวรากเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน
แสง	MS	0	1	2.00	0.00	0.00	0.000
			2	2.00	0.00		
			3	2.00	0.00		
		7	1	2.48	0.24	0.21	0.033
			2	2.35	0.18		
			3	2.40	0.20		
		14	1	2.72	0.36	0.40	0.051
			2	2.78	0.39		
			3	2.92	0.46		
		21	1	3.02	0.51	0.68	0.151
			2	3.45	0.73		
			3	3.60	0.80		
		28	1	5.38	1.69	1.53	0.160
			2	4.74	1.37		
			3	5.04	1.52		
		35	1	11.55	4.78	3.93	0.838
			2	8.20	3.10		
			3	9.82	3.91		

a แสดงค่าความยาวรากหม่อนที่เฉลี่ยมาจากทั้งหมด 10 เส้นของแต่ละขวด โดยข้อมูลอยู่ในส่วนของภาคผนวก

ตารางที่ 4.2 แสดงความยาวของรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรMS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สภาวะที่ให้แสง ที่เก็บทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 35 วัน

สภาวะ	สูตรอาหาร	วันที่	ซ้ำที่	ความยาวราก [a] (ซม.)	ดัชนีความยาวราก	ดัชนีความยาวรากเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน
แสง	MS + NAA 0.1 มก/ล	0	1	2.00	0.00	0.00	0.000
			2	2.00	0.00		
			3	2.00	0.00		
		7	1	2.55	0.28	0.41	0.115
			2	2.91	0.46		
			3	2.98	0.49		
		14	1	6.62	2.31	2.31	0.988
			2	4.64	1.32		
			3	8.59	3.30		
		21	1	11.69	4.85	5.60	0.699
			2	14.45	6.23		
			3	13.46	5.73		
		28	1	17.78	7.89	7.56	0.388
			2	17.33	7.67		
			3	16.27	7.14		
		35	1	25.55	11.78	13.22	1.639
			2	27.75	12.88		
			3	32.00	15.00		

a แสดงค่าความยาวรากหม่อนที่เฉลี่ยมาจากทั้งหมด 10 เส้นของแต่ละขวด โดยข้อมูลอยู่ในส่วนของภาคผนวก

ตารางที่ 4.3 แสดงความยาวของรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรMS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สภาวะที่ให้แสง ที่เก็บทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 35 วัน

สภาวะ	สูตรอาหาร	วันที่	ซ้ำที่	ความยาวราก[a] (ซม.)	ดัชนีความยาวราก	ดัชนีความยาวรากเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน
แสง	MS + NAA 0.5 มก/ล	0	1	2.00	0.00	0.00	0.000
			2	2.00	0.00		
			3	2.00	0.00		
		7	1	3.12	0.56	0.50	0.080
			2	2.81	0.41		
			3	3.04	0.52		
		14	1	7.53	2.77	2.50	0.235
			2	6.63	2.32		
			3	6.85	2.43		
		21	1	16.22	7.11	6.22	0.769
			2	13.64	5.82		
			3	13.48	5.74		
		28	1	22.10	10.05	10.72	0.675
			2	24.80	11.40		
			3	23.40	10.70		
		35	1	35.80	16.90	15.67	1.644
			2	34.60	16.30		
			3	29.60	13.80		

a แสดงค่าความยาวรากหม่อนที่เฉลี่ยมาจากทั้งหมด 10 เส้นของแต่ละขวด โดยข้อมูลอยู่ในส่วนของภาคผนวก

ตารางที่ 4.4 แสดงความยาวของรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรMS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สภาวะที่ให้แสง ที่เก็บทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 35 วัน

สภาวะ	สูตรอาหาร	วันที่	ซ้ำที่	ความยาวราก [a] (ซม.)	ดัชนีความยาวราก	ดัชนีความยาวรากเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน
แสง	MS + NAA 1.0 มก/ล	0	1	2.00	0.00	0.00	0.000
			2	2.00	0.00		
			3	2.00	0.00		
		7	1	2.29	0.15	0.07	0.073
			2	2.00	0.00		
			3	2.15	0.08		
		14	1	7.50	2.75	1.99	0.671
			2	4.95	1.48		
			3	5.50	1.75		
		21	1	11.50	4.75	4.73	0.625
			2	10.20	4.10		
			3	12.70	5.35		
		28	1	17.20	7.60	7.75	0.934
			2	19.50	8.75		
			3	15.80	6.90		
		35	1	24.20	11.10	10.32	0.732
			2	22.40	10.20		
			3	21.30	9.65		

a แสดงค่าความยาวรากหม่อนที่เฉลี่ยมาจากทั้งหมด 10 เส้นของแต่ละขวด โดยข้อมูลอยู่ในส่วนของภาคผนวก

ตารางที่ 4.5 แสดงความยาวของรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรMS สภาวะที่ไม่ให้แสง ที่เก็บทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 35 วัน

สภาวะ	สูตรอาหาร	วันที่	ซ้ำที่	ความยาวราก ^{a} (ซม.)	ดัชนีความยาวราก	ดัชนีความยาวรากเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน
ไม่ให้แสง	MS	0	1	2.00	0.00	0.00	0.000
			2	2.00	0.00		
			3	2.00	0.00		
		7	1	2.33	0.17	0.31	0.237
			2	3.16	0.58		
			3	2.35	0.18		
		14	1	5.11	1.56	1.21	0.299
			2	4.09	1.05		
			3	4.06	1.03		
		21	1	9.40	3.70	2.94	0.730
			2	6.49	2.25		
			3	7.73	2.87		
		28	1	11.80	4.90	3.93	0.850
			2	9.07	3.54		
			3	8.68	3.34		
		35	1	16.00	7.00	6.02	0.892
			2	12.51	5.26		
			3	13.61	5.81		

a แสดงค่าความยาวรากหม่อนที่เฉลี่ยมาจากทั้งหมด 10 เส้นของแต่ละขวด โดยข้อมูลอยู่ในส่วนของภาคผนวก

ตารางที่ 4.6 แสดงความยาวของรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรMS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สภาวะที่ไม่ให้แสง ที่เก็บทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 35 วัน

สภาวะ	สูตรอาหาร	วันที่	ซ้ำที่	ความยาวราก[a] (ซม.)	ดัชนีความยาวราก	ดัชนีความยาวรากเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน
ไม่ให้แสง	MS + NAA0.1 มก/ล	0	1	2.00	0.00	0.00	0.000
			2	2.00	0.00		
			3	2.00	0.00		
		7	1	4.35	1.18	1.31	0.278
			2	5.26	1.63		
			3	4.25	1.13		
		14	1	13.19	5.60	4.54	1.239
			2	11.70	4.85		
			3	8.35	3.18		
		21	1	14.30	6.15	9.18	2.743
			2	21.75	9.88		
			3	25.00	11.50		
		28	1	23.79	10.90	11.06	1.221
			2	21.85	9.93		
			3	26.70	12.35		
		35	1	28.10	13.05	13.08	1.000
			2	26.20	12.10		
			3	30.20	14.10		

a แสดงค่าความยาวรากหม่อนที่เฉลี่ยมาจากทั้งหมด 10 เส้นของแต่ละขวด โดยข้อมูลอยู่ในส่วนของภาคผนวก

ตารางที่ 4.7 แสดงความยาวของรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรMS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สภาวะที่ไม่ให้แสง ที่เก็บทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 35 วัน

สภาวะ	สูตรอาหาร	วันที่	ซ้ำที่	ความยาวราก [a] (ซม.)	ดัชนีความยาวราก	ดัชนีความยาวรากเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน
ไม่ให้แสง	MS + NAA0.5 มก/ล	0	1	2.00	0.00	0.00	0.000
			2	2.00	0.00		
			3	2.00	0.00		
		7	1	2.64	0.32	0.19	0.135
			2	2.10	0.05		
			3	2.37	0.19		
		14	1	9.20	3.60	4.18	0.680
			2	10.00	4.00		
			3	11.85	4.93		
		21	1	22.40	10.20	9.73	0.416
			2	20.80	9.40		
			3	21.20	9.60		
		28	1	26.40	12.20	11.57	0.709
			2	25.40	11.70		
			3	23.60	10.80		
		35	1	29.10	13.55	14.22	0.797
			2	32.20	15.10		
			3	30.00	14.00		

a แสดงค่าความยาวรากหม่อนที่เฉลี่ยมาจากทั้งหมด 10 เส้นของแต่ละขวด โดยข้อมูลอยู่ในส่วนของภาคผนวก

ตารางที่ 4.8 แสดงความยาวของรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรMS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สภาวะที่ไม่ให้แสง ที่เก็บทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 35 วัน

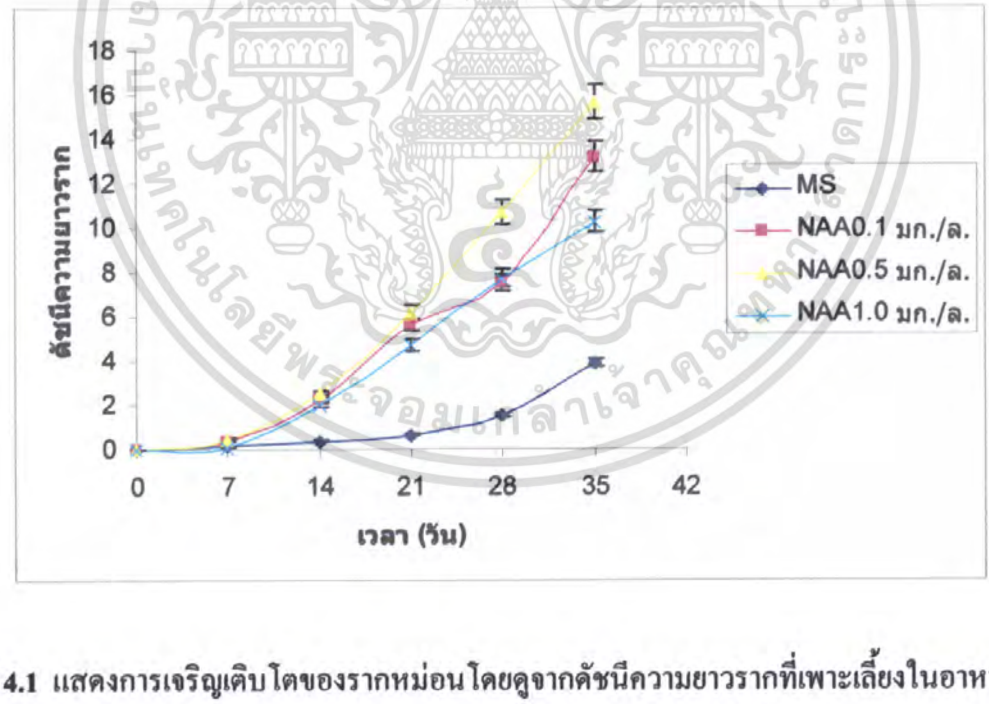
สภาวะ	สูตรอาหาร	วันที่	ซ้ำที่	ความยาวราก[a] (ซม.)	ดัชนีความยาวราก	ดัชนีความยาวรากเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน
ไม่ให้แสง	MS + NAA1.0 มก/ล	0	1	2.00	0.00	0.00	0.000
			2	2.00	0.00		
			3	2.00	0.00		
		7	1	2.88	0.44	0.25	0.175
			2	2.20	0.10		
			3	2.40	0.20		
		14	1	4.65	1.33	2.46	1.034
			2	7.40	2.70		
			3	8.70	3.35		
		21	1	11.50	4.75	5.10	1.069
			2	10.50	4.25		
			3	14.60	6.30		
		28	1	17.60	7.80	7.62	0.202
			2	17.30	7.65		
			3	16.80	7.40		
		35	1	20.00	9.00	9.68	0.825
			2	23.20	10.60		
			3	20.90	9.45		

a แสดงค่าความยาวรากหม่อนที่เฉลี่ยมาจากทั้งหมด 10 เส้นของแต่ละขวด โดยข้อมูลอยู่ในส่วนของภาคผนวก

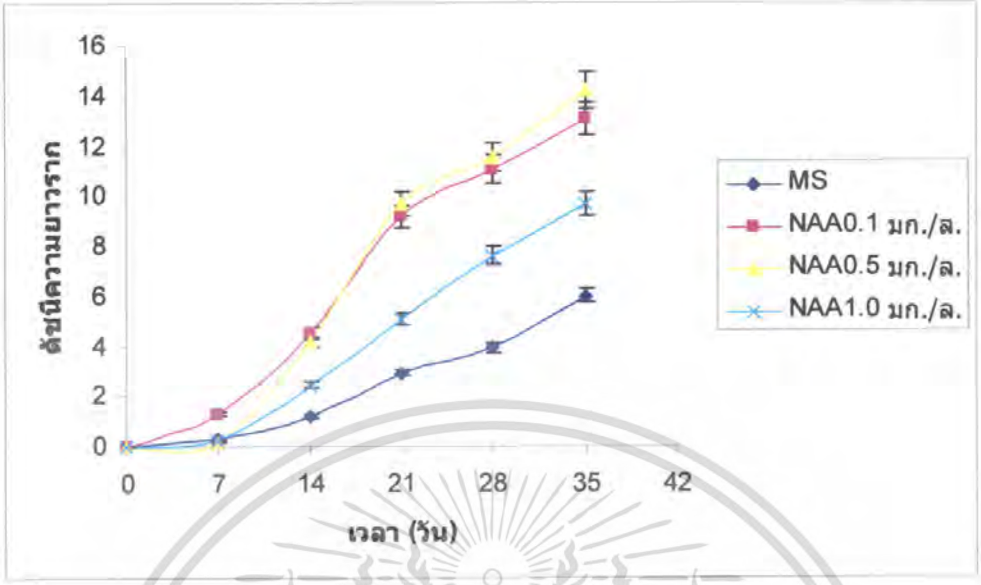
ตารางที่ 4.9 แสดงดัชนีความยาวรากหม่อนเฉลี่ยที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรและสภาวะต่างๆ ในวันที่ 35 ของการทดลอง

สูตรอาหาร	ดัชนีความยาวรากเฉลี่ย ในวันที่ 35 ของการทดลอง	
	แสง	ไม่ให้แสง
MS	3.93±0.838^{d}	6.02±0.892^{c}
MS + NAA 0.1 มก/ล	13.22±1.639^{b}	13.08±1.000^{a}
MS + NAA 0.5 มก/ล	15.67±1.644^{a}	14.22±0.797^{a}
MS + NAA 1.0 มก/ล	10.32±0.732^{b}	9.68±0.825^{b}

$^{a, b, c...}$ ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างของความยาวของรากหม่อนในแต่ละสูตรอาหารอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p \leq 0.05$)



รูปที่ 4.1 แสดงการเจริญเติบโตของรากหม่อนโดยดูจากดัชนีความยาวรากที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรต่างๆในสภาวะที่ให้แสง



รูปที่ 4.2 แสดงการเจริญเติบโตของรากหม่อนโดยดูจากดัชนีความยาวรากที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรต่างๆในสภาวะที่ไม่ให้แสง

4.1.2 น้ำหนักรากหม่อนแห้ง

จากการทดลองเพาะเลี้ยงรากหม่อนในอาหาร 4 สูตร คือ อาหารสูตร MS, อาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร, อาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเพาะเลี้ยงใน 2 สภาวะ คือ การเพาะเลี้ยงในสภาวะให้แสงและไม่ให้แสง โดยทำการวัดการเจริญจากการชั่งน้ำหนักรากแห้งทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 35 วัน แสดงในตารางที่ 4.10-4.17 ส่วนตารางที่ 4.18 แสดงน้ำหนักรากแห้งของทุกสูตรอาหารและสภาวะ ของวันที่ 35 และรูปที่ 4.3 และ 4.4 แสดงกราฟการเจริญเติบโตของราก โดยดูจากน้ำหนักรากแห้งที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารต่างๆในสภาวะให้แสงและไม่ให้แสงตามลำดับ ส่วนรูปที่ 4.5 แสดงลักษณะรากหม่อนแห้งที่ได้ในสภาวะที่ให้แสงและไม่ให้แสง

จากการทดลองพบว่ารากหม่อน มีการเจริญสูดสุดหรือน้ำหนักรากแห้งสูงสุดในวันที่ 35 ของการทดลองโดย ในสูตรอาหาร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงรากหม่อนในสภาวะให้แสงพบว่ามีดัชนีน้ำหนักรากแห้งมากที่สุดเท่ากับ 39.31±3.489 ($p \leq 0.05$) แต่ในอาหารที่มีการเติม NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร กลับทำให้มีค่าดัชนีน้ำหนักรากแห้งลดลงและในอาหารที่เติม NAA ทุกความเข้มข้นพบว่าแสงไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตโดยพบว่ารากที่เพาะเลี้ยงในที่มีแสงและไม่มีแสงมีน้ำหนักแห้งใกล้เคียงกันที่ NAA ความเข้มข้นเดียวกัน แต่แสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ลงในเวลาสำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีอิทธิพลต่อการเจริญของรากในกรณีที่ในอาหารไม่มี NAA โดยพบว่ารากที่เจริญในที่ไม่มีแสงมีน้ำหนักแห้งมากกว่าในที่มีแสงอย่างชัดเจน

ตารางที่ 4.10 แสดงน้ำหนักรากหม่อนแห้งที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรMS สภาวะที่ให้แสง เก็บทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 35 วัน

สภาวะ	สูตรอาหาร	วันที่	ซ้ำที่	น้ำหนักรากแห้ง (มก.)	ดัชนีน้ำหนักรากแห้ง	ดัชนีน้ำหนักรากแห้งเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน
แสง	MS	0	1	7.9	0.00	0.00	0.000
			2	5.9	0.00		
			3	6.3	0.00		
		7	1	11.2	0.76	0.58	0.218
			2	8.5	0.33		
			3	10.4	0.63		
		14	1	12.4	0.95	1.23	0.308
			2	14.0	1.20		
			3	16.3	1.56		
		21	1	18.1	1.84	2.51	0.615
			2	23.2	2.64		
			3	25.8	3.05		
		28	1	34.5	4.42	4.03	0.385
			2	29.6	3.65		
			3	32.1	4.04		
		35	1	57.0	7.95	6.77	1.062
			2	43.9	5.89		
			3	47.5	6.46		

ตารางที่ 4.11 แสดงน้ำหนักรากหม่อนแห้งที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรMS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สภาวะที่ให้แสง ที่เก็บทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 35 วัน

สภาวะ	สูตรอาหาร	วันที่	ซ้ำที่	น้ำหนักรากแห้ง (มก.)	ดัชนีน้ำหนักรากแห้ง	ดัชนีน้ำหนักรากแห้งเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน
แสง	MS + NAA0.1 มก/ล	0	1	7.9	0.00	0.00	0.000
			2	5.9	0.00		
			3	6.3	0.00		
		7	1	12.4	0.95	1.70	0.671
			2	18.6	1.92		
			3	20.6	2.23		
		14	1	26.6	3.18	3.22	0.457
			2	24.1	2.78		
			3	29.9	3.69		
		21	1	44.1	5.92	7.91	1.948
			2	68.9	9.82		
			3	57.2	7.98		
		28	1	103.3	15.22	13.38	1.993
			2	93.4	13.66		
			3	78.1	11.26		
		35	1	174.6	26.41	31.78	6.024
			2	201.5	30.63		
			3	250.3	38.29		

ตารางที่ 4.12 แสดงน้ำหนักรากหม่อนแห้งที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรMS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สภาวะที่ให้แสง ที่เก็บทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 35 วัน

สภาวะ	สูตรอาหาร	วันที่	ซ้ำที่	น้ำหนักรากแห้ง (มก.)	ดัชนีน้ำหนักรากแห้ง	ดัชนีน้ำหนักรากแห้งเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน
แสง	MS + NAA0.5 มก/ล	0	1	7.9	0.00	0.00	0.000
			2	5.9	0.00		
			3	6.3	0.00		
		7	1	21.6	2.39	2.14	0.288
			2	18.0	1.83		
			3	20.4	2.20		
		14	1	33.6	4.27	3.81	0.423
			2	28.3	3.44		
			3	30.1	3.73		
		21	1	62.9	8.87	8.47	0.359
			2	59.4	8.32		
			3	58.6	8.20		
		28	1	109.8	16.24	16.88	0.918
			2	120.6	17.93		
			3	111.3	16.47		
		35	1	273.6	41.95	39.31	3.489
			2	265.2	40.63		
			3	231.6	35.36		

ตารางที่ 4.13 แสดงน้ำหนักรากหม่อนแห้งที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรMS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สภาวะที่ให้แสง ที่เก็บทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 35 วัน

สภาวะ	สูตรอาหาร	วันที่	ซ้ำที่	น้ำหนักรากแห้ง (มก.)	ดัชนีน้ำหนักรากแห้ง	ดัชนีน้ำหนักรากแห้งเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน
แสง	MS + NAA1.0 มก/ล	0	1	7.9	0.00	0.00	0.000
			2	5.9	0.00		
			3	6.3	0.00		
		7	1	12.5	0.96	0.62	0.338
			2	8.2	0.29		
			3	10.3	0.62		
		14	1	27.5	3.32	2.79	0.486
			2	21.4	2.36		
			3	23.5	2.69		
		21	1	38.7	5.08	5.36	0.283
			2	40.5	5.36		
			3	42.3	5.64		
		28	1	79.2	11.43	11.72	1.372
			2	90.5	13.21		
			3	73.3	10.51		
		35	1	125.7	18.73	16.43	2.029
			2	105.9	15.62		
			3	101.4	14.92		

ตารางที่ 4.14 แสดงน้ำหนักรากหม่อนแห้งที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรMS สภาวะที่ไม่ให้แสง ที่เก็บทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 35 วัน

สภาวะ	สูตรอาหาร	วันที่	ซ้ำที่	น้ำหนักรากแห้ง (มก.)	ดัชนีน้ำหนักรากแห้ง	ดัชนีน้ำหนักรากแห้งเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน
ไม่ให้แสง	MS	0	1	7.9	0.00	0.00	0.000
			2	5.9	0.00		
			3	6.3	0.00		
		7	1	8.2	0.29	0.88	0.927
			2	18.8	1.95		
			3	9.0	0.41		
		14	1	30.0	3.71	2.43	1.122
			2	18.8	1.95		
			3	16.7	1.62		
		21	1	56.2	7.82	6.01	1.690
			2	34.9	4.48		
			3	42.8	5.72		
		28	1	60.7	8.53	7.33	1.242
			2	53.6	7.41		
			3	44.9	6.05		
		35	1	70.4	10.05	9.42	0.636
			2	62.3	8.78		
			3	66.5	9.44		

ตารางที่ 4.15 แสดงน้ำหนักรากหม่อนแห้งที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรMS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สภาวะที่ไม่ให้แสง ที่เก็บทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 35 วัน

สภาวะ	สูตรอาหาร	วันที่	ซ้ำที่	น้ำหนักรากแห้ง (มก.)	ดัชนีน้ำหนักรากแห้ง	ดัชนีน้ำหนักรากแห้งเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน
ไม่ให้แสง	MS + NAA0.1 มก/ล	0	1	7.9	0.00	0.00	0.000
			2	5.9	0.00		
			3	6.3	0.00		
		7	1	18.4	1.89	1.93	0.511
			2	22.0	2.45		
			3	15.5	1.43		
		14	1	40.5	5.36	4.13	1.291
			2	33.4	4.24		
			3	24.1	2.78		
		21	1	82.8	12.00	15.81	5.115
			2	94.3	13.80		
			3	144.1	21.62		
		28	1	146.7	22.03	21.58	4.428
			2	114.3	16.94		
			3	170.5	25.77		
		35	1	179.1	27.12	30.19	2.683
			2	206.5	31.42		
			3	210.5	32.05		

ตารางที่ 4.16 แสดงน้ำหนักรากหม่อนแห้งที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรMS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สภาวะที่ไม่ให้แสง ที่เก็บทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 35 วัน

สภาวะ	สูตรอาหาร	วันที่	ซ้ำที่	น้ำหนักรากแห้ง (มก.)	ดัชนีน้ำหนักรากแห้ง	ดัชนีน้ำหนักรากแห้งเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน
ไม่ให้แสง	MS + NAA0.5 มก/ล	0	1	7.9	0.00	0.00	0.000
			2	5.9	0.00		
			3	6.3	0.00		
		7	1	12.4	0.95	0.60	0.309
			2	8.6	0.35		
			3	9.6	0.51		
		14	1	26.7	3.19	4.10	1.536
			2	27.0	3.24		
			3	43.8	5.88		
		21	1	130.6	19.50	17.84	2.384
			2	102.6	15.11		
			3	126.8	18.91		
		28	1	170.5	25.77	22.85	3.381
			2	156.9	23.63		
			3	128.3	19.14		
		35	1	200.5	30.48	33.59	3.101
			2	240.0	36.68		
			3	220.6	33.63		

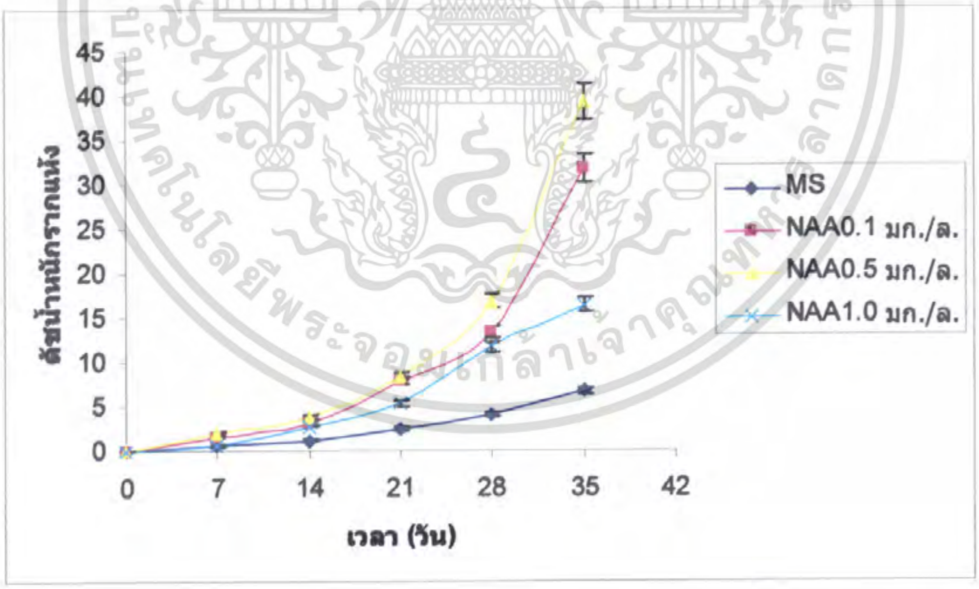
ตารางที่ 4.17 แสดงน้ำหนักรากหม่อนแห้งที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรMS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สภาวะที่ไม่ให้แสง ที่เก็บทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 35 วัน

สภาวะ	สูตรอาหาร	วันที่	ซ้ำที่	น้ำหนักรากแห้ง (มก.)	ดัชนีน้ำหนักรากแห้ง	ดัชนีน้ำหนักรากแห้งเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน
ไม่ให้แสง	MS + NAA1.0 มก/ล	0	1	7.9	0.00	0.00	0.000
			2	5.9	0.00		
			3	6.3	0.00		
		7	1	17.9	1.81	1.44	0.348
			2	13.5	1.12		
			3	15.2	1.39		
		14	1	19.7	2.09	2.91	0.824
			2	24.8	2.89		
			3	30.2	3.74		
		21	1	37.5	4.89	5.70	0.956
			2	41.2	5.47		
			3	49.4	6.76		
		28	1	83.4	12.09	11.79	0.366
			2	82.2	11.90		
			3	78.9	11.39		
		35	1	95.2	13.95	15.51	1.811
			2	117.8	17.49		
			3	102.5	15.09		

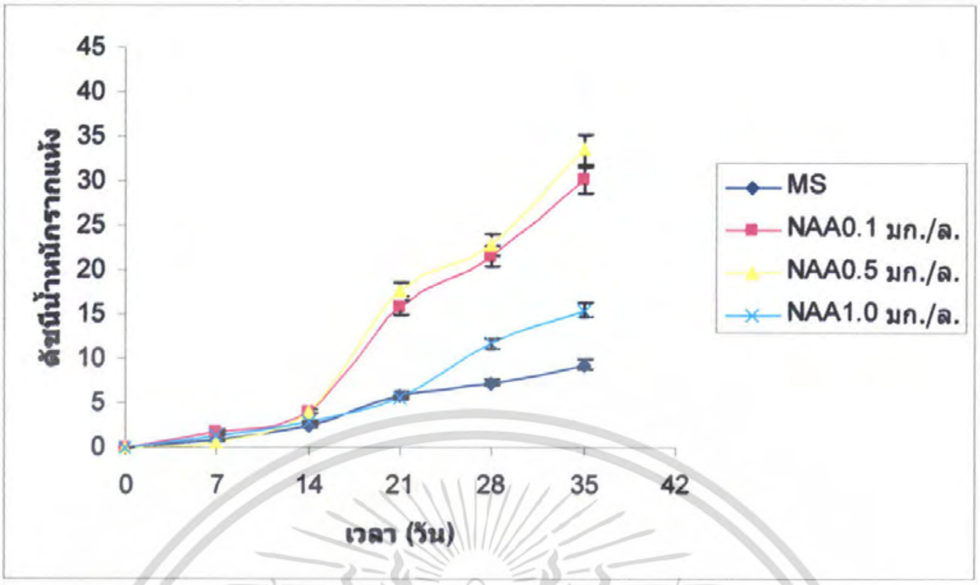
ตารางที่ 4.18 แสดงดัชนีน้ำหนักรากแห้งเฉลี่ยที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรและสภาวะต่างๆ กันในวันที่ 35 ของการทดลอง

สูตรอาหาร	ดัชนีน้ำหนักรากแห้งเฉลี่ยในวันที่ 35 ของการทดลอง	
	แสง	ไม่ให้แสง
MS	6.77 ± 1.062^{d}	9.42 ± 0.636^{c}
MS + NAA 0.1 มก/ล	31.78 ± 6.024^{a}	30.19 ± 2.683^{a}
MS + NAA 0.5 มก/ล	39.31 ± 3.489^{a}	33.59 ± 3.101^{a}
MS + NAA 1.0 มก/ล	16.43 ± 2.029^{b}	15.51 ± 1.811^{b}

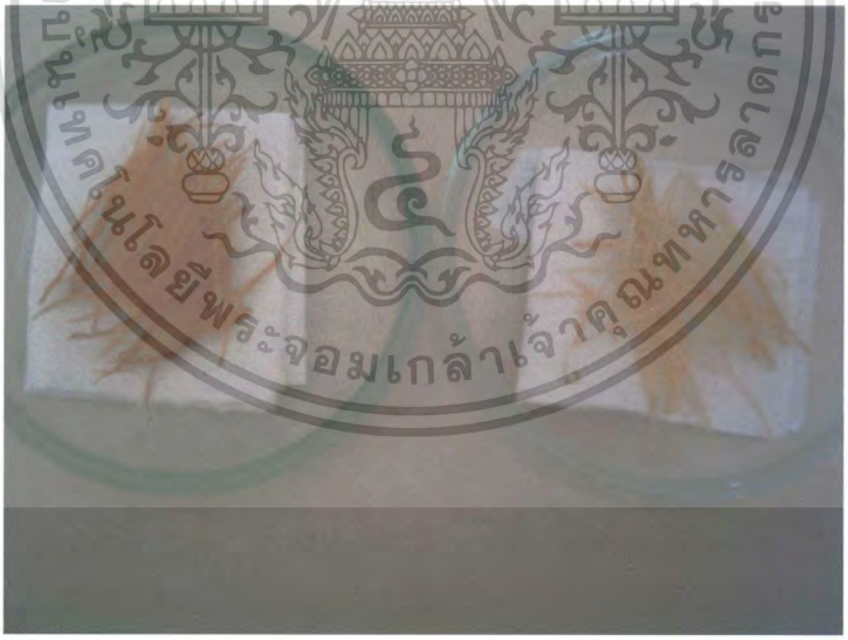
a, b, c... ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างของน้ำหนักรากหม่อนแห้งในแต่ละสูตรอาหารอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p\leq0.05$)



รูปที่ 4.3 แสดงการเจริญเติบโตของรากหม่อนโดยดูจากดัชนีน้ำหนักรากแห้งที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรต่างๆในสภาวะที่ให้แสง



รูปที่ 4.4 แสดงการเจริญเติบโตของรากหม่อน โดยดูจากดัชนีน้ำหนักรากแห้งที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรต่างๆในสภาวะที่ไม่ให้แสง



รูปที่ 4.5 แสดงลักษณะรากหม่อนแห้งที่ได้ โดย (ด้านซ้าย) เป็นรากหม่อนแห้งที่เลี้ยงในสภาวะที่ให้แสง (ด้านขวา) เป็นรากหม่อนแห้งที่เลี้ยงในสภาวะที่ไม่ให้แสง

4.1.3 ศึกษาปริมาณน้ำตาลที่เหลือในอาหารเพาะเลี้ยงรากหม่อน

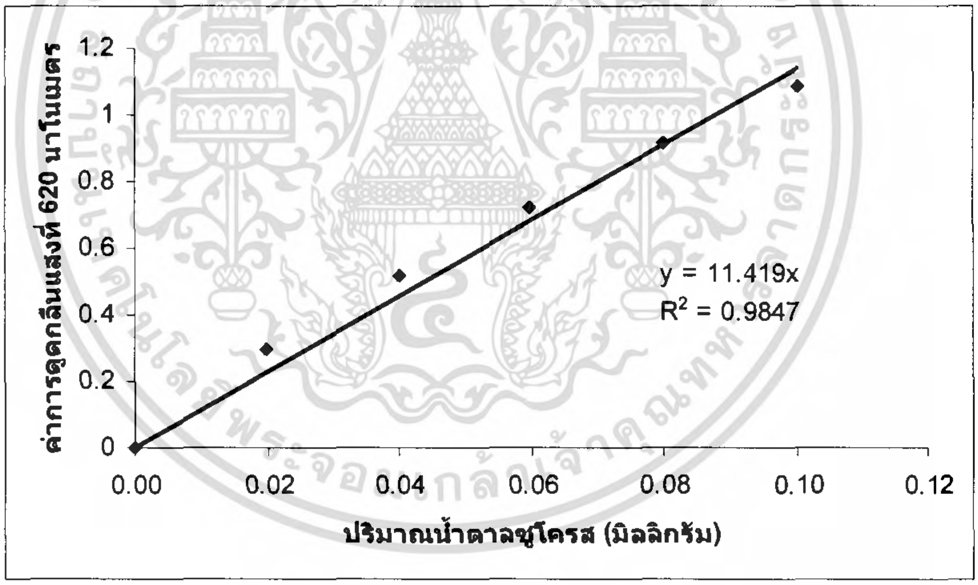
ในการทดลองหาปริมาณน้ำตาลที่เหลือในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรากหม่อน ในส่วนแรกที่แสดงผลของกราฟมาตรฐานน้ำตาลซูโครส เพื่อนำส่วนสมการเส้นตรงจากกราฟมาคำนวณค่าปริมาณน้ำตาลที่เหลือในอาหารสูตรต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 4.19 และรูปที่ 4.6

จากการทดลองเพาะเลี้ยงรากหม่อนในอาหาร 4 สูตร คือ อาหารสูตร MS, อาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร, อาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเพาะเลี้ยงใน 2 สภาวะ คือ การเพาะเลี้ยงในสภาวะให้แสงและไม่ให้แสง โดยทำการวัดการเจริญจากปริมาณน้ำตาลที่เหลือในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรากหม่อนทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 35 วัน แสดงในตารางที่ 4.20-4.27 ส่วนตารางที่ 4.28 แสดงปริมาณน้ำตาลที่เหลือทุกสูตรอาหารและสภาวะ และรูปที่ 4.7 และ 4.8 แสดงกราฟการเจริญเติบโตของรากโดยดูจากปริมาณน้ำตาลที่เหลือในสูตรอาหารต่างๆ ในสภาวะให้แสงและไม่ให้แสงตามลำดับ

จากการทดลองพบว่ารากหม่อน โดยทำการวัดการเจริญจากปริมาณน้ำตาลที่เหลือในอาหารเพาะเลี้ยงรากหม่อนทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 35 วัน โดยวันที่ 0 มีน้ำตาลเริ่มต้น 17.59 มิลลิกรัม จะได้ว่าปริมาณน้ำตาลหมดในวันที่ 35 ของทุกสูตรอาหารยกเว้น สูตรอาหาร MS ที่ยังเหลือน้ำตาล 2.89 มิลลิกรัม ผลที่ได้แสดงว่ารากหม่อนทุกสูตรอาหารมีการเจริญอย่างต่อเนื่อง ในขณะที่ปริมาณน้ำตาลลดลงเมื่อพิจารณาจากรูปที่ 4.7 และ4.8 เนื่องจากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนที่พืชใช้ในการเจริญเติบโต

ตารางที่ 4.19 แสดงปริมาณน้ำตาลซูโครสต่อค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร

ปริมาณน้ำตาลซูโครส (มก.)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน
	1	2	3		
0	0.025	0.023	0.031	0.026	0.0042
0.02	0.297	0.295	0.293	0.295	0.0020
0.04	0.521	0.511	0.514	0.515	0.0051
0.06	0.723	0.718	0.720	0.720	0.0025
0.08	0.910	0.917	0.910	0.912	0.0040
0.10	1.084	1.088	1.083	1.085	0.0026



รูปที่ 4.6 แสดงกราฟมาตรฐานน้ำตาลซูโครสระหว่างปริมาณน้ำตาลซูโครสต่อค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร

ตารางที่ 4.20 แสดงปริมาณน้ำตาลที่เหลือในอาหารสูตรMS ซึ่งเพาะเลี้ยงรากหม่อนในสภาวะที่ให้แสง

สภาวะ	สูตรอาหาร	วันที่	ซ้ำที่	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร[a]	เฉลี่ย	ปริมาณน้ำตาลจากกราฟ (มก.)	ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (มก.)
แสง	MS	0	1	1.0050	1.0046	0.0880	17.59
			2	1.0030			
			3	1.0057			
		7	1	0.7700	0.8129	0.0712	14.24
			2	0.8403			
			3	0.8283			
		14	1	0.5660	0.5792	0.0507	10.14
			2	0.6183			
			3	0.5533			
		21	1	0.8493	0.8497	0.0744	7.44
			2	0.8367			
			3	0.8630			
		28	1	0.5407	0.5532	0.0484	4.84
			2	0.5607			
			3	0.5583			
		35	1	0.3363	0.3299	0.0289	2.89
			2	0.3370			
			3	0.3163			

[a] เป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำของในแต่ละขวดการทดลอง โดยข้อมูลอยู่ในส่วนภาคผนวก

ตารางที่ 4.21 แสดงปริมาณน้ำตาลที่เหลือในอาหารสูตรMS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรซึ่งเพาะเลี้ยงรากหม่อนใน สภาวะที่ให้แสง

สภาวะ	สูตรอาหาร	วันที่	ซ้ำที่	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร[a]	เฉลี่ย	ปริมาณน้ำตาลจากกราฟ (มก.)	ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (มก.)
แสง	MS + NAA0.1 มก/ล	0	1	1.0050	1.0046	0.0880	17.59
			2	1.0030			
			3	1.0057			
		7	1	0.5917	0.5742	0.0503	10.06
			2	0.5567			
			3	0.5743			
		14	1	0.3920	0.3694	0.0324	6.47
			2	0.2233			
			3	0.4930			
		21	1	0.3593	0.3634	0.0318	3.18
			2	0.3743			
			3	0.3567			
		28	1	0.8237	0.8226	0.0720	0.72
			2	0.8297			
			3	0.8143			
		35	1	0.0037	0.0070	0.0006	0.01
			2	0.0080			
			3	0.0093			

[a] **เป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำของในแต่ละขวดการทดลอง โดยข้อมูลอยู่ในส่วนภาคผนวก**

ตารางที่ 4.22 แสดงปริมาณน้ำตาลที่เหลือในอาหารสูตรMS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรซึ่งเพาะเลี้ยงรากหม่อนในสภาวะที่ให้แสง

สภาวะ	สูตรอาหาร	วันที่	ซ้ำที่	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร[a]	เฉลี่ย	ปริมาณน้ำตาลจากกราฟ (มก.)	ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (มก.)
แสง	MS + NAA0.5 มก/ล	0	1	1.0050	1.0046	0.0880	17.59
			2	1.0030			
			3	1.0057			
		7	1	0.5540	0.5601	0.0491	9.81
			2	0.5713			
			3	0.5550			
		14	1	0.3673	0.3668	0.0321	6.42
			2	0.3560			
			3	0.3770			
		21	1	0.2650	0.2543	0.0223	2.23
			2	0.2243			
			3	0.2737			
		28	1	0.5800	0.5787	0.0507	0.51
			2	0.5763			
			3	0.5797			
		35	1	0.0033	0.0067	0.0006	0.01
			2	0.0077			
			3	0.0090			

[a] เป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำของในแต่ละขวดการทดลอง โดยข้อมูลอยู่ในส่วนภาคผนวก

ตารางที่ 4.23 แสดงปริมาณน้ำตาลที่เหลือในอาหารสูตรMS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรซึ่งเพาะเลี้ยงรากหม่อนในสภาวะที่ให้แสง

สภาวะ	สูตรอาหาร	วันที่	ซ้ำที่	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร[a]	เฉลี่ย	ปริมาณน้ำตาลจากกราฟ (มก.)	ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (มก.)
แสง	MS + NAA1.0 มก/ล	0	1	1.0050	1.0046	0.0880	17.59
			2	1.0030			
			3	1.0057			
		7	1	0.5560	0.5640	0.0494	9.88
			2	0.5843			
			3	0.5517			
		14	1	0.3450	0.3388	0.0297	5.93
			2	0.3467			
			3	0.3247			
		21	1	0.4557	0.4460	0.0391	3.91
			2	0.4370			
			3	0.4453			
		28	1	0.7500	0.7541	0.0660	0.66
			2	0.7773			
			3	0.7350			
		35	1	0.0063	0.0090	0.0008	0.01
			2	0.0113			
			3	0.0093			

[a] เป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำของในแต่ละขวดการทดลอง โดยข้อมูลอยู่ในส่วนภาคผนวก

ตารางที่ 4.24 แสดงปริมาณน้ำตาลที่เหลือในอาหารสูตรMS ซึ่งเพาะเลี้ยงรากหม่อนในสภาวะที่ไม่ให้แสง

สภาวะ	สูตรอาหาร	วันที่	ซ้ำที่	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร[a]	เฉลี่ย	ปริมาณน้ำตาลจากกราฟ (มก.)	ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (มก.)
ไม่ให้แสง	MS	0	1	1.0050	1.0046	0.0880	17.59
			2	1.0030			
			3	1.0057			
		7	1	0.7510	0.7396	0.0648	12.95
			2	0.7213			
			3	0.7463			
		14	1	0.4203	0.4668	0.0409	8.18
			2	0.4530			
			3	0.5270			
		21	1	0.4730	0.4730	0.0414	4.14
			2	0.4813			
			3	0.4647			
		28	1	0.2893	0.2732	0.0239	2.39
			2	0.2700			
			3	0.2603			
		35	1	0.9423	0.9203	0.0806	0.81
			2	0.9160			
			3	0.9027			

[a] เป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำของในแต่ละขวดการทดลอง โดยข้อมูลอยู่ในส่วนภาคผนวก

ตารางที่ 4.25 แสดงปริมาณน้ำตาลที่เหลือในอาหารสูตรMS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรซึ่งเพาะเลี้ยงรากหม่อนในสภาวะที่ไม่ให้แสง

สภาวะ	สูตรอาหาร	วันที่	ซ้ำที่	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร[a]	เฉลี่ย	ปริมาณน้ำตาลจากกราฟ (มก.)	ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (มก.)
ไม่ให้แสง	MS + NAA0.1มก/ล	0	1	1.0050	1.0046	0.0880	17.59
			2	1.0030			
			3	1.0057			
		7	1	0.7260	0.7257	0.0635	12.71
			2	0.7227			
			3	0.7283			
		14	1	0.4713	0.4547	0.0398	7.96
			2	0.5213			
			3	0.3713			
		21	1	0.2603	0.2654	0.0232	2.32
			2	0.2787			
			3	0.2573			
		28	1	0.8717	0.8137	0.0713	0.71
			2	0.8270			
			3	0.7423			
		35	1	0.0093	0.0114	0.0010	0.01
			2	0.0110			
			3	0.0140			

[a] เป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำของในแต่ละขวดการทดลอง โดยข้อมูลอยู่ในส่วนภาคผนวก

ตารางที่ 4.26 แสดงปริมาณน้ำตาลที่เหลือในอาหารสูตรMS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรซึ่งเพาะเลี้ยงรากหม่อนในสภาวะที่ไม่ให้แสง

สภาวะ	สูตรอาหาร	วันที่	ซ้ำที่	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร[a]	เฉลี่ย	ปริมาณน้ำตาลจากกราฟ (มก.)	ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (มก.)
ไม่ให้แสง	MS + NAA0.5 มก/ล	0	1	1.0050	1.0046	0.0880	17.59
			2	1.0030			
			3	1.0057			
		7	1	0.6590	0.6646	0.0582	11.64
			2	0.6717			
			3	0.6630			
		14	1	0.3837	0.3690	0.0323	6.46
			2	0.3943			
			3	0.3290			
		21	1	0.3107	0.3151	0.0276	2.76
			2	0.3097			
			3	0.3250			
		28	1	0.5173	0.5108	0.0447	0.45
			2	0.5207			
			3	0.4943			
		35	1	0.0050	0.0059	0.0005	0.01
			2	0.0070			
			3	0.0057			

[a] เป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำของในแต่ละขวดการทดลอง โดยข้อมูลอยู่ในส่วนภาคผนวก

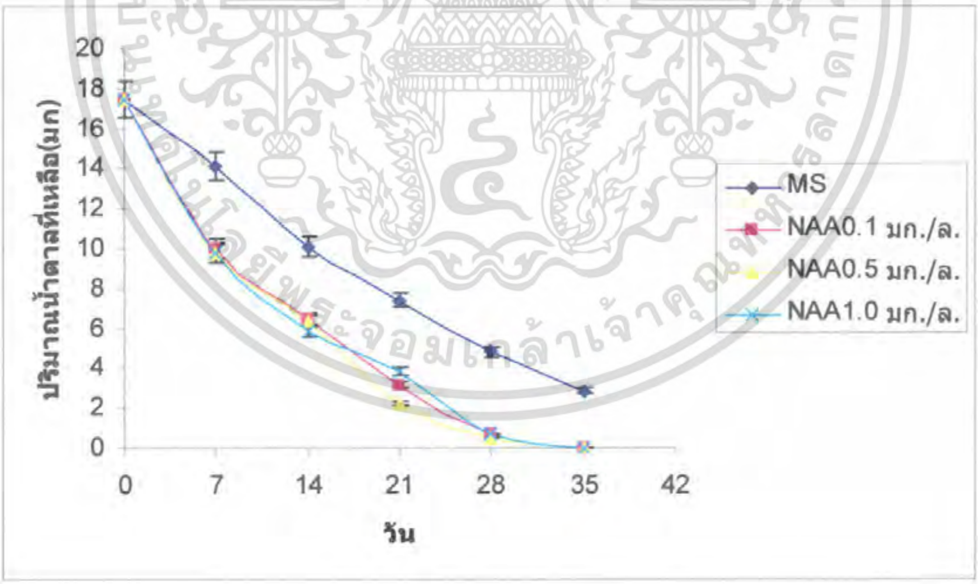
ตารางที่ 4.27 แสดงปริมาณน้ำตาลที่เหลือในอาหารสูตรMS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรซึ่งเพาะเลี้ยงรากหม่อนในสภาวะที่ไม่ให้แสง

สภาวะ	สูตรอาหาร	วันที่	ซ้ำที่	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร[a]	เฉลี่ย	ปริมาณน้ำตาลจากกราฟ (มก.)	ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (มก.)
ไม่ให้แสง	MS + NAA1.0 มก/ล	0	1	1.0050	1.0046	0.0880	17.59
			2	1.0030			
			3	1.0057			
		7	1	0.5133	0.5230	0.0458	9.16
			2	0.5373			
			3	0.5183			
		14	1	0.3790	0.3773	0.0330	6.61
			2	0.3760			
			3	0.3770			
		21	1	0.3633	0.3523	0.0309	3.09
			2	0.3420			
			3	0.3517			
		28	1	0.7677	0.7566	0.0663	0.66
			2	0.7500			
			3	0.7520			
		35	1	0.0037	0.0092	0.0008	0.01
			2	0.0097			
			3	0.0143			

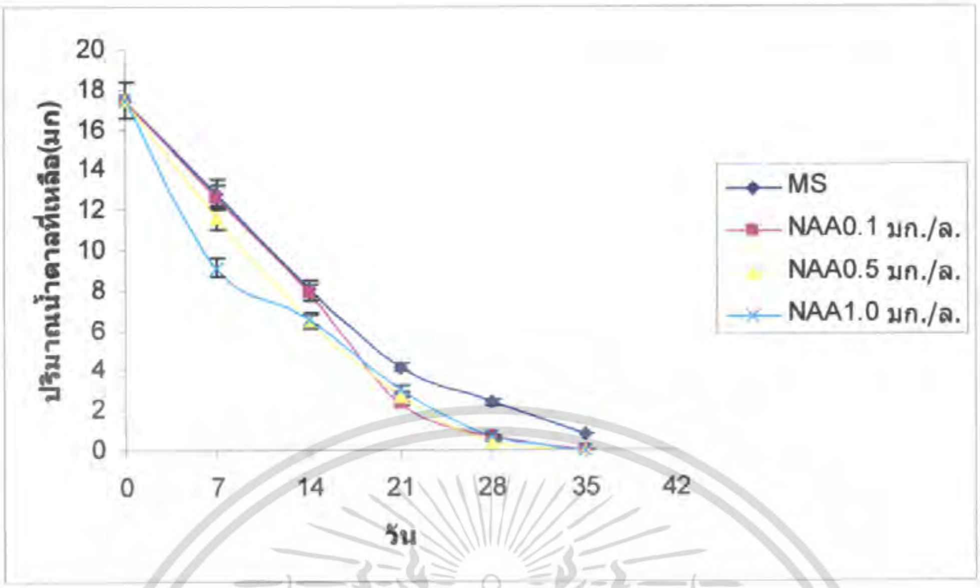
[a] เป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำของในแต่ละขวดการทดลอง โดยข้อมูลอยู่ในส่วนภาคผนวก

ตารางที่ 4.28 แสดงปริมาณเฉลี่ยของน้ำตาลที่เหลือในอาหารเพาะเลี้ยงสูตรต่างๆที่สภาวะต่างๆ ตลอดการเจริญของรากหม่อน

สภาวะ	สูตรอาหาร	ปริมาณน้ำตาลที่เหลือของวันที่ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)					
		0	7	14	21	28	35
แสง	MS	17.59	14.24	10.14	7.44	4.84	2.89
	MS + NAA 0.1 มก/ล	17.59	10.06	6.47	3.18	0.72	0.01
	MS + NAA 0.5 มก/ล	17.59	9.81	6.42	2.23	0.51	0.01
	MS + NAA 1.0 มก/ล	17.59	9.88	5.93	3.91	0.66	0.01
ไม่ให้แสง	MS	17.59	12.95	8.18	4.14	2.39	0.81
	MS + NAA 0.1 มก/ล	17.59	12.71	7.96	2.32	0.71	0.01
	MS + NAA 0.5 มก/ล	17.59	11.64	6.46	2.76	0.45	0.01
	MS + NAA 1.0 มก/ล	17.59	9.16	6.61	3.09	0.66	0.01



รูปที่ 4.7 แสดงปริมาณน้ำตาลที่เหลือในอาหารเพาะเลี้ยงรากหม่อนสูตรต่างๆในสภาวะที่ให้แสง



รูปที่ 4.8 แสดงปริมาณน้ำตาลที่เหลือในอาหารเพาะเลี้ยงรากหม่อนสูตรต่างๆในสภาวะที่ไม่ให้แสง

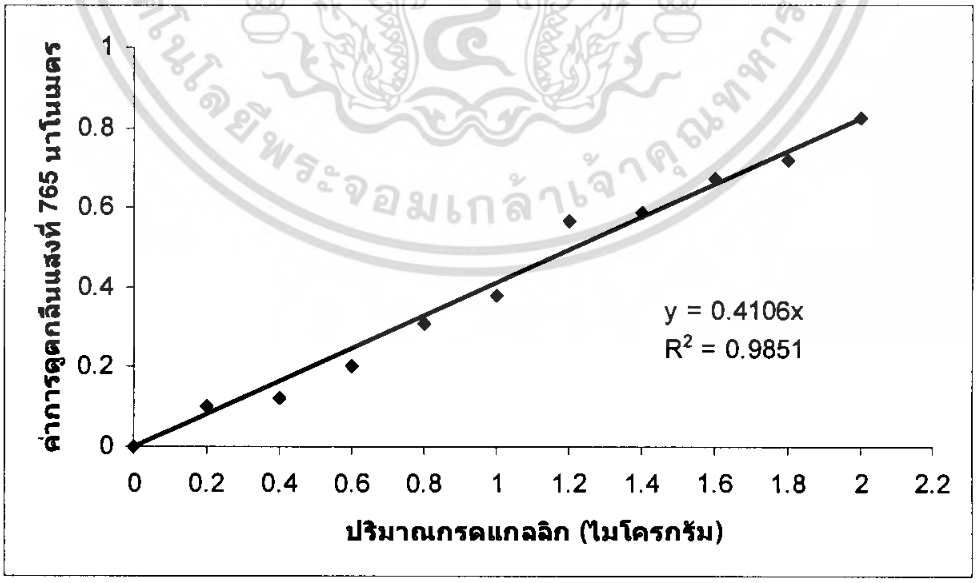
4.2 การทดสอบคุณสมบัติสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรากหม่อน

4.2.1 การหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด

จากการทดลองนำรากหม่อนแห้งที่เพาะเลี้ยงในแต่ละสูตรอาหารและสภาวะเพาะเลี้ยง มาสกัดด้วยเมทานอลเป็นเวลา 3 วัน เพื่อหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด โดยเทียบจากกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก แสดงในตารางที่ 4.29 และรูปที่4.9 และจะได้ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในรากหม่อนในแต่ละสูตรอาหารและสภาวะดังแสดงในตารางที่ 4.30 และ 4.31 ส่วนตารางที่ 4.32 เป็นตารางสรุปปริมาณฟีนอลิกในรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในทุกสูตรอาหารและสภาวะต่างๆ

ตารางที่ 4.29 แสดงปริมาณกรดแกลลิกต่อการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร

กรดแกลลิก (ไมโครกรัม)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร			เฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน
	1	2	3		
0.2	0.103	0.101	0.106	0.1033	0.0025
0.4	0.127	0.117	0.120	0.1213	0.0051
0.6	0.198	0.201	0.204	0.2010	0.0030
0.8	0.307	0.310	0.311	0.3093	0.0021
1.0	0.381	0.378	0.372	0.3770	0.0046
1.2	0.559	0.573	0.562	0.5647	0.0074
1.4	0.592	0.581	0.583	0.5853	0.0059
1.6	0.665	0.678	0.668	0.6703	0.0068
1.8	0.715	0.721	0.720	0.7187	0.0032
2.0	0.835	0.803	0.830	0.8227	0.0172



รูปที่ 4.9 แสดงกราฟมาตรฐานกรดแกลลิกต่อค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร

ตารางที่ 4.30 แสดงปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดจากสารสกัดรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ให้แสงกับอาหารสูตรต่างๆ

สภาวะ	สูตรอาหาร	สารสกัด (มก.)	ซ้ำที่	ค่าดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร	ค่าฟีนอลิกทั้งหมด[a]	ค่าเฉลี่ยฟีนอลิกทั้งหมด	ค่าเบี่ยงเบน
แสง	MS	0.8	1	0.585	1.78	1.76	0.023
			2	0.570	1.74		
			3	0.575	1.75		
	MS + NAA0.1 มก/ล	0.8	1	0.780	2.37	2.31	0.074
			2	0.761	2.32		
			3	0.732	2.23		
	MS + NAA0.5 มก/ล	0.8	1	0.620	1.89	2.02	0.112
			2	0.678	2.06		
			3	0.688	2.09		
	MS + NAA1.0 มก/ล	0.8	1	0.602	1.83	1.85	0.018
			2	0.614	1.87		
			3	0.608	1.85		

[a] ค่าฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัด โดยเทียบหน่วยเป็น ไมโครกรัมกรดแกลลิกต่อสาสกัด 1 มิลลิกรัม

ตารางที่ 4.31 แสดงปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดจากสารสกัดรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ไม่ให้แสงกับอาหารสูตรต่างๆ

สภาวะ	สูตรอาหาร	สารสกัด (มก.)	ซ้ำที่	ค่าดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร	ค่าฟีนอลิกทั้งหมด [a]	ค่าเฉลี่ยฟีนอลิกทั้งหมด	ค่าเบี่ยงเบน
ไม่ใช้แสง	MS	0.8	1	0.515	1.57	1.56	0.026
			2	0.522	1.59		
			3	0.505	1.54		
	MS + NAA0.1 มก/ล	0.8	1	0.606	1.84	1.94	0.078
			2	0.649	1.98		
			3	0.652	1.98		
	MS + NAA0.5 มก/ล	0.8	1	0.543	1.65	1.70	0.039
			2	0.563	1.71		
			3	0.567	1.73		
	MS + NAA1.0 มก/ล	0.8	1	0.523	1.59	1.60	0.011
			2	0.527	1.60		
			3	0.530	1.61		

[a] ค่าฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัด โดยเทียบหน่วยเป็น ไมโครกรัมกรดแกลลิกต่อสาสกัด 1 มิลลิกรัม

ตารางที่ 4.32 แสดงปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเฉลี่ยจากสารสกัดรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรและสภาวะต่างๆ กัน

สูตรอาหาร	ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (ไมโครกรัม ของกรดแกลลิกต่อสารสกัด 1 มก.)	
	แสง	ไม่ให้แสง
MS	$1.76 \pm 0.023^{d,e}$	1.56 ± 0.026^{g}
MS + NAA 0.1 มก/ล	2.31 ± 0.074^{a}	$1.94 \pm 0.078^{b,c}$
MS + NAA 0.5 มก/ล	2.02 ± 0.112^{b}	$1.70 \pm 0.039^{e,f}$
MS + NAA 1.0 มก/ล	$1.85 \pm 0.018^{c,d}$	$1.60 \pm 0.011^{f,g}$

$^{a, b, c...}$ ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างของปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดรากหม่อนในแต่ละสูตรอาหารอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ $(p \leq 0.05)$

จากผลปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในอาหาร 4 สูตร คือ อาหารสูตร MS, อาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร, อาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเพาะเลี้ยงใน 2 สภาวะ คือ การเพาะเลี้ยงในสภาวะให้แสงและไม่ให้แสง พบว่าค่าฟีนอลิกสูงสุดในอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาวะที่ให้แสง มีค่า 2.31±0.074 ไมโครกรัมของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมสารสกัด เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ $(p \leq 0.05)$

4.2.2 การศึกษาคุณสมบัติของสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

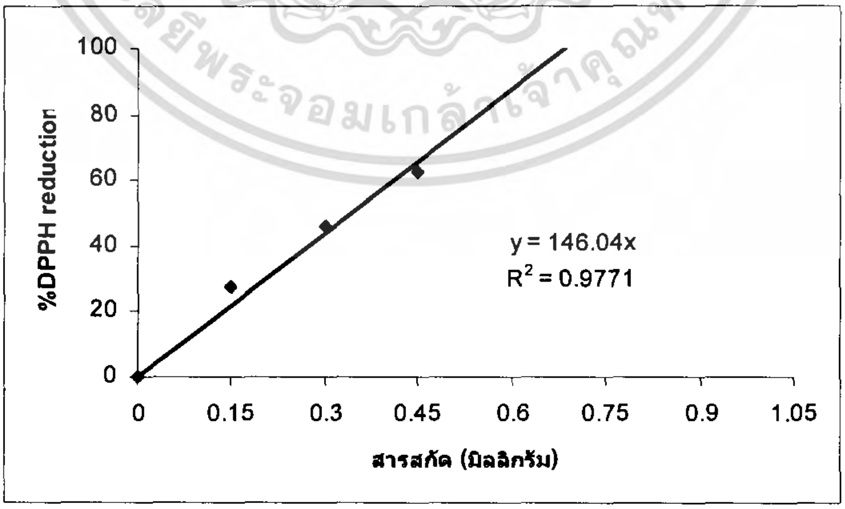
จากการทดลองนำรากหม่อนแห้งที่เพาะเลี้ยงในแต่ละสูตรอาหารและสภาวะเพาะเลี้ยง มาสกัดด้วยเมทานอลแล้วทดสอบคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH โดยแสดงค่าเปอร์เซ็นต์ DPPH ที่ลดลง ดังแสดงในตารางที่ 4.33 ถึงตารางที่ 4.40 พบว่าสารสกัดรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารและสภาวะต่างๆ ที่ระดับปริมาณสารสกัดมากขึ้น จะมีค่าเปอร์เซ็นต์ DPPH ที่ลดลงเพิ่มขึ้น ซึ่งแสดงถึงคุณสมบัติในการลดปริมาณอนุมูลอิสระ ทุกสูตรอาหารและสภาวะ โดยเปรียบเทียบความสามารถในการลดปริมาณอนุมูลอิสระ DPPH จากค่า IC$_{50}$ ส่วนตารางที่ 4.41 เป็น

ค่าเปอร์เซ็นต์ DPPH ที่ลดลง โดยใช้สารละลาย Trolox เป็นสารมาตรฐานในการทดลอง และตาราง ที่ 4.42 เป็นค่า IC_{50} ของรากหม่อนที่เลี้ยงในแต่ละสูตรอาหารและสภาวะต่างๆ กัน เปรียบเทียบกับค่า IC_{50} ของสารละลาย Trolox

จากการทดลองพบว่าสารสกัดที่มีค่า IC_{50} ต่ำสุดหรือปริมาณสารสกัดน้อยสุดที่สามารถลดปริมาณ DPPH ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ คือสารสกัดรากหม่อนที่เลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และสูตรอาหาร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาวะให้แสง และสูตรอาหาร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาวะไม่ให้แสง มีค่า 0.317, 0.317 และ 0.320 มิลลิกรัมของสารสกัด ตามลำดับ โดยสารละลาย Trolox มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.016 มิลลิกรัมของ Trolox

ตารางที่ 4.33 แสดงปริมาณของสารสกัดรากหม่อนในอาหารสูตร MS สภาวะที่ให้แสง กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 515 นาโนเมตร และค่าเปอร์เซ็นต์ DPPH ที่ลดลง

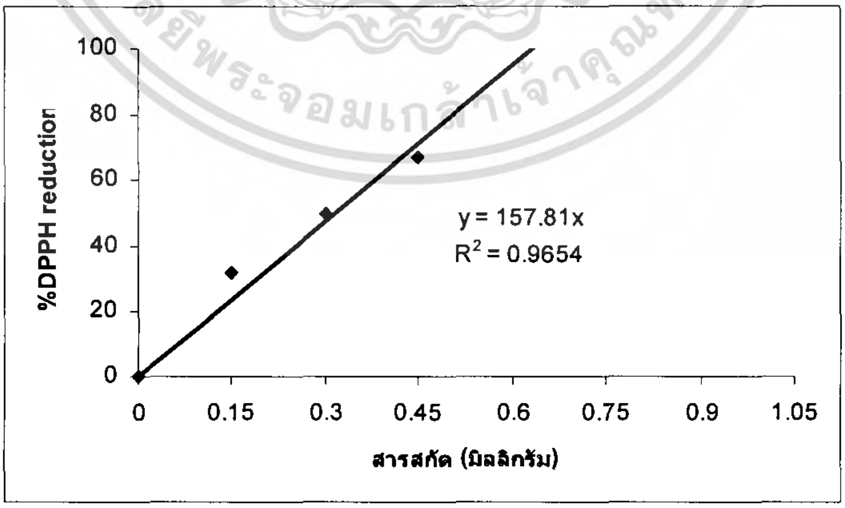
สภาวะ	สูตรอาหาร	สารสกัด (มก.)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 515 นาโนเมตร			เฉลี่ย	%DPPH reduction
			1	2	3		
แสง	MS	0	1.001	0.999	1.003	1.001	0.00
		0.15	0.726	0.722	0.725	0.7243	27.64
		0.30	0.547	0.532	0.542	0.5403	46.02
		0.45	0.385	0.376	0.370	0.3770	62.34
		0.60	0.302	0.325	0.322	0.3163	68.40
		0.75	0.262	0.264	0.265	0.2637	73.66
		0.90	0.193	0.195	0.190	0.1927	80.75
		1.05	0.148	0.148	0.140	0.1453	85.48
		1.20	0.115	0.123	0.112	0.1167	88.34
		1.35	0.122	0.111	0.120	0.1177	88.25
		1.50	0.097	0.099	0.094	0.0967	90.34



รูปที่ 4.10 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ DPPH ที่ลดลง ต่อสารสกัดรากหม่อนในสูตรอาหาร MS สภาวะที่ให้แสง

ตารางที่ 4.34 แสดงปริมาณของสารสกัดรากหม่อนในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สภาวะที่ให้แสงกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 515 นาโนเมตร และค่าเปอร์เซ็นต์ DPPH ที่ลดลง

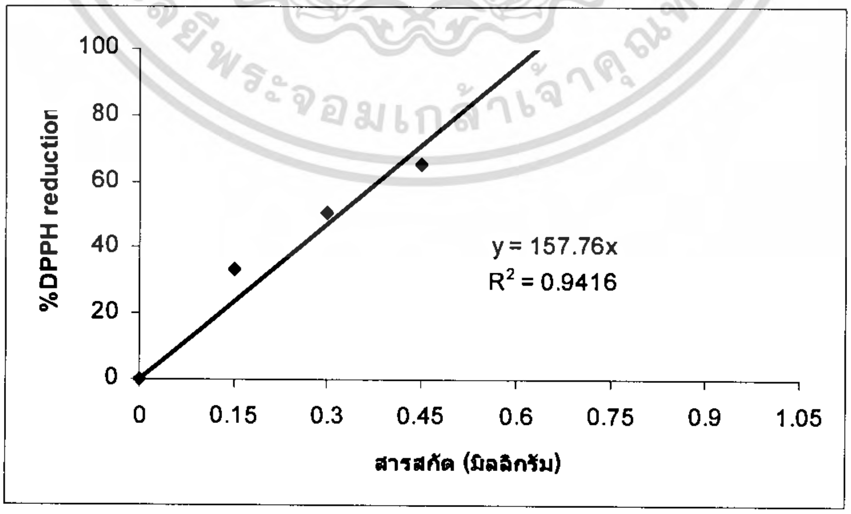
สภาวะ	สูตรอาหาร	สารสกัด (มก.)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 515 นาโนเมตร			เฉลี่ย	%DPPH reduction
			1	2	3		
แสง	MS + NAA 0.1 มก/ล	0	1.001	0.999	1.003	1.001	0.00
		0.15	0.685	0.684	0.685	0.6847	31.60
		0.30	0.502	0.509	0.504	0.5050	49.55
		0.45	0.324	0.338	0.332	0.3313	66.90
		0.60	0.239	0.248	0.242	0.2430	75.72
		0.75	0.169	0.193	0.195	0.1857	81.45
		0.90	0.145	0.140	0.126	0.1370	86.31
		1.05	0.104	0.102	0.102	0.1027	89.74
		1.20	0.110	0.093	0.095	0.0993	90.08
		1.35	0.088	0.108	0.102	0.0993	90.08
		1.50	0.087	0.086	0.088	0.0870	91.31



รูปที่ 4.11 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ DPPH ที่ลดลง ต่อสารสกัดรากหม่อนในสูตรอาหาร MS ที่เติมสาร NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาวะที่ให้แสง

ตารางที่ 4.35 แสดงปริมาณของสารสกัดรากหม่อนในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สภาวะที่ให้แสงกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 515 นาโนเมตร และค่าเปอร์เซ็นต์ DPPH ที่ลดลง

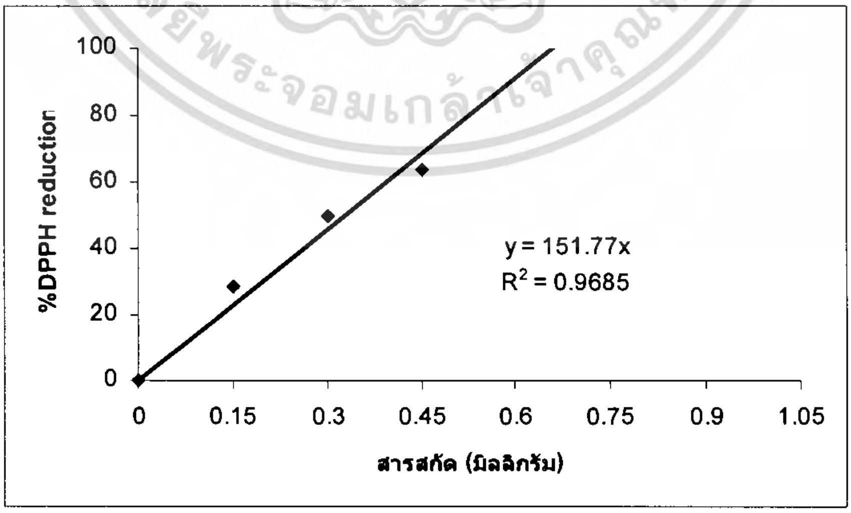
สภาวะ	สูตรอาหาร	สารสกัด (มก.)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 515 นาโนเมตร			เฉลี่ย	%DPPH reduction
			1	2	3		
แสง	MS + NAA 0.5 มก/ล	0	1.001	0.999	1.003	1.001	0.00
		0.15	0.671	0.661	0.662	0.6647	33.60
		0.30	0.479	0.501	0.505	0.4950	50.55
		0.45	0.356	0.326	0.353	0.3450	65.53
		0.60	0.301	0.252	0.295	0.2827	71.76
		0.75	0.229	0.225	0.232	0.2287	77.16
		0.90	0.139	0.147	0.183	0.1563	84.38
		1.05	0.116	0.127	0.119	0.1207	87.95
		1.20	0.094	0.096	0.095	0.0950	90.51
		1.35	0.100	0.084	0.099	0.0943	90.58
		1.50	0.081	0.094	0.085	0.0867	91.34



รูปที่ 4.12 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ DPPH ที่ลดลง ต่อสารสกัดรากหม่อนในสูตรอาหาร MS ที่เติมสาร NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาวะที่ให้แสง

ตารางที่ 4.36 แสดงปริมาณของสารสกัดรากหม่อนในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สภาวะที่ให้แสงกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 515 นาโนเมตร และค่าเปอร์เซ็นต์ DPPH ที่ลดลง

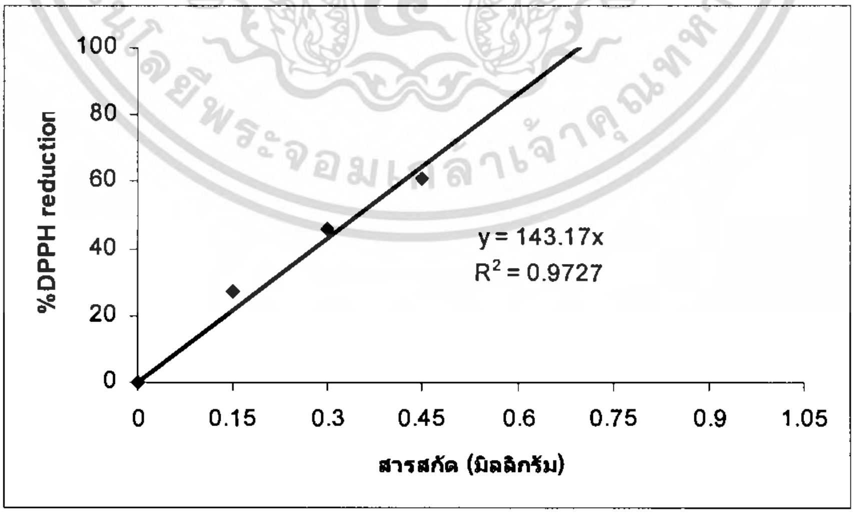
สภาวะ	สูตรอาหาร	สารสกัด (มก.)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 515 นาโนเมตร			เฉลี่ย	%DPPH reduction
			1	2	3		
แสง	MS + NAA 1.0 มก/ล	0	1.001	0.999	1.003	1.001	0.00
		0.15	0.715	0.712	0.712	0.7130	28.77
		0.30	0.506	0.510	0.503	0.5063	49.42
		0.45	0.366	0.365	0.359	0.3633	63.70
		0.60	0.296	0.295	0.292	0.2943	70.60
		0.75	0.243	0.245	0.248	0.2453	75.49
		0.90	0.156	0.150	0.156	0.1540	84.62
		1.05	0.113	0.119	0.115	0.1157	88.44
		1.20	0.098	0.099	0.089	0.0953	90.48
		1.35	0.089	0.092	0.086	0.0890	91.11
		1.50	0.085	0.083	0.080	0.0827	91.74



รูปที่ 4.13 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ DPPH ที่ลดลง ต่อสารสกัดรากหม่อนในสูตรอาหาร MS ที่เติมสาร NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาวะที่ให้แสง

ตารางที่ 4.37 แสดงปริมาณของสารสกัดรากหม่อนในอาหารสูตร MS สภาวะที่ไม่ให้แสง กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 515 นาโนเมตร และค่าเปอร์เซ็นต์ DPPH ที่ลดลง

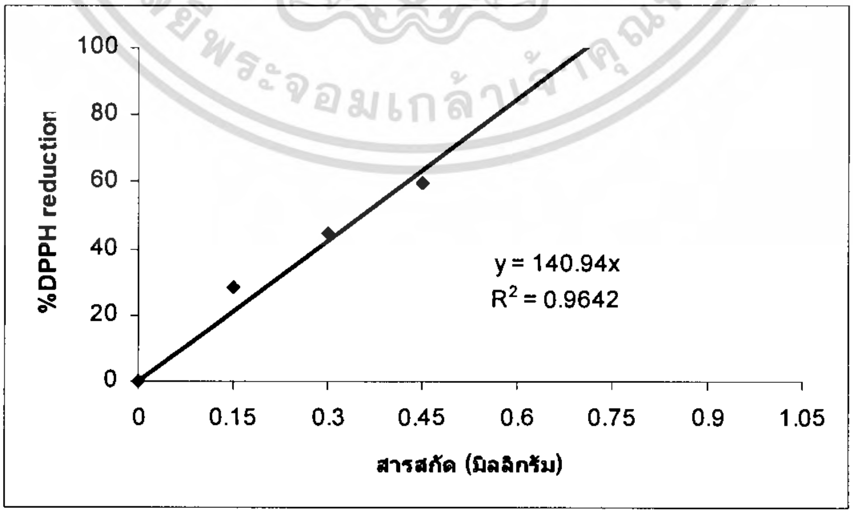
สภาวะ	สูตรอาหาร	สารสกัด (มก.)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 515 นาโนเมตร			เฉลี่ย	%DPPH reduction
			1	2	3		
ไม่ให้แสง	MS	0	1.001	0.999	1.003	1.001	0.00
		0.15	0.719	0.733	0.730	0.7273	27.34
		0.30	0.541	0.549	0.542	0.5440	45.65
		0.45	0.393	0.394	0.394	0.3937	60.67
		0.60	0.325	0.320	0.330	0.3250	67.53
		0.75	0.252	0.255	0.252	0.2530	74.73
		0.90	0.176	0.167	0.172	0.1717	82.85
		1.05	0.137	0.131	0.135	0.1343	86.58
		1.20	0.127	0.106	0.120	0.1177	88.25
		1.35	0.090	0.108	0.101	0.0997	90.04
		1.50	0.083	0.094	0.085	0.0873	91.28



รูปที่ 4.14 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ DPPH ที่ลดลง ต่อสารสกัดรากหม่อนในสูตรอาหาร MS สภาวะที่ไม่ให้แสง

ตารางที่ 4.38 แสดงปริมาณของสารสกัดรากหม่อนในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สภาวะที่ไม่ให้แสงกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 515 นาโนเมตร และค่าเปอร์เซ็นต์ DPPH ที่ลดลง

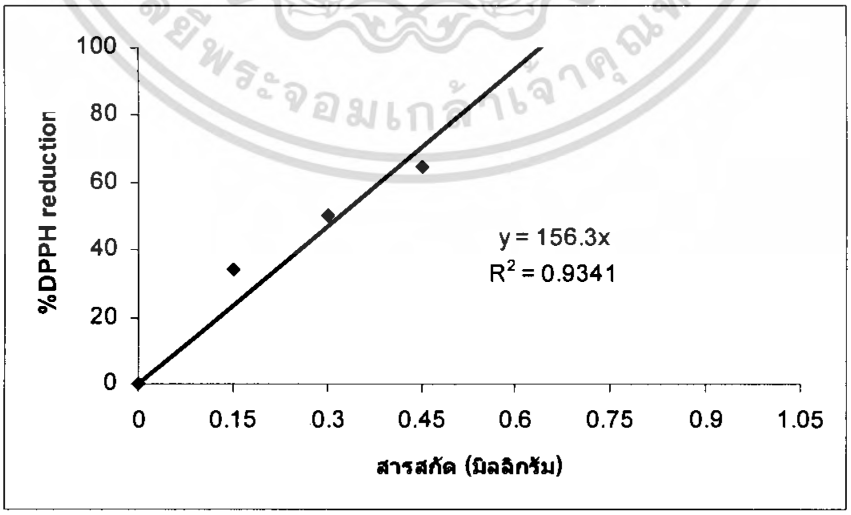
สภาวะ	สูตรอาหาร	สารสกัด (มก.)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 515 นาโนเมตร			เฉลี่ย	%DPPH reduction
			1	2	3		
ไม่ให้แสง	MS + NAA 0.1 มก/ล	0	1.001	0.999	1.003	1.001	0.00
		0.15	0.722	0.716	0.720	0.7193	28.14
		0.30	0.562	0.540	0.560	0.5540	44.66
		0.45	0.397	0.411	0.408	0.4053	59.51
		0.60	0.331	0.324	0.329	0.3280	67.23
		0.75	0.260	0.262	0.262	0.2613	73.89
		0.90	0.188	0.173	0.175	0.1787	82.15
		1.05	0.155	0.154	0.150	0.1530	84.72
		1.20	0.116	0.117	0.116	0.1163	88.38
		1.35	0.093	0.115	0.104	0.1040	89.61
		1.50	0.102	0.094	0.095	0.0970	90.31



รูปที่ 4.15 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ DPPH ที่ลดลง ต่อสารสกัดรากหม่อนในสูตรอาหาร MS ที่เติมสาร NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาวะที่ไม่ให้แสง

ตารางที่ 4.39 แสดงปริมาณของสารสกัดรากหม่อนในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สภาวะที่ไม่ให้แสงกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 515 นาโนเมตร และค่าเปอร์เซ็นต์ DPPH ที่ลดลง

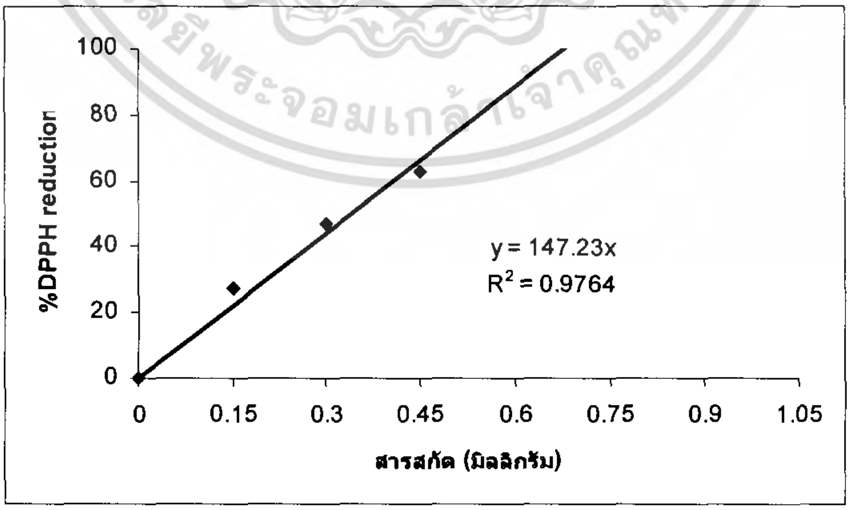
สภาวะ	สูตรอาหาร	สารสกัด (มก.)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 515 นาโนเมตร			เฉลี่ย	%DPPH reduction
			1	2	3		
ไม่ให้แสง	MS + NAA 0.5 มก/ล	0	1.001	0.999	1.003	1.001	0.00
		0.15	0.667	0.656	0.660	0.6610	33.97
		0.30	0.494	0.504	0.501	0.4997	50.08
		0.45	0.347	0.371	0.342	0.3533	64.70
		0.60	0.299	0.272	0.282	0.2843	71.60
		0.75	0.183	0.199	0.182	0.1880	81.22
		0.90	0.147	0.137	0.145	0.1430	85.71
		1.05	0.121	0.094	0.098	0.1043	89.58
		1.20	0.068	0.066	0.065	0.0663	93.37
		1.35	0.054	0.053	0.054	0.0537	94.64
		1.50	0.047	0.073	0.042	0.0540	94.61



รูปที่ 4.16 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ DPPH ที่ลดลง ต่อสารสกัดรากหม่อนในสูตรอาหาร MS ที่เติมสาร NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาวะที่ไม่ให้แสง

ตารางที่ 4.40 แสดงปริมาณของสารสกัดรากหม่อนในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สภาวะที่ไม่ให้แสงกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 515 นาโนเมตร และค่าเปอร์เซ็นต์ DPPH ที่ลดลง

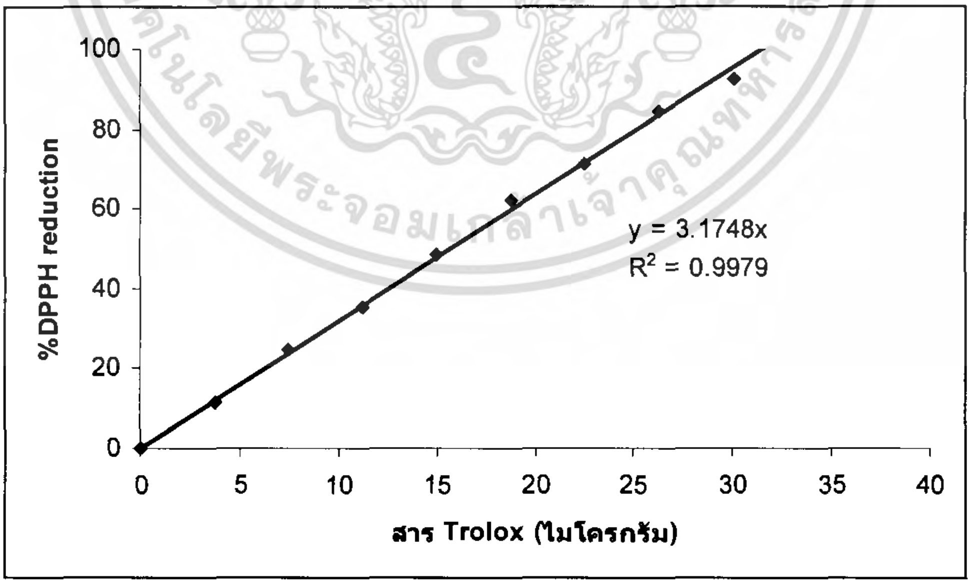
สภาวะ	สูตรอาหาร	สารสกัด (มก.)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 515 นาโนเมตร			เฉลี่ย	%DPPH reduction
			1	2	3		
ไม่ให้แสง	MS + NAA 1.0 มก/ล	0	1.001	0.999	1.003	1.001	0.00
		0.15	0.726	0.723	0.730	0.7263	27.44
		0.30	0.532	0.526	0.530	0.5293	47.12
		0.45	0.372	0.380	0.374	0.3753	62.50
		0.60	0.315	0.312	0.306	0.3110	68.93
		0.75	0.239	0.238	0.246	0.2410	75.92
		0.90	0.159	0.162	0.160	0.1603	83.98
		1.05	0.126	0.120	0.106	0.1173	88.28
		1.20	0.094	0.092	0.089	0.0917	90.84
		1.35	0.088	0.077	0.072	0.0790	92.11
		1.50	0.068	0.070	0.066	0.0680	93.21



รูปที่ 4.17 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ DPPH ที่ลดลง ต่อสารสกัดรากหม่อนในสูตรอาหาร MS ที่เติมสาร NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาวะที่ไม่ให้แสง

ตารางที่ 4.41 แสดงปริมาณของสารละลาย Trolox กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 515 นาโนเมตร และค่าเปอร์เซ็นต์ DPPH ที่ลดลง

สาร Trolox (ไมโครกรัม)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 515 นาโนเมตร			เฉลี่ย	%DPPH reduction
	1	2	3		
0	1.001	0.999	1.003	1.001	0.00
3.7545	0.864	0.903	0.880	0.8823	11.85
7.5090	0.743	0.755	0.761	0.7530	24.78
11.2635	0.654	0.630	0.663	0.6490	35.16
15.0180	0.506	0.525	0.513	0.5147	48.58
18.7725	0.378	0.369	0.385	0.3773	62.30
22.5270	0.272	0.267	0.318	0.2857	71.46
26.2815	0.147	0.163	0.164	0.1580	84.22
30.0360	0.062	0.086	0.075	0.0743	92.57
33.7905	0.053	0.058	0.072	0.0610	93.91
37.5450	0.043	0.046	0.049	0.0460	95.40



รูปที่ 4.18 แสดงกราฟมาตรฐาน ระหว่างปริมาณสาร Trolox ต่อเปอร์เซ็นต์ DPPH ที่ลดลง

ตารางที่ 4.42 แสดงค่า IC_{50} ของ DPPH จากสารสกัดรากหม่อนในอาหารสูตรและสภาวะต่างๆ กัน

สารสกัดจากรากหม่อน เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารต่างๆ	IC_{50} ของวิธี DPPH (มิลลิกรัมของสารสกัด)	
	แสง	ไม่ให้แสง
MS	0.342	0.349
MS + NAA 0.1 มก/ล	0.317	0.355
MS + NAA 0.5 มก/ล	0.317	0.320
MS + NAA 1.0 มก/ล	0.329	0.340
สารละลาย Trolox	0.016	

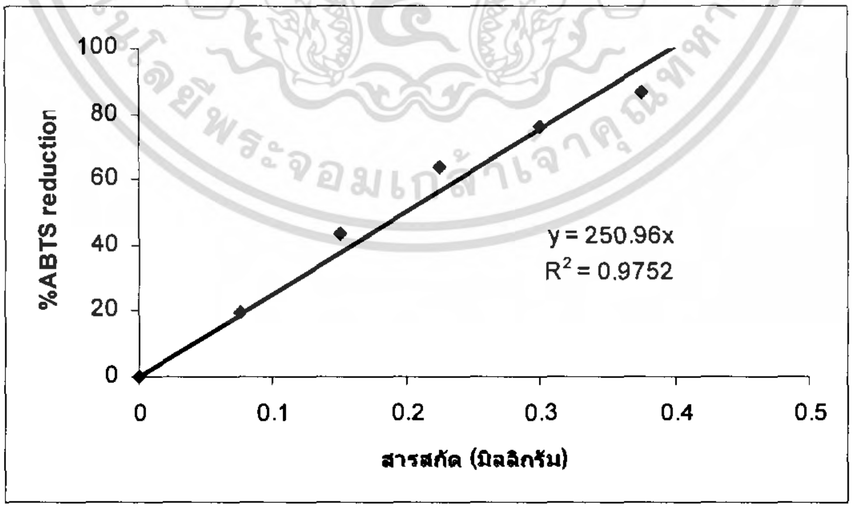
4.2.3 การศึกษาคุณสมบัติของสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS

จากการทดลองนำรากหม่อนแห้งที่เพาะเลี้ยงในแต่ละสูตรอาหารและสภาวะเพาะเลี้ยง มาสกัดด้วยเมทานอลแล้วทดสอบคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS โดยแสดงค่าเปอร์เซ็นต์ ABTS ที่ลดลง ดังแสดงในตารางที่ 4.43 ถึงตารางที่ 4.50 พบว่าสารสกัดรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารและสภาวะต่างๆ ที่ระดับปริมาณสารสกัดมากขึ้น จะมีค่าเปอร์เซ็นต์ ABTS ที่ลดลงเพิ่มขึ้น ซึ่งแสดงถึงคุณสมบัติในการลดปริมาณอนุมูลอิสระ ทุกสูตรอาหารและสภาวะ โดยเปรียบเทียบความสามารถในการลดปริมาณอนุมูลอิสระ ABTS จากค่า IC_{50} ส่วนตารางที่ 4.51 เป็นค่าเปอร์เซ็นต์ ABTS ที่ลดลง โดยใช้สารละลาย Trolox เป็นสารมาตรฐานในการทดลอง และตารางที่ 4.52 เป็นค่า IC_{50} ของรากหม่อนที่เลี้ยงในแต่ละสูตรอาหารและสภาวะต่างๆ กัน เปรียบเทียบกับค่า IC_{50} ของสารละลาย Trolox

จากการทดลองพบว่าสารสกัดที่มีค่า IC_{50} ต่ำสุดหรือปริมาณสารสกัดน้อยสุดที่สามารถลดปริมาณ ABTS ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ คือสารสกัดรากหม่อนที่เลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และสูตรอาหาร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาวะให้แสง มีค่า 0.153 และ 0.156 มิลลิกรัมของสารสกัด ตามลำดับ โดยสารละลาย Trolox มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.0078 มิลลิกรัมของ Trolox

ตารางที่ 4.43 แสดงปริมาณของสารสกัดรากหม่อนในอาหารสูตร MS สภาวะที่ให้แสงกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร และค่าเปอร์เซ็นต์ ABTS ที่ลดลง

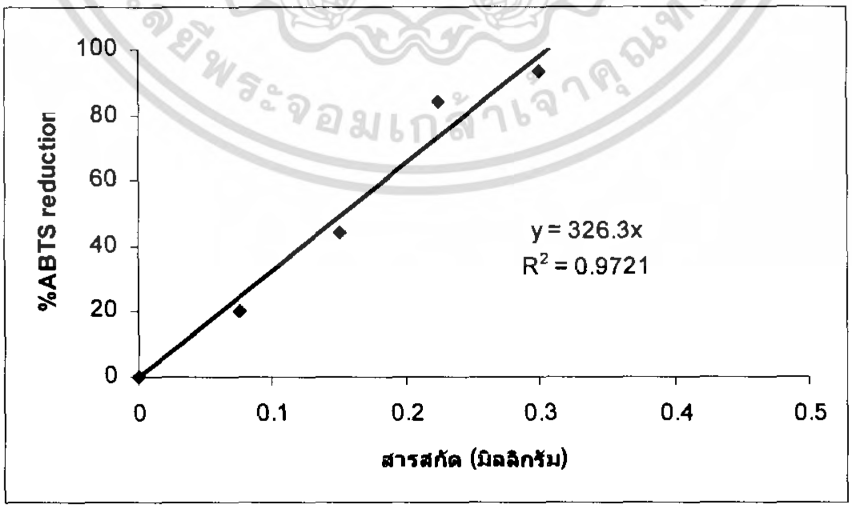
สภาวะ	สูตรอาหาร	สารสกัด (มก.)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร			เฉลี่ย	%ABTS reduction
			1	2	3		
แสง	MS	0.000	1.112	1.113	1.117	1.114	0.00
		0.075	0.901	0.895	0.896	0.8973	19.45
		0.150	0.632	0.632	0.625	0.6297	43.48
		0.225	0.402	0.412	0.405	0.4063	63.52
		0.300	0.264	0.265	0.265	0.2647	76.24
		0.375	0.142	0.158	0.146	0.1487	86.65
		0.450	0.065	0.070	0.062	0.0657	94.11
		0.525	0.015	0.013	0.012	0.0133	98.80
		0.600	0.006	0.016	0.009	0.0103	99.07
		0.675	0.002	0.010	0.008	0.0067	99.40
		0.750	0.017	0.005	0.007	0.0097	99.13



รูปที่ 4.19 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ ABTS ที่ลดลง ต่อสารสกัดรากหม่อนในสูตรอาหาร MS สภาวะที่ให้แสง

ตารางที่ 4.44 แสดงปริมาณของสารสกัดรากหม่อนในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สภาวะที่ให้แสงกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร และค่าเปอร์เซ็นต์ ABTS ที่ลดลง

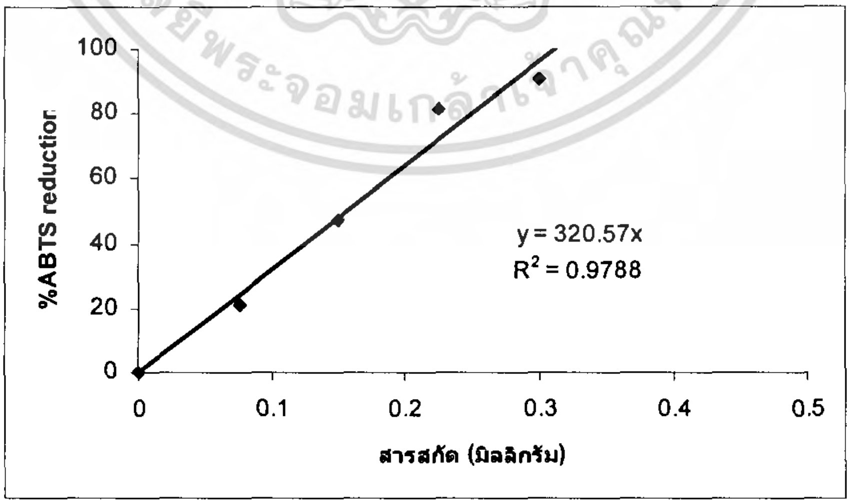
สภาวะ	สูตรอาหาร	สารสกัด (มก.)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร			เฉลี่ย	%ABTS reduction
			1	2	3		
แสง	MS + NAA 0.1 มก/ล	0.000	1.112	1.113	1.117	1.114	0.00
		0.075	0.858	0.894	0.910	0.8873	20.35
		0.150	0.640	0.606	0.618	0.6213	44.23
		0.225	0.156	0.184	0.186	0.1753	84.26
		0.300	0.080	0.062	0.087	0.0763	93.15
		0.375	0.016	0.009	0.029	0.0180	98.38
		0.450	0.005	0.005	0.020	0.0100	99.10
		0.525	0.003	0.008	0.014	0.0083	99.25
		0.600	0.004	0.004	0.013	0.0070	99.37
		0.675	0.005	0.014	0.003	0.0073	99.34
		0.750	0.013	0.004	0.003	0.0067	99.40



รูปที่ 4.20 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ ABTS ที่ลดลง ต่อสารสกัดรากหม่อนในสูตรอาหาร MS ที่เติมสาร NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาวะที่ให้แสง

ตารางที่ 4.45 แสดงปริมาณของสารสกัดรากหม่อนในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สภาวะที่ให้แสงกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร และค่าเปอร์เซ็นต์ ABTS ที่ลดลง

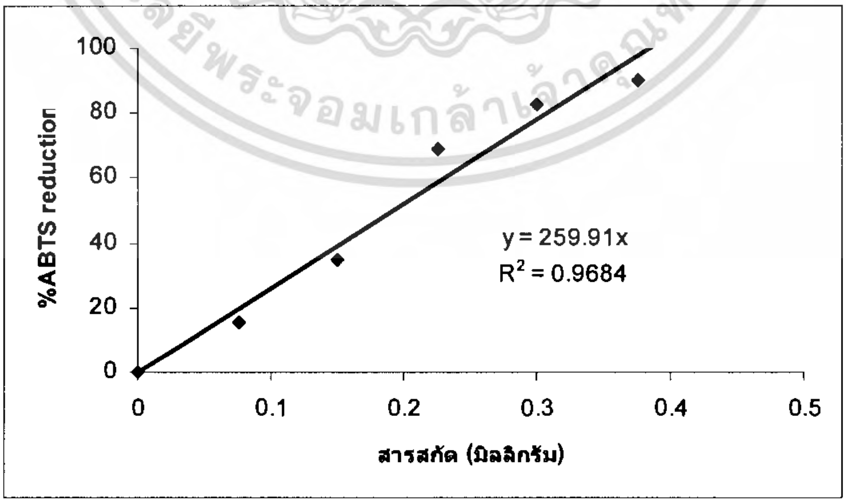
สภาวะ	สูตรอาหาร	สารสกัด (มก.)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร			เฉลี่ย	%ABTS reduction
			1	2	3		
แสง	MS + NAA 0.5 มก/ล	0.000	1.112	1.113	1.117	1.114	0.00
		0.075	0.870	0.885	0.889	0.8813	20.89
		0.150	0.605	0.559	0.604	0.5893	47.10
		0.225	0.200	0.211	0.214	0.2083	81.30
		0.300	0.098	0.095	0.122	0.1050	90.57
		0.375	0.042	0.041	0.045	0.0427	96.17
		0.450	0.014	0.016	0.027	0.0190	98.29
		0.525	0.004	0.007	0.012	0.0077	99.31
		0.600	0.004	0.013	0.014	0.0103	99.07
		0.675	0.003	0.007	0.003	0.0043	99.61
		0.750	0.013	0.013	0.001	0.0090	99.19



รูปที่ 4.21 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ ABTS ที่ลดลง ต่อสารสกัดรากหม่อนในสูตรอาหาร MS ที่เติมสาร NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาวะที่ให้แสง

ตารางที่ 4.46 แสดงปริมาณของสารสกัดรากหม่อนในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สภาวะที่ให้แสงกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร และค่าเปอร์เซ็นต์ ABTS ที่ลดลง

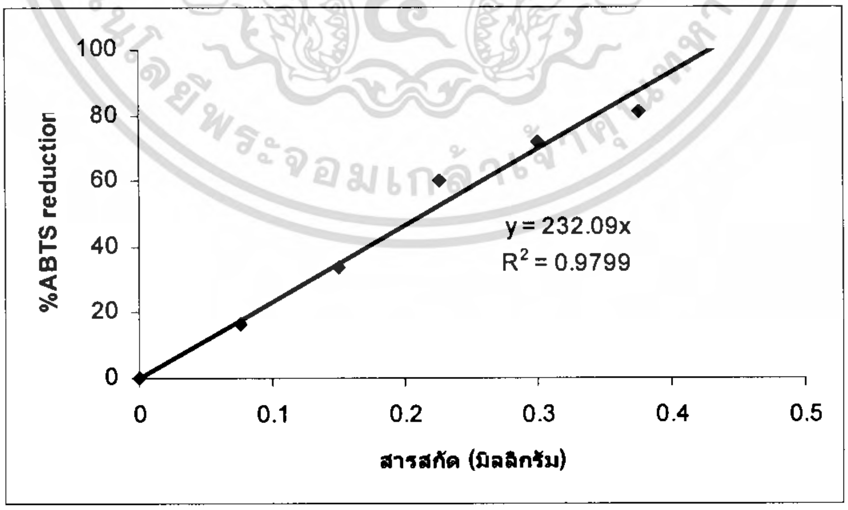
สภาวะ	สูตรอาหาร	สารสกัด (มก.)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร			เฉลี่ย	%ABTS reduction
			1	2	3		
แสง	MS + NAA 1.0 มก/ล	0.000	1.112	1.113	1.117	1.114	0.00
		0.075	0.953	0.922	0.928	0.9343	15.44
		0.150	0.745	0.718	0.691	0.7180	35.02
		0.225	0.304	0.348	0.374	0.3420	69.05
		0.300	0.235	0.205	0.145	0.1950	82.35
		0.375	0.117	0.112	0.102	0.1103	90.02
		0.450	0.044	0.036	0.040	0.0400	96.38
		0.525	0.021	0.023	0.020	0.0213	98.07
		0.600	0.015	0.015	0.016	0.0153	98.61
		0.675	0.003	0.006	0.001	0.0033	99.70
		0.750	0.002	0.008	0.004	0.0047	99.58



รูปที่ 4.22 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ ABTS ที่ลดลง ต่อสารสกัดรากหม่อนในสูตรอาหาร MS ที่เติมสาร NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาวะที่ให้แสง

ตารางที่ 4.47 แสดงปริมาณของสารสกัดรากหม่อนในอาหารสูตร MS สภาวะที่ไม่ให้แสง กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร และค่าเปอร์เซ็นต์ ABTS ที่ลดลง

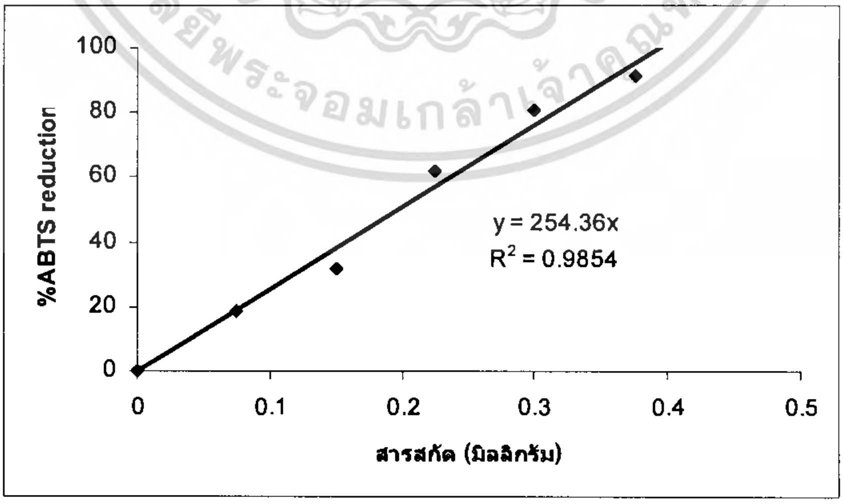
สภาวะ	สูตรอาหาร	สารสกัด (มก.)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร			เฉลี่ย	%ABTS reduction
			1	2	3		
ไม่ให้แสง	MS	0.000	1.112	1.113	1.117	1.114	0.00
		0.075	0.923	0.942	0.932	0.9323	16.31
		0.150	0.740	0.722	0.758	0.7400	33.57
		0.225	0.419	0.448	0.467	0.4447	60.08
		0.300	0.289	0.310	0.336	0.3117	72.02
		0.375	0.189	0.198	0.244	0.2103	81.12
		0.450	0.118	0.153	0.150	0.1403	87.40
		0.525	0.066	0.074	0.090	0.0767	93.12
		0.600	0.049	0.040	0.063	0.0507	95.45
		0.675	0.015	0.020	0.036	0.0237	97.88
		0.750	0.017	0.015	0.011	0.0143	98.71



รูปที่ 4.23 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ ABTS ที่ลดลง ต่อสารสกัดรากหม่อนในสูตรอาหาร MS สภาวะที่ไม่ให้แสง

ตารางที่ 4.48 แสดงปริมาณของสารสกัดรากหม่อนในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สภาวะที่ไม่ให้แสงกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร และค่าเปอร์เซ็นต์ ABTS ที่ลดลง

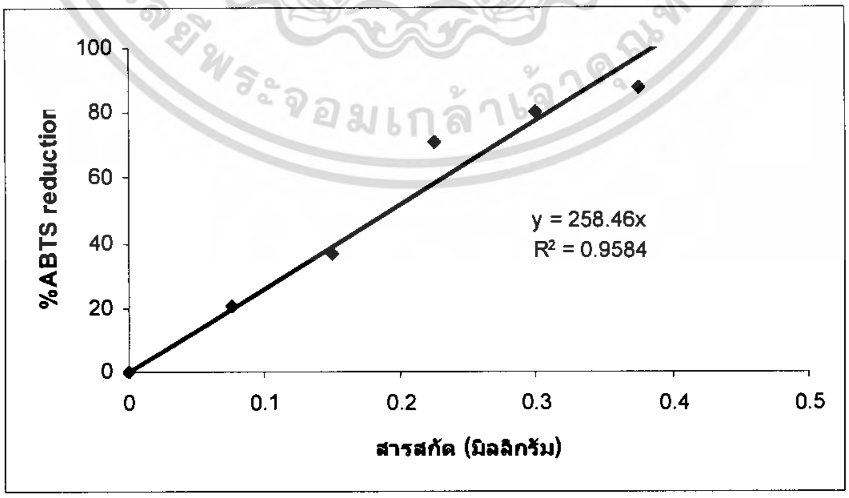
สภาวะ	สูตรอาหาร	สารสกัด (มก.)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร			เฉลี่ย	%ABTS reduction
			1	2	3		
ไม่ให้แสง	MS + NAA 0.1 มก/ล	0.000	1.112	1.113	1.117	1.114	0.00
		0.075	0.911	0.891	0.907	0.9030	18.94
		0.150	0.760	0.795	0.721	0.7587	31.90
		0.225	0.409	0.421	0.446	0.4253	61.82
		0.300	0.248	0.212	0.179	0.2130	80.88
		0.375	0.078	0.097	0.109	0.0947	91.50
		0.450	0.048	0.050	0.043	0.0470	95.78
		0.525	0.026	0.022	0.033	0.0270	97.58
		0.600	0.007	0.014	0.009	0.0100	99.10
		0.675	0.015	0.004	0.005	0.0080	99.28
		0.750	0.001	0.014	0.007	0.0073	99.34



รูปที่ 4.24 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ ABTS ที่ลดลง ต่อสารสกัดรากหม่อนในสูตรอาหาร MS ที่เติมสาร NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาวะที่ไม่ให้แสง

ตารางที่ 4.49 แสดงปริมาณของสารสกัดรากหม่อนในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สภาวะที่ไม่ให้แสงกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร และค่าเปอร์เซ็นต์ ABTS ที่ลดลง

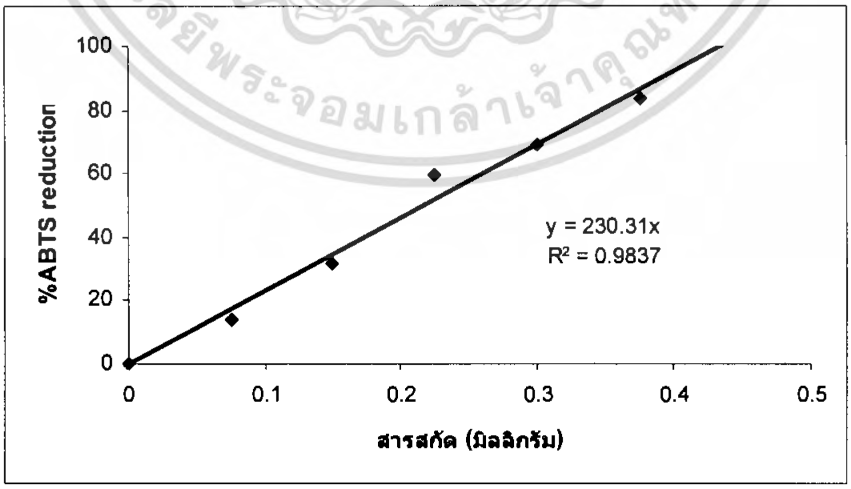
สภาวะ	สูตรอาหาร	สารสกัด (มก.)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร			เฉลี่ย	%ABTS reduction
			1	2	3		
ไม่ให้แสง	MS + NAA 0.5 มก/ล	0.000	1.112	1.113	1.117	1.114	0.00
		0.075	0.873	0.901	0.875	0.8830	20.74
		0.150	0.657	0.736	0.726	0.7063	36.59
		0.225	0.343	0.326	0.300	0.3230	71.01
		0.300	0.207	0.249	0.209	0.2217	80.10
		0.375	0.114	0.144	0.151	0.1363	87.76
		0.450	0.044	0.068	0.058	0.0567	94.91
		0.525	0.023	0.013	0.022	0.0193	98.26
		0.600	0.003	0.014	0.003	0.0067	99.40
		0.675	0.002	0.004	0.008	0.0047	99.58
		0.750	0.013	0.005	0.013	0.0103	99.07



รูปที่ 4.25 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ ABTS ที่ลดลง ต่อสารสกัดรากหม่อนในสูตรอาหาร MS ที่เติมสาร NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาวะที่ไม่ให้แสง

ตารางที่ 4.50 แสดงปริมาณของสารสกัดรากหม่อนในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สภาวะที่ไม่ให้แสงกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร และค่าเปอร์เซ็นต์ ABTS ที่ลดลง

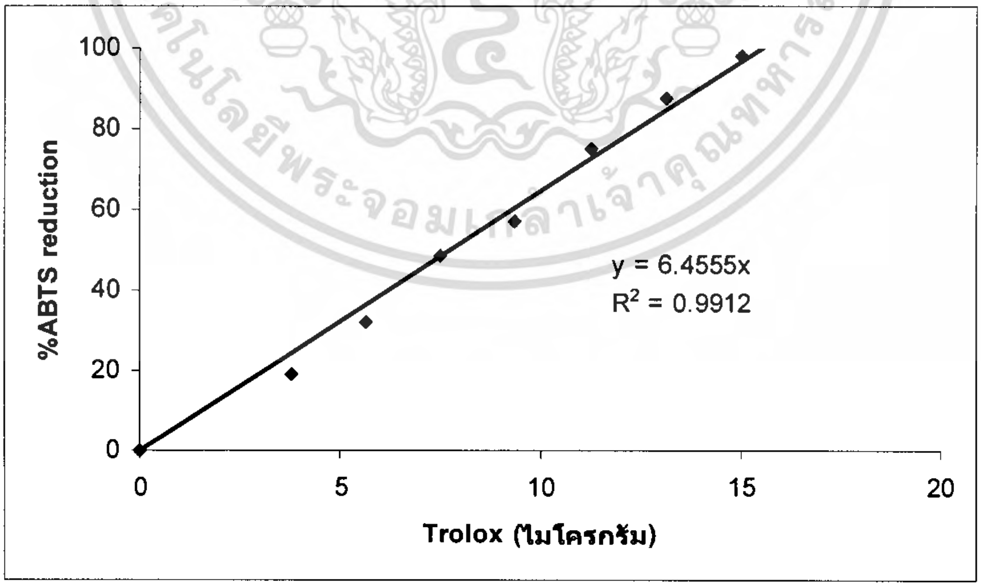
สภาวะ	สูตรอาหาร	สารสกัด (มก.)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร			เฉลี่ย	%ABTS reduction
			1	2	3		
ไม่ให้แสง	MS + NAA 1.0 มก/ล	0.000	1.112	1.113	1.117	1.114	0.00
		0.075	0.945	0.955	0.947	0.9490	14.12
		0.150	0.714	0.824	0.734	0.7573	31.46
		0.225	0.451	0.454	0.435	0.4467	59.58
		0.300	0.308	0.301	0.410	0.3397	69.26
		0.375	0.174	0.178	0.197	0.1830	83.44
		0.450	0.105	0.134	0.111	0.1167	89.44
		0.525	0.061	0.063	0.071	0.0650	94.12
		0.600	0.056	0.061	0.036	0.0510	95.38
		0.675	0.018	0.019	0.028	0.0217	98.04
		0.750	0.020	0.010	0.012	0.0140	98.73



รูปที่ 4.26 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ ABTS ที่ลดลง ต่อสารสกัดรากหม่อนในสูตรอาหาร MS ที่เติมสาร NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาวะที่ไม่ให้แสง

ตารางที่ 4.51 แสดงปริมาณสารละลาย Trolox กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร และค่าเปอร์เซ็นต์ ABTS ที่ลดลง

สาร Trolox (ไมโครกรัม)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร			เฉลี่ย	%ABTS reduction
	1	2	3		
0.00000	1.112	1.113	1.117	1.114	0.00
3.75450	0.906	0.913	0.861	0.8933	19.16
5.63175	0.738	0.767	0.744	0.7497	32.16
7.50900	0.570	0.552	0.591	0.5710	48.33
9.38625	0.483	0.472	0.475	0.4767	56.86
11.26350	0.305	0.304	0.215	0.2747	75.14
13.14075	0.138	0.145	0.136	0.1397	87.36
15.01800	0.008	0.018	0.035	0.0203	98.16
16.89525	0.004	0.003	0.002	0.0030	99.73
18.77250	0.003	0.015	0.015	0.0110	99.00
20.64975	0.003	0.003	0.001	0.0023	99.79



รูปที่ 4.27 แสดงกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณสาร Trolox ต่อค่าค่าเปอร์เซ็นต์ ABTS ที่ลดลง

ตารางที่ 4.52 แสดงค่า IC_{50} ของ ABTS จากสารสกัดรากหม่อนในอาหารสูตรและสภาวะต่างๆ กัน

สารสกัดจากรากหม่อน เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ	IC_{50} ของวิธี ABTS (มิลลิกรัมของสารสกัด)	
	แสง	ไม่ให้แสง
MS	0.199	0.215
MS + NAA 0.1 มก/ล	0.153	0.197
MS + NAA 0.5 มก/ล	0.156	0.193
MS + NAA 1.0 มก/ล	0.192	0.217
สารละลาย Trolox	0.0078	

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองเพาะเลี้ยงรากหม่อนเพื่อผลิตสารต้านอนุมูลอิสระ โดยการทดลองหาสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรากหม่อน มีอาหารเพาะเลี้ยงที่ใช้ 4 สูตร คือ อาหารสูตร MS, อาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร, อาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเพาะเลี้ยงใน 2 สภาวะ คือ การเพาะเลี้ยงในสภาวะให้แสงและไม่ให้แสง โดยทำการวัดการเจริญ ทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 35 วัน พบว่ารากหม่อนมีการเจริญสูดสุดหรือความยาวรากสูงสุดในวันที่ 35 ของการทดลอง โดยในสูตรอาหาร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงรากหม่อนในสภาวะให้แสงมีดัชนีความยาวรากมากที่สุดเท่ากับ 15.67±1.644 ($p \leq 0.05$) แต่ในอาหารที่มีการเติม NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร กลับทำให้มีค่าดัชนีความยาวรากลดลงและในอาหารที่เติม NAA ทุกความเข้มข้นพบว่าแสงไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตโดยพบว่ารากที่เพาะเลี้ยงในที่มีแสงและไม่มีแสงมีความยาวรากใกล้เคียงกันที่ NAA ความเข้มข้นเดียวกันแต่แสงมีอิทธิพลต่อการเจริญของรากในกรณีที่ในอาหารไม่มี NAA โดยพบว่ารากที่เจริญในที่ไม่มีแสงมีความยาวรากมากกว่าในที่มีแสงอย่างชัดเจน

ส่วนการวัดการเจริญด้วยน้ำหนักรากหม่อนแห้ง พบว่ารากหม่อนมีการเจริญสูดสุดหรือน้ำหนักรากแห้งสูงสุดในวันที่ 35 ของการทดลอง โดยในสูตรอาหาร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงรากหม่อนในสภาวะให้แสงมีดัชนีน้ำหนักรากแห้งมากที่สุดเท่ากับ 39.31±3.489 ($p \leq 0.05$) แต่ในอาหารที่มีการเติม NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร กลับทำให้มีค่าดัชนีน้ำหนักรากแห้งลดลงและในอาหารที่เติม NAA ทุกความเข้มข้นพบว่าแสงไม่มีผลต่อการเจริญเติบโต แต่แสงมีอิทธิพลต่อการเจริญของรากในกรณีที่ในอาหารไม่มี NAA โดยรากที่เจริญในที่ไม่มีแสงมีน้ำหนักแห้งมากกว่าในที่มีแสงอย่างชัดเจน ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับผลของความยาวราก

การวัดปริมาณน้ำตาลที่เหลือในอาหารเพาะเลี้ยงรากหม่อน พบว่าวันที่ 0 มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 17.59 มิลลิกรัม แต่ปริมาณน้ำตาลถูกใช้หมดในวันที่ 35 ของการทดลองในทุกสูตรอาหารยกเว้น สูตรอาหาร MS ที่ยังเหลือน้ำตาล 2.89 มิลลิกรัม ผลที่ได้มีความสอดคล้องกับการเจริญของรากโดยรากมีการเจริญสูงสุดในวันที่ 35 ของการทดลองและน้ำตาลถูกใช้หมดในวันที่ 35 ของการทดลองเช่นกันเพราะน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนที่พืชใช้ในการเจริญ เติบโต

การหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดรากหม่อน ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu พบว่าค่าฟีนอลิกสูงสุดในอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาวะที่ให้แสง มีค่า 2.31±0.074 ไมโครกรัมของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมสารสกัด ($p \leq 0.05$)

การทดสอบคุณสมบัติสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH สารสกัดที่มีค่า IC_{50} ต่ำสุดหรือปริมาณสารสกัดน้อยสุดที่สามารถลดปริมาณ DPPH ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ คือสารสกัดรากหม่อนที่เลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และสูตรอาหาร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาวะให้แสง และสูตรอาหาร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาวะไม่ให้แสง มีค่า 0.317, 0.317 และ 0.320 มิลลิกรัมของสารสกัดตามลำดับ โดยสารละลาย Trolox มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.016 มิลลิกรัมของ Trolox

การทดสอบคุณสมบัติสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS สารสกัดที่มีค่า IC_{50} ต่ำสุดหรือปริมาณสารสกัดน้อยสุดที่สามารถลดปริมาณ ABTS ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ คือสารสกัดรากหม่อนที่เลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และสูตรอาหาร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาวะให้แสง มีค่า 0.153 และ 0.156 มิลลิกรัมของสารสกัดตามลำดับ โดยสารละลาย Trolox มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.0078 มิลลิกรัมของ Trolox ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับผลของวิธี DPPH

เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2523. เอกสารวิชาการ หม่อนไหม เล่มที่ 2. กรุงเทพฯ : งานทะเบียนและประมวลสถิติแผนงาน.

คำนูณ กาญจนภูมิ. 2542. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พนา โลหะทรัพย์ทวี. 2548. ปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพของพืช. โครงการตำราคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

วันดี กฤษณพันธ์. 2536. เภสัชวินิจฉัย-ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ เล่ม 1. พิมพ์ครั้งที่ 2 . กรุงเทพฯ : ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

วิโรจน์ แก้วเรือง. 2543. ชาหม่อน. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย.

ศิวาพร ศิวเวชช. 2535. วัตถุเจือปนอาหารในผลิตภัณฑ์อาหาร. กรุงเทพฯ: ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Arabshahi-Delouee, S., Devi, D.V. and Urooj, A. 2007. Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. *Journal of Food Chemistry* 102 : 1233-1240

Arnao, M.B., Cano, A., Acosta, M. 2001. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Journal of Food Chemistry* 73 : 239-244.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensmittel Wissenschaftund Technologie 28 : 25-30.

Bravo, L. 1998. Polyphenols: Chemistry Sources, Metabolism and Nutritional significance. *Nutrition Reviews* 56 : 317-323.

Bose, P.C. 1989. Genetic resources of mulberry and utilization. CSR and TI : 183–190.

Cosgrove, J.P., Church, D.F. and Pryor, W.A. 1987. The kinetics of the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. *Lipids* 22 : 299–304.

Dillard, C.J. and German, J.B. 2000. Phytochemicals: nutraceuticals and human health. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80 : 1744–1756.

Farag, R.S., Badei, A.Z.M.A. and El Baroty, G.S.A. 1989. Influence of thyme and clove essential oils on cottonseed oil oxidation. *Journal of American Oil Chemists'Society* 66 : 800–804.

Gazzani, G., Papetti, A., Massolini, G. and Daglia, M. 1998. Antioxidative and pro-oxidant

activity of water soluble components of some common diet vegetables and the effect of thermal treatment. *Food Chemistry* 6 : 4118–4122.

Gordor, M.H. 1990. The mechanism of antioxidant action in vitro. *Food antioxidants* : 1-18.

Kahkonen, M.P., Hopia, A.I., Vuorela, H.J., Rauha, J.P., Pihlaja, K. and Kujala, T.S. 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47 : 3954-3962.

Katsube, T., Imawaka, N., Kawano, Y., Yamazaki, Y., Shiwaku. and Yamane Y. 2006. Antioxidant flavonol glycosides in mulberry (*Morus alba* L.) leaves isolated based on LDL antioxidant activity. *Journal of Food Chemistry* 97 : 25-31

Kelkar, S.M., Bapat, V.A., Ganapathi, T.R., Kaklig, G.S., Rao, P.S. and Heble, M.R. 1996. Determination of hypoglycemic activity in *Morus indica* L. (mulberry) shoot cultures. *Current Science* 71 : 71–72.

Namiki, M. 1990. Antioxidants/antimutagens in foods. Critical Reviews in *Food Science and Nutrition* 20: 273–300.

Pokorny, I. 2001. Antioxidants in food. In : Practical application. USA : CRC press.

Sastri, B.N. 1962. The wealth of India, raw materials. Council of Scientific and Industrial Research : 429–439.

Shukla, V.K.S., Wanasundara, P.K.J.P.D. and Shahidi, F. 1997. Natural antioxidants from oilseeds. In: F. Shahidi, Editor. *Natural antioxidants chemistry, health effects and applications*, AOCS Press, Champaigu, IL : 97–132.

Zhishen, J., Mengcheng, T. and Jianming, W. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Journal of Food Chemistry* 64 : 555–559.

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2548. หม่อน. [Online].Available: http://www.moac.go.th/builder/mu/index.php?page=414&clicksub=414&sub=124

จักรพงศ์ ไพบูลย์. 2543. สารต้านอนุมูลอิสระ Antioxidant. [Online].Available: http://www.thaiclinic.com/antioxidant.html

นงนภัส ดวงดี. 2551. สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant). [Online].Available: http://www.dss.go.th/dssweb/st-articles/files/cp_2_2551_Antioxidant.pdf

พงศ์ยุทธ นวลบุญเรือง. 2550. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. [Online].Available:

http://gotoknow.org/blog/tissueculture/123585

พรทิพย์ วิรัชวงศ์. 2550. อนุมูลอิสระ และสารต้านอนุมูลอิสระ. [Online].Available: http://www.gpo.or.th/rdi/html/antioxidants.html

Marc, Leduc. 2006. Free radicals and your health. [Online].Available: http://www.healingdaily.com/conditions/free-radicals.htm

Wikipedia. 2007. Antioxidant. [Online].Available: http://en.wikipedia.org/wiki/Antioxidant

ภาคผนวก ก

1. สูตรอาหาร Murashige and Skoog medium (MS) (1962)

สารเคมีที่ใช้ในปริมาณมิลลิกรัมต่อลิตร

แอมโมเนียมไนเตรต	NH_4NO_3	1650
แคลเซียมคลอไรด์	$CaC_{12}.2H_2O$	440
แมกนีเซียมซัลเฟต	$MgSO_4.7H_2O$	370
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	KH_2PO_4	170
โปแตสเซียมไนเตรต	KNO_3	1900
บอริคแอซิด	H_3BO_3	6.20
โคบอลคลอไรด	$CoC_{12}.6H_2O$	0.025
คอปเปอร์ซัลเฟต	$CuSO_4.5H_2O$	0.025
แมงกานีสซัลเฟต	$MnSO_4.4H_2O$	22.30
โปแตสเซียมไอโอไดด์	KI	0.83
โซเดียมโมลิปเดต	$NaMoO_4.2H_2O$	0.25
ซิงซัลเฟต	$ZnSO_4.4H_2O$	8.60
โซเดียม อีดีทีเอ	Na_2-EDTA	37.30
เฟอรัสซัลเฟต	$FeSO_4.7H_2O$	27.80
ไกลซีน	Glycine	2
มีโออิโนซิตอล	Myo-inositol	100
นิโคนินิคแอซิค	Nicotinic acid	0.50
ไพรีดอกซีน	Pyridoxine	0.50
ไทอามีน	Thiamine	0.10

ภาคผนวก ข

1. ข้อมูลความยาวรากหม่อนที่เลี้ยงในอาหารสูตรและสภาวะต่างๆ

แสดงข้อมูลในตารางที่ ข-1

ตารางที่ ข-1 แสดงความยาวรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในอาหารและสภาวะสูตรๆ ที่เป็นทุกๆ 7 วันเป็นเวลา 35 วัน

สภาวะ	สูตรอาหาร (มิลลิกรัมต่อลิตร)	วันที่	ซ้ำ	ความยาวราก (เซนติเมตร)										เฉลี่ย
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
แสง	MS	0	1	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.00
			2	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.00
			3	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.00
		7	1	2.0	2.5	3.0	3.0	3.0	2.3	2.0	3.0	2.0	2.0	2.48
			2	3.3	2.5	2.8	2.0	2.0	2.7	2.0	2.2	2.0	2.0	2.35
			3	4.0	2.0	2.0	3.5	2.0	2.0	2.0	2.0	2.5	2.0	2.40
		14	1	4.0	2.0	2.0	2.0	3.0	2.0	3.0	4.0	3.2	2.0	2.72
			2	3.5	2.5	5.1	2.8	2.0	2.0	2.0	3.2	2.2	2.5	2.78
			3	2.5	4.2	3.5	3.5	2.5	3.0	2.0	3.5	2.5	2.0	2.92
		21	1	2.0	2.2	3.0	3.2	2.0	2.0	4.0	3.0	6.8	2.0	3.02
			2	3.2	4.5	4.6	5.6	3.9	2.5	3.0	3.2	2.0	2.0	3.45
			3	5.6	2.0	2.0	2.0	2.3	4.0	5.0	2.5	8.6	2.0	3.60
		28	1	3.5	3.6	5.5	4.1	6.1	3.5	4.0	6.0	10.2	7.3	5.38
			2	6.7	7.0	6.2	4.4	4.0	4.0	4.5	3.5	5.1	2.0	4.74
			3	9.8	7.2	5.0	7.0	4.3	2.5	6.2	2.0	2.2	4.2	5.04
		35	1	13.5	5.0	9.0	11.0	13.0	12.5	13.0	16.0	12.5	10.0	11.55
			2	10.0	10.0	7.0	10.2	8.5	8.5	8.0	4.3	8.0	7.5	8.20
			3	12.0	8.2	8.5	10.0	10.0	12.0	12.0	7.5	8.0	10.0	9.82

สภาวะ	สูตรอาหาร	วันที่	ซ้ำ	ความยาวราก (เซนติเมตร)										เฉลี่ย
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
แสง	MS + NAA 0.1 มก/ล	7	1	3.0	3.0	3.0	3.0	2.5	2.5	2.5	2.0	2.0	2.0	2.55
			2	3.0	3.0	3.4	2.5	3.0	2.0	2.0	3.0	4.0	3.2	2.91
			3	2.5	3.0	3.0	3.6	2.0	3.3	3.1	4.5	2.0	2.8	2.98
		14	1	4.0	6.8	7.2	4.7	7.0	10.3	7.0	7.0	3.2	9.0	6.62
			2	4.0	4.7	2.0	3.2	3.8	4.0	3.2	5.5	9.0	7.0	4.64
			3	7.0	11.0	6.3	9.3	10.0	8.5	8.3	6.0	8.5	11.0	8.59
		21	1	11.1	12.8	17.6	8.6	8.5	10.7	13.0	13.7	9.7	11.2	11.69
			2	10.0	17.5	14.2	15.1	13.9	13.3	17.6	13.5	15.2	14.2	14.45
			3	14.2	11.1	18.1	16.4	13.0	14.0	13.5	8.0	9.0	17.3	13.46
		28	1	23.2	19.0	11.0	16.5	18.0	15.5	17.3	16.0	16.3	25.0	17.78
			2	11.3	23.2	26.0	16.0	13.0	15.5	12.3	12.5	21.0	22.5	17.33
			3	18.0	15.0	14.0	21.0	19.0	8.2	11.0	12.5	21.0	23.0	16.27
		35	1	28.0	29.0	21.5	26.5	28.0	23.0	22.0	24.5	27.0	26.0	25.55
			2	30.0	19.0	31.0	26.0	26.0	27.0	28.5	28.0	23.0	39.0	27.75
			3	35.0	33.0	35.0	32.0	25.0	30.0	30.0	27.0	37.0	36.0	32.00

สภาวะ	สูตรอาหาร	วันที่	ซ้ำ	ความยาวราก (เซนติเมตร)										เฉลี่ย
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
แสง	MS + NAA 0.5 มก/ล	7	1	2.7	2.7	3.5	2.5	3.9	3.9	3.0	3.1	3.2	2.7	3.12
			2	2.6	2.8	3.0	2.7	2.7	2.8	3.1	3.0	2.7	2.7	2.81
			3	3.4	3.2	3.0	3.0	3.2	2.7	3.1	2.8	3.0	3.0	3.04
		14	1	9.5	7.0	8.0	7.5	5.5	10.3	8.0	6.5	6.0	7.0	7.53
			2	7.0	9.0	6.5	6.5	7.3	7.0	5.5	6.5	5.0	6.0	6.63
			3	5.0	9.0	10.5	8.0	3.0	5.0	5.0	7.0	6.0	10.0	6.85
		21	1	15.5	17.6	17.5	14.4	14.5	17.5	17.6	15.6	15.5	16.5	16.22
			2	16.5	12.0	12.0	11.0	17.0	17.2	12.2	14.0	11.0	13.5	13.64
			3	15.5	12.5	17.5	14.0	15.5	11.5	11.5	12.3	13.0	11.5	13.48
		28	1	23.0	23.0	25.0	22.5	21.0	19.5	23.0	20.0	22.0	22.0	22.10
			2	28.0	26.0	23.5	27.0	23.5	22.0	23.0	26.0	23.0	26.0	24.80
			3	28.0	22.0	23.0	17.0	28.0	23.0	23.0	24.0	24.0	22.0	23.40
		35	1	41.0	30.0	37.0	33.0	35.0	24.0	43.0	34.0	42.0	39.0	35.80
			2	38.0	34.0	37.0	36.0	28.0	32.0	32.0	35.0	35.0	39.0	34.60
			3	28.0	31.0	32.0	27.0	28.0	32.0	27.0	30.0	28.0	33.0	29.60

สภาวะ	สูตรอาหาร	วันที่	ซ้ำ	ความยาวราก (เซนติเมตร)										เฉลี่ย
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
แสง	MS + NAA 1.0 มก/ล	7	1	2.0	2.0	2.0	2.0	2.5	2.8	2.0	2.3	2.8	2.5	2.29
			2	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.00
			3	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.5	3.0	2.15
		14	1	8.0	12.0	12.0	9.0	8.0	4.0	5.0	5.0	7.0	5.0	7.50
			2	3.0	4.5	6.0	5.0	4.0	7.0	5.0	4.0	5.0	6.0	4.95
			3	4.0	8.0	6.0	8.0	6.0	6.0	6.0	3.0	4.0	4.0	5.50
		21	1	9.0	13.0	10.0	15.0	13.0	10.0	12.0	11.0	8.0	14.0	11.50
			2	13.0	10.0	11.0	9.0	14.0	10.0	8.0	10.0	6.0	11.0	10.20
			3	11.0	12.0	15.0	13.0	10.0	15.0	11.0	16.0	12.0	12.0	12.70
		28	1	20.0	16.0	18.0	14.0	17.0	16.0	18.0	19.0	14.0	20.0	17.20
			2	21.0	22.0	16.0	22.0	20.0	17.0	20.0	17.0	17.0	23.0	19.50
			3	16.0	15.0	19.0	15.0	18.0	12.0	16.0	17.0	14.0	16.0	15.80
		35	1	20.0	25.0	22.0	24.0	23.0	27.0	27.0	28.0	22.0	24.0	24.20
			2	17.0	23.0	23.0	21.0	23.0	25.0	21.0	22.0	29.0	20.0	22.40
			3	18.0	22.0	21.0	25.0	23.0	19.0	20.0	24.0	21.0	20.0	21.30

สภาวะ	สูตรอาหาร	วันที่	ซ้ำ	ความยาวราก (เซนติเมตร)										เฉลี่ย
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
ไม่ให้แสง	MS	0	1	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.00
			2	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.00
			3	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.00
		7	1	2.5	2.5	2.0	2.0	2.5	3.0	2.0	2.3	2.0	2.5	2.33
			2	5.0	3.5	5.8	2.3	2.0	2.0	3.0	4.0	2.0	2.0	3.16
			3	3.5	3.0	2.0	2.0	2.5	2.5	2.0	2.0	2.0	2.0	2.35
		14	1	2.7	7.5	5.0	5.6	6.0	6.0	4.4	3.7	2.2	8.0	5.11
			2	3.1	6.0	2.7	4.0	2.5	4.4	3.5	6.0	4.7	4.0	4.09
			3	2.0	7.4	2.9	2.0	8.8	2.5	2.0	9.0	2.0	2.0	4.06
		21	1	9.0	8.5	9.0	11.5	10.0	9.5	7.0	9.0	11.5	9.0	9.40
			2	5.0	7.0	5.3	2.5	3.0	5.0	8.0	9.6	12.0	7.5	6.49
			3	8.0	7.3	10.0	6.0	7.0	6.2	8.6	5.2	10.0	9.0	7.73
		28	1	7.0	10.0	13.0	11.0	13.0	7.5	14.0	9.0	15.5	18.0	11.80
			2	9.0	8.0	7.0	12.5	11.0	7.4	8.3	7.0	10.0	10.5	9.07
			3	10.0	7.0	9.0	5.0	10.4	9.0	7.4	9.0	8.0	12.0	8.68
		35	1	19.0	13.5	15.0	14.0	16.0	17.0	18.0	15.0	14.5	18.0	16.00
			2	15.0	12.0	9.3	9.0	10.3	10.0	13.5	15.0	19.0	12.0	12.51
			3	13.0	13.2	13.7	10.5	15.0	15.0	17.0	12.0	12.0	14.7	13.61

สภาวะ	สูตรอาหาร	วันที่	ซ้ำ	ความยาวราก (เซนติเมตร)										เฉลี่ย
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
ไม่ให้แสง	MS + NAA 0.1 มก/ล	7	1	4.0	5.5	3.5	4.5	4.0	4.0	5.0	2.5	4.0	6.5	4.35
			2	7.5	4.0	7.2	5.3	2.5	5.0	6.3	4.0	8.5	2.3	5.26
			3	2.0	6.2	4.5	3.5	7.0	4.0	4.0	5.3	4.0	2.0	4.25
		14	1	13.0	14.0	7.6	13.0	14.0	10.8	12.5	11.0	16.0	20.0	13.19
			2	9.5	14.5	9.5	10.0	8.0	17.0	6.0	16.0	10.0	16.5	11.70
			3	14.0	10.0	8.0	9.0	6.0	6.0	7.0	6.0	6.5	11.0	8.35
		21	1	22.0	12.3	17.0	17.0	12.0	15.0	5.5	19.0	11.2	12.0	14.30
			2	19.5	12.0	27.0	23.0	18.0	22.0	23.0	17.0	25.0	31.0	21.75
			3	20.0	28.0	39.0	31.0	22.0	24.0	20.0	12.0	22.0	32.0	25.00
		28	1	23.0	23.2	22.0	23.5	24.8	20.2	28.0	23.0	26.0	24.2	23.79
			2	17.0	35.0	31.0	19.0	21.0	21.0	19.0	18.0	20.0	17.5	21.85
			3	37.0	26.0	32.0	22.0	35.5	23.5	23.0	23.0	22.0	23.0	26.70
		35	1	30.0	25.0	27.0	27.0	27.0	30.0	24.0	27.0	28.0	36.0	28.10
			2	32.0	24.0	21.0	27.0	25.0	26.0	27.0	25.0	23.0	32.0	26.20
			3	33.0	26.0	30.0	36.0	35.0	27.0	23.0	27.0	29.0	36.0	30.20

สภาวะ	สูตรอาหาร	วันที่	ซ้ำ	ความยาวราก (เซนติเมตร)										เฉลี่ย
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
ไม่ให้แสง	MS + NAA 0.5 มก/ล	7	1	2.0	2.5	2.7	3.0	3.0	3.2	2.0	2.0	2.0	4.0	2.64
			2	2.0	2.0	2.0	2.0	2.5	2.5	2.0	2.0	2.0	2.0	2.10
			3	2.0	2.0	2.5	4.0	2.5	2.7	2.0	2.0	2.0	2.0	2.37
		14	1	9.0	11.0	8.0	7.0	10.0	10.0	7.0	12.0	8.0	10.0	9.20
			2	8.0	8.0	8.5	15.0	9.0	9.5	9.0	13.0	10.0	10.0	10.00
			3	13.0	13.0	11.0	12.0	12.0	8.5	10.0	15.0	11.0	13.0	11.85
		21	1	22.0	28.0	20.0	20.0	15.0	17.0	18.0	29.0	27.0	28.0	22.40
			2	28.0	17.0	25.0	14.0	17.0	22.0	20.0	25.0	20.0	20.0	20.80
			3	24.0	23.0	21.0	20.0	19.0	18.0	21.0	23.0	25.0	18.0	21.20
		28	1	28.0	33.0	27.0	24.0	29.0	24.0	22.0	28.0	23.0	26.0	26.40
			2	28.0	28.0	24.0	26.0	26.0	27.0	24.0	24.0	22.0	25.0	25.40
			3	24.0	26.0	26.0	24.0	20.0	23.0	28.0	22.0	23.0	20.0	23.60
		35	1	36.0	33.0	27.0	25.0	30.0	32.0	26.0	27.0	29.0	26.0	29.10
			2	33.0	36.0	32.0	32.0	28.0	32.0	30.0	30.0	33.0	36.0	32.20
			3	29.0	32.0	31.0	27.0	36.0	29.0	30.0	29.0	26.0	31.0	30.00

สภาวะ	สูตรอาหาร	วันที่	ซ้ำ	ความยาวราก (เซนติเมตร)										เฉลี่ย
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
ไม่ให้แสง	MS + NAA 1.0 มก/ล	7	1	2.0	2.5	2.8	4.0	2.0	2.5	3.5	3.0	3.0	3.5	2.88
			2	3.5	2.0	2.5	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.20
			3	2.0	2.0	2.5	4.0	2.0	2.5	2.0	2.0	3.0	2.0	2.40
		14	1	3.0	3.0	7.0	3.5	3.0	6.0	7.0	7.0	3.0	4.0	4.65
			2	7.0	5.0	9.0	6.0	8.0	7.0	12.0	6.0	6.0	8.0	7.40
			3	11.0	7.0	10.0	5.0	12.0	8.0	9.0	8.0	10.0	7.0	8.70
		21	1	9.0	14.0	10.0	11.0	10.0	14.0	13.0	9.0	13.0	12.0	11.50
			2	13.0	10.0	9.0	8.0	13.0	14.0	9.0	8.0	8.0	13.0	10.50
			3	17.0	16.0	16.0	13.0	14.0	14.0	17.0	12.0	12.0	15.0	14.60
		28	1	15.0	18.0	12.0	20.0	23.0	20.0	15.0	17.0	17.0	19.0	17.60
			2	20.0	15.0	16.0	18.0	15.0	17.0	19.0	14.0	21.0	18.0	17.30
			3	15.0	18.0	15.0	16.0	22.0	17.0	21.0	14.0	16.0	14.0	16.80
		35	1	23.0	17.0	16.0	23.0	26.0	21.0	14.0	19.0	23.0	18.0	20.00
			2	22.0	22.0	26.0	27.0	23.0	20.0	25.0	22.0	22.0	23.0	23.20
			3	24.0	26.0	20.0	20.0	20.0	23.0	18.0	18.0	20.0	20.0	20.90

ภาคผนวก ค

1. ปริมาณน้ำตาลที่เหลือในอาหารเพาะเลี้ยงรากหม่อนในสูตรอาหารและสภาวะต่างๆ

แสดงข้อมูลทั้งหมดในตารางที่ ค-1

ตารางที่ ค-1 แสดงปริมาณน้ำตาลที่เหลือของอาหารเพาะเลี้ยงในอาหารและสภาวะสูตรๆ ที่เป็นทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 35 วัน

สภาวะ	สูตรอาหาร	วันที่	ซ้ำ	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร			เฉลี่ย	เฉลี่ยรวม	ปริมาณน้ำตาลจากกราฟ (มิลลิกรัม)	ปริมาณอาหารที่ใช้ (ไมโครลิตร)	ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
				1	2	3					
แสง	MS	0	1	1.009	1.002	1.004	1.0050	1.0046	0.0880	5	17.59
			2	1.000	1.006	1.003	1.0030				
			3	1.006	1.009	1.002	1.0057				
		7	1	0.78	0.757	0.773	0.7700	0.8129	0.0712	5	14.24
			2	0.878	0.857	0.786	0.8403				
			3	0.796	0.848	0.841	0.8283				
		14	1	0.585	0.574	0.539	0.5660	0.5792	0.0507	5	10.14
			2	0.652	0.608	0.595	0.6183				
			3	0.599	0.526	0.535	0.5533				
		21	1	0.832	0.862	0.854	0.8493	0.8497	0.0744	10	7.44
			2	0.795	0.862	0.853	0.8367				
			3	0.895	0.842	0.852	0.8630				
		28	1	0.524	0.556	0.542	0.5407	0.5532	0.0484	10	4.84
			2	0.523	0.623	0.536	0.5607				
			3	0.604	0.539	0.532	0.5583				
		35	1	0.356	0.324	0.329	0.3363	0.3299	0.0289	10	2.89
			2	0.360	0.321	0.330	0.3370				
			3	0.289	0.336	0.324	0.3163				

สภาวะ	สูตรอาหาร	วันที่	ซ้ำ	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร			เฉลี่ย	เฉลี่ยรวม	ปริมาณน้ำตาลจากกราฟ (มิลลิกรัม)	ปริมาณอาหารที่ใช้ (ไมโครลิตร)	ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
				1	2	3					
แสง	MS + NAA 0.1 มก/ล	7	1	0.556	0.529	0.690	0.5917	0.5742	0.0503	5	10.06
			2	0.628	0.555	0.487	0.5567				
			3	0.599	0.535	0.589	0.5743				
		14	1	0.386	0.387	0.403	0.3920	0.3694	0.0324	5	6.47
			2	0.226	0.230	0.214	0.2233				
			3	0.492	0.482	0.505	0.4930				
		21	1	0.356	0.372	0.350	0.3593	0.3634	0.0318	10	3.18
			2	0.412	0.359	0.352	0.3743				
			3	0.369	0.342	0.359	0.3567				
		28	1	0.892	0.756	0.823	0.8237	0.8226	0.0720	100	0.72
			2	0.853	0.824	0.812	0.8297				
			3	0.802	0.835	0.806	0.8143				
		35	1	0.002	0.003	0.006	0.0037	0.0070	0.0006	100	0.01
			2	0.006	0.013	0.005	0.0080				
			3	0.020	0.002	0.006	0.0093				

สภาวะ	สูตรอาหาร	วันที่	ซ้ำ	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร			เฉลี่ย	เฉลี่ยรวม	ปริมาณน้ำตาลจากกราฟ (มิลลิกรัม)	ปริมาณอาหารที่ใช้ (ไมโครลิตร)	ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
				1	2	3					
แสง	MS + NAA 0.5 มก/ล	7	1	0.546	0.586	0.530	0.5540	0.5601	0.0491	5	9.81
			2	0.623	0.560	0.531	0.5713				
			3	0.543	0.520	0.602	0.5550				
		14	1	0.356	0.326	0.420	0.3673	0.3668	0.0321	5	6.42
			2	0.341	0.356	0.371	0.3560				
			3	0.425	0.356	0.350	0.3770				
		21	1	0.259	0.306	0.230	0.2650	0.2543	0.0223	10	2.23
			2	0.246	0.202	0.225	0.2243				
			3	0.268	0.300	0.253	0.2737				
		28	1	0.523	0.682	0.535	0.5800	0.5787	0.0507	100	0.51
			2	0.620	0.563	0.546	0.5763				
			3	0.583	0.600	0.556	0.5797				
		35	1	0.002	0.003	0.005	0.0033	0.0067	0.0006	100	0.01
			2	0.012	0.006	0.005	0.0077				
			3	0.001	0.020	0.006	0.0090				

สภาวะ	สูตรอาหาร	วันที่	ซ้ำ	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร			เฉลี่ย	เฉลี่ยรวม	ปริมาณน้ำตาลจากกราฟ (มิลลิกรัม)	ปริมาณอาหารที่ใช้ (ไมโครลิตร)	ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
				1	2	3					
แสง	MS + NAA 1.0 มก/ล	7	1	0.576	0.522	0.570	0.5560	0.5640	0.0494	5	9.88
			2	0.610	0.579	0.564	0.5843				
			3	0.563	0.542	0.550	0.5517				
		14	1	0.325	0.304	0.406	0.3450	0.3388	0.0297	5	5.93
			2	0.330	0.368	0.342	0.3467				
			3	0.308	0.340	0.326	0.3247				
		21	1	0.423	0.502	0.442	0.4557	0.4460	0.0391	10	3.91
			2	0.426	0.452	0.433	0.4370				
			3	0.442	0.420	0.474	0.4453				
		28	1	0.736	0.780	0.734	0.7500	0.7541	0.0660	100	0.66
			2	0.775	0.801	0.756	0.7773				
			3	0.733	0.742	0.730	0.7350				
		35	1	0.002	0.005	0.012	0.0063	0.0090	0.0008	100	0.01
			2	0.009	0.005	0.020	0.0113				
			3	0.003	0.015	0.010	0.0093				

สภาวะ	สูตรอาหาร	วันที่	ซ้ำ	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร			เฉลี่ย	เฉลี่ยรวม	ปริมาณน้ำตาลจากกราฟ (มิลลิกรัม)	ปริมาณอาหารที่ใช้ (ไมโครลิตร)	ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
				1	2	3					
ไม่ให้แสง	MS	0	1	1.009	1.002	1.004	1.0050	1.0046	0.0880	5	17.59
			2	1.000	1.006	1.003	1.0030				
			3	1.006	1.009	1.002	1.0057				
		7	1	0.744	0.777	0.732	0.7510	0.7396	0.0648	5	12.95
			2	0.752	0.722	0.690	0.7213				
			3	0.730	0.760	0.749	0.7463				
		14	1	0.436	0.413	0.412	0.4203	0.4668	0.0409	5	8.18
			2	0.451	0.464	0.444	0.4530				
			3	0.529	0.531	0.521	0.5270				
		21	1	0.468	0.482	0.469	0.4730	0.4730	0.0414	10	4.14
			2	0.502	0.480	0.462	0.4813				
			3	0.462	0.450	0.482	0.4647				
		28	1	0.286	0.306	0.276	0.2893	0.2732	0.0239	10	2.39
			2	0.262	0.283	0.265	0.2700				
			3	0.256	0.255	0.270	0.2603				
		35	1	0.972	0.925	0.930	0.9423	0.9203	0.0806	100	0.81
			2	0.926	0.902	0.920	0.9160				
			3	0.900	0.896	0.912	0.9027				

สภาวะ	สูตรอาหาร	วันที่	ซ้ำ	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร			เฉลี่ย	เฉลี่ยรวม	ปริมาณน้ำตาลจากกราฟ (มิลลิกรัม)	ปริมาณอาหารที่ใช้ (ไมโครลิตร)	ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
				1	2	3					
ไม่ให้แสง	MS + NAA 0.1 มก/ล	7	1	0.732	0.720	0.726	0.7260	0.7257	0.0635	5	12.71
			2	0.702	0.730	0.736	0.7227				
			3	0.712	0.740	0.733	0.7283				
		14	1	0.326	0.368	0.720	0.4713	0.4547	0.0398	5	7.96
			2	0.366	0.378	0.820	0.5213				
			3	0.386	0.352	0.376	0.3713				
		21	1	0.265	0.266	0.250	0.2603	0.2654	0.0232	10	2.32
			2	0.320	0.263	0.253	0.2787				
			3	0.258	0.254	0.260	0.2573				
		28	1	0.836	0.856	0.923	0.8717	0.8137	0.0713	100	0.71
			2	0.876	0.873	0.732	0.8270				
			3	0.745	0.732	0.750	0.7423				
		35	1	0.005	0.003	0.020	0.0093	0.0114	0.0010	100	0.01
			2	0.009	0.009	0.015	0.0110				
			3	0.003	0.026	0.013	0.0140				

สภาวะ	สูตรอาหาร	วันที่	ซ้ำ	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร			เฉลี่ย	เฉลี่ยรวม	ปริมาณน้ำตาลจากกราฟ (มิลลิกรัม)	ปริมาณอาหารที่ใช้ (ไมโครลิตร)	ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
				1	2	3					
ไม่ให้แสง	MS + NAA 0.5 มก/ล	7	1	0.632	0.702	0.643	0.6590	0.6646	0.0582	5	11.64
			2	0.710	0.653	0.652	0.6717				
			3	0.685	0.651	0.653	0.6630				
		14	1	0.382	0.376	0.393	0.3837	0.3690	0.0323	5	6.46
			2	0.406	0.389	0.388	0.3943				
			3	0.321	0.332	0.334	0.3290				
		21	1	0.321	0.306	0.305	0.3107	0.3151	0.0276	10	2.76
			2	0.295	0.312	0.322	0.3097				
			3	0.340	0.316	0.319	0.3250				
		28	1	0.562	0.430	0.560	0.5173	0.5108	0.0447	100	0.45
			2	0.510	0.530	0.522	0.5207				
			3	0.482	0.499	0.502	0.4943				
		35	1	0.008	0.005	0.002	0.0050	0.0059	0.0005	100	0.01
			2	0.003	0.005	0.013	0.0070				
			3	0.008	0.002	0.007	0.0057				

สภาวะ	สูตรอาหาร	วันที่	ซ้ำ	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร			เฉลี่ย	เฉลี่ยรวม	ปริมาณน้ำตาลจากกราฟ (มิลลิกรัม)	ปริมาณอาหารที่ใช้ (ไมโครลิตร)	ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
				1	2	3					
ไม่ให้แสง	MS + NAA 1.0 มก/ล	7	1	0.506	0.512	0.522	0.5133	0.5230	0.0458	5	9.16
			2	0.561	0.528	0.523	0.5373				
			3	0.502	0.536	0.517	0.5183				
		14	1	0.382	0.375	0.380	0.3790	0.3773	0.0330	5	6.61
			2	0.365	0.374	0.389	0.3760				
			3	0.382	0.388	0.361	0.3770				
		21	1	0.350	0.356	0.384	0.3633	0.3523	0.0309	10	3.09
			2	0.332	0.354	0.340	0.3420				
			3	0.353	0.354	0.348	0.3517				
		28	1	0.754	0.783	0.766	0.7677	0.7566	0.0663	100	0.66
			2	0.784	0.763	0.703	0.7500				
			3	0.755	0.742	0.759	0.7520				
		35	1	0.002	0.003	0.006	0.0037	0.0092	0.0008	100	0.01
			2	0.015	0.009	0.005	0.0097				
			3	0.004	0.016	0.023	0.0143				

ภาคผนวก ง

1. การวิเคราะห์ทางสถิติของความยาวรากหม่อน

ในการทดลองทำการวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS เวอร์ชั่น 16 โดยใช้การทดลองแบบแฟคทอเรียล ที่มีปัจจัยการทดลอง 2 ปัจจัย แผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ (Randomize Complete Block Design, RCBD) โดยค่าบล็อกในที่นี้ คือ วันที่เก็บผลทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 35 วัน มีผลดังนี้

ตารางที่ ง-1 แสดงผลการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของความยาวรากหม่อนในอาหารและสภาวะต่างๆ ที่เก็บผลทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 35 วัน

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:yield

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	2209.890[a]	11	200.899	66.674	.000
Intercept	3462.093	1	3462.093	1.149E3	.000
block	1628.297	4	407.074	135.099	.000
Light	37.091	1	37.091	12.310	.001
Medium	528.096	3	176.032	58.421	.000
Light * Medium	16.406	3	5.469	1.815	.149
Error	325.421	108	3.013		
Total	5997.404	120			
Corrected Total	2535.311	119			

a. R Squared = .872 (Adjusted R Squared = .859)

ตารางที่ ง-2 แสดงผลการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธีดันแคนของความยาวราก หม่อนในอาหารและสภาวะต่างๆ ที่เก็บผลทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 35 วัน

yield

Duncan

treatment	N	Subset			
		1	2	3	4
MS	15	1.3487			
no light MS	15		2.8797		
NAA1.0	15			4.9730	
no light NAA1.0	15			5.0210	
NAA0.1	15			5.8190	
NAA0.5	15				7.1207
no light NAA0.1	15				7.8330
no light NAA0.5	15				7.9753
Sig.		1.000	1.000	.212	.207

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 3.013.

ตารางที่ ง-3 แสดงผลการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของน้ำหนักรากหม่อนแห้งในอาหารและสภาวะต่างๆ ที่เก็บผลทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 35 วัน

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:yield

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	9743.443[a]	11	885.768	36.701	.000
Intercept	11801.145	1	11801.145	488.974	.000
block	7339.717	4	1834.929	76.029	.000
Light	94.072	1	94.072	3.898	.051
Medium	2273.186	3	757.729	31.396	.000
Light * Medium	36.468	3	12.156	.504	.681
Error	2606.524	108	24.134		
Total	24151.112	120			
Corrected Total	12349.967	119			

a. R Squared = .789 (Adjusted R Squared = .767)

ตารางที่ ง-4 แสดงผลการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธีดันแคนของน้ำหนักรากหม่อนแห้งในอาหารและสภาวะต่างๆ ที่เก็บผลทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 35 วัน

yield

Duncan

treatment	N	Subset			
		1	2	3	4
MS	15	3.0241			
no light MS	15	5.2145	5.2145		
NAA1.0	15		7.3820		
no light NAA1.0	15		7.4710		
NAA0.1	15			11.5965	
NAA0.5	15			14.1230	14.1230
no light NAA0.1	15			14.7268	14.7268
no light NAA0.5	15				15.7964
Sig.		.225	.240	.102	.384

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 24.134.

ตารางที่ ง-5 แสดงผลการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดจากสารสกัดรากหม่อนในอาหารและสภาวะต่างๆ

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:data

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	125.381[a]	7	17.912	52.426	.000
Intercept	8159.774	1	8159.774	2.388E4	.000
Light	47.799	1	47.799	139.903	.000
Medium	74.760	3	24.920	72.939	.000
Light * Medium	2.822	3	.941	2.753	.077
Error	5.467	16	.342		
Total	8290.621	24			
Corrected Total	130.848	23			

a. R Squared = .958 (Adjusted R Squared = .940)

ตารางที่ ง-6 แสดงผลการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธีดันแคนของปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดจากสารสกัดรากหม่อนในอาหารและสภาวะต่างๆ

yield

Duncan

treatment	N	Subset						
		1	2	3	4	5	6	7
no light MS	3	1.567067E1						
no light NAA1.0	3	1.605700E1	1.605700E1					
no light NAA0.5	3		1.700233E1	1.700233E1				
MS	3			1.758100E1	1.758100E1			
NAA1.0	3				1.853700E1	1.853700E1		
no light NAA0.1	3					1.938033E1	1.938033E1	
NAA0.5	3						2.018300E1	
NAA0.1	3							2.309933E1
Sig.		.430	.065	.243	.062	.096	.112	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .342.

ตารางที่ ง-7 แสดงผลการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติค่า IC$_{50}$ ของ DPPH จากสารสกัดรากหม่อนในอาหารและสภาวะต่างๆ

ANOVA

yield

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.002	7	.000	.	.
Within Groups	.000	0	.		
Total	.002	7			

ตารางที่ ง-8 แสดงผลการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติค่า IC$_{50}$ ของ ABTS จากสารสกัดรากหม่อนในอาหารและสภาวะต่างๆ

ANOVA

yield

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.004	7	.001	.	.
Within Groups	.000	0	.		
Total	.004	7			