บทที่ 2

เอกสารที่เกี่ยวข้อง

2.1 ป่าชุมชนบ้านหัวทุ่ง ตำบลเชียงดาว อำเภอเชียงดาว จังหวัดเชียงใหม่

ป่าชุมชนบ้านหัวทุ่งอยู่ในพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเชียงดาว ตำบลเชียงดาว อำเภอเชียงดาว จังหวัดเชียงใหม่ มีพื้นที่มากกว่า 6,000 ไร่ มีความหลากหลายของพืชพรรณในป่าไม้ สัตว์ป่า และจุลินทรีย์มาก ความหลากหลายและความโดดเด่นของพันธุ์ที่แตกต่างจากบริเวณอื่น ๆ ของโลกจึงเป็นแหล่งรวมพฤกษชาติจำนวนมากที่หายาก (rare species) และพืชถิ่นเดียว (endemic species) เช่น รองเท้านารีฝาหอย (Paphiopedilum bellatulum) กุหลาบขาวเชียงดาว (Rhododendron ludwigianum) เอื้องศรีเชียงดาว (Sirindhornia pulchella) สิงโตเชียงดาว(Bulbophyllum albribracteum) และเอื้องข้าวตอกหิน (Amitostigma thailandicum) สำหรับพืชบางชนิดที่คาดว่าอาจจะสูญพันธุ์จากดอยเชียงดาวแล้วได้แก่ รองเท้านารีเมืองกาญจน์ Paphiopedilum parishii ตลอดจนเชื่อว่าน่าจะเป็นแหล่งหนึ่งที่มีกล้วยไม้ป่าชนิดใหม่

2.2 เอื้องคำ (*Dendrobium chrysotoxum*)

เอื้องคำเป็นกล้วยไม้ที่ชาวเหนือส่วนใหญ่รู้จักกันดี หญิงสาวชาวเหนือนิยมนำดอกเอื้องคำมาประดับบนมวยผม เนื่องจากสีสันของดอกเอื้องคำมีสีสวยสดใส และมีกลิ่นหอมอ่อนๆ นอกจากนั้น ชาวจีนยังนำดอกเอื้องคำมาตากแห้ง แล้วชงเป็นเครื่องดื่มเรียกว่า "ชาดอกกล้วยไม้" ซึ่งเชื่อว่าเป็นชาชนิดพิเศษที่มีค่ามากและหายาก โดยกล่าวว่ามีสรรพคุณที่ทำให้นอนหลับสบาย ช่วยลดความดันโลหิต และเพิ่มพลังทางเพศ ประกอบกับดอกเอื้องคำมีกลิ่นหอมคล้ายน้ำผึ้งจึงเหมาะที่จะนำมาทำเป็นชา

1) **ลักษณะทางพฤกษศาสตร์** (Lady Garden, 2553)

การจำแนก

Kingdom: Plantae

Division: Magnoliophyta

Class: Liliopsida

Order: Orchidales

Family: Orchidaceae

Genus: *Dendrobium*

Species: *D. chrysotoxum*

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Dendrobium chrysotoxum* Lindl.

ชื่อสามัญ : Fried egg orchid , Dai Orchid

ลักษณะทั่วไป

ลำต้น : มีลักษณะเป็นลำลูกกล้วยยาวรี โคนลำเล็ก และพองโป่งบริเวณตรงกลาง ผิวสีอมเหลือง เป็นร่องยาวตามความยาวของลำลูกกล้วย สูงประมาณ 15- 30 ซม.

ใบ : รูปไข่ เรียงสลับใกล้ ยอด สีเขียวเข้ม มีประมาณ 3-6 ใบในหนึ่งลำลูกกล้วย ยาวประมาณ 10-15 ซม. ส่วนของ

ดอก : ลักษณะเป็นช่อ ก้านช่อดอกจะแข็งและห้อยลง ยาวประมาณ 20-30 ซม. กลีบดอกสีเหลืองสด มีสีน้ำตาลอ่อนเรื่ออยู่ในส่วนกลีบปาก กลีบปากมีขนละเอียดนุ่มมีกลิ่นหอมอ่อนๆ ขนาดดอกประมาณ 5 ซม.

ราก : เป็นแบบรากกึ่งอากาศ (semi-epiphytic)

ฤดูกาลออกดอก : กุมภาพันธ์ – พฤษภาคม

การปลูก: ในการเลี้ยงให้ได้ดอกดก ต้องคำนึงว่าเอื้องคำเป็นกล้วยไม้ป่าที่ออกดอกในฤดูร้อน ผ่านหน้าแล้งมา 2-3 เดือน จึงควรค่อยๆ ลดจนถึงงดให้น้ำหลังหมดฤดูฝน เพื่อกระตุ้นให้ออกดอกจำนวนมาก และควรเลี้ยงเป็นกอใหญ่ เพื่อให้ดอกทีละหลายช่อพร้อมๆ กัน

การดูแลรักษา: ชอบแสงแดดค่อนข้างจัด 60-80% ทนน้ำมากในฤดูฝนได้ แต่ควรลดการให้น้ำในฤดูแล้งเพื่อให้ต้นได้พักตัวและออกดอก หลังออกดอกแล้วจึงให้น้ำตามปกติ ถ้าได้รับอากาศหนาวในฤดูหนาว จะออกดอกได้ดี

ส่วนที่มีกลิ่นหอม: ดอก

ถิ่นกำเนิด: ไทย อินเดีย เมียนม่าร์ ลาว และจีน

แหล่งที่พบ: ป่าดิบแล้งทางภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคตะวันตก และภาคใต้

รูป 2.1 ลักษณะใบและดอกเอื้องคำ

2) สรรพคุณทางยา

ชาวจีนเชื่อว่าเป็นชาที่มีกลิ่นหอมและมีสรรพคุณที่ทำให้นอนหลับสบาย ช่วยลดความดันโลหิต และเพิ่มพลังทางเพศ (บ้านสวนพอเพียง, 2555) ในการใช้ดอกกล้วยไม้เป็นชานั้นต้องนำไปตากแห้งก่อนแล้วนำไปชงดื่มจะให้กลิ่นหอมอบอวล อีกทั้งยังสามารถนำไปเป็นส่วนประกอบขนมหวานได้ด้วย นอกจากนั้น ส่วนลำต้นยังใช้ในการแพทย์แผนจีน โดยพบว่าในดอกเอื้องคำมีสารที่มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันและช่วยรักษาโรคเบาหวานได้ (Nature Products. Network, 2000)

รูป 2.2 ชาดอกเอื้องคำ
ที่มา : Nature Products. Network, (2000)

2.3 สารพฤกษเคมีที่สำคัญ

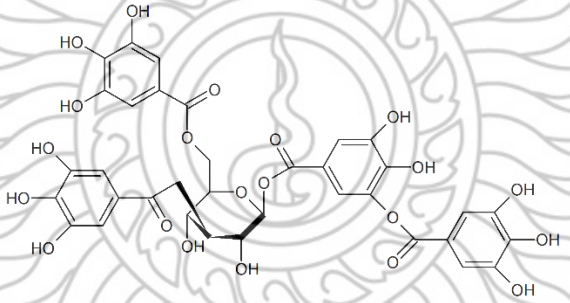
พืชสมุนไพร (Medicinal plant หรือ Herb) คือ พืชทุกชนิดที่สามารถนำมาเป็นยาเพื่อบำบัดรักษาโรคได้ มนุษย์ได้นำส่วนของพืชต่าง ๆ มาแปรสภาพ เช่นส่วนของราก ลำต้น ใบ ดอก ผล เพื่อนำมาเป็นยาบำรุงร่างกาย หรือนำมาใช้เป็นอาหาร เชื้อเพลิง เครื่องนุ่งห่ม ที่พักอาศัย ปัจจุบันสมุนไพรนอกจากจะใช้เป็นยาแล้ว ยังใช้เป็นอาหารเสริม เป็นส่วนประกอบในเครื่องสำอาง ใช้แต่งกลิ่น แต่งสีอาหาร ตลอดจนใช้เป็นยาฆ่าแมลงอีกด้วย สารสำคัญที่พบในพืชสมุนไพรมีดังนี้ (รัตนา อินทรานุปกรณ์, 2547 อ้างถึงใน เรณู คำหอม, 2559 ; อรุณรัตน์ สัณฐิติกวินสกุล, 2557 ; ปิยศิริ สุนทรนนท์ และคณะ, 2557 ; Doughari, J. H., 2012)

1) แอลคาลอยด์ (Alkaloids) เป็นสารอินทรีย์ที่มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบ มักพบในพืชชั้นสูง มีสูตรโครงสร้างซับซ้อนและแตกต่างกันมากมาย คุณสมบัติของแอลคาลอยด์คือ ส่วนใหญ่มีรสขม ไม่ละลายน้ำ ละลายได้ในสารละลายอินทรีย์ มีฤทธิ์เป็นด่าง แอลคาลอยด์มีประโยชน์ ในการรักษาโรคอย่างกว้างขวาง เช่น ใช้เป็นยาระงับปวด ยาแก้ไอ ยาแก้หอบหืด ยารักษาแผลในกระเพาะ และลำไส้ ยาลดความดัน ยาควบคุมการเต้นของหัวใจ เป็นต้น ตัวอย่างเช่น อะโทรพีน (Atropine) ซึ่งสกัดได้จากต้นและใบของลำโพง (*Datura metel* L.) มีฤทธิ์ลดการบีบตัวของลำไส้ รวมทั้งอีฟีดรีน (Ephedine) ซึ่งสกัดได้จากต้นมั่วอี๊ง (*Ephedra equisetina* B.) มีฤทธิ์ขยายหลอดลมใช้เป็นยา รักษาโรคหอบหืด เป็นต้น

การทดสอบแอลคาลอยด์สามารถทดสอบด้วยปฏิกิริยาการเกิดตะกอน ซึ่งเป็นการทดสอบทั้งกลุ่มแอลคาลอยด์ทั่วไปและแอลคาลอยด์เฉพาะโดยแอลคาลอยด์เกือบทุกชนิดสามารถทำปฏิกิริยากับรีเอเจนต์ แล้วตกตะกอนหรือสารละลาย เช่น รีเอเจนต์เมเยอร์ (Mayer’s reagent) จะเกิดตะกอนสีขาวหรือสีครีม หรือ รีเอเจนต์ดราเจนดรอฟฟ์ (Dragendroff’s reagent) จะเกิดตะกอนสีส้ม สีแดงหรือสีน้ำตาล เป็นต้น

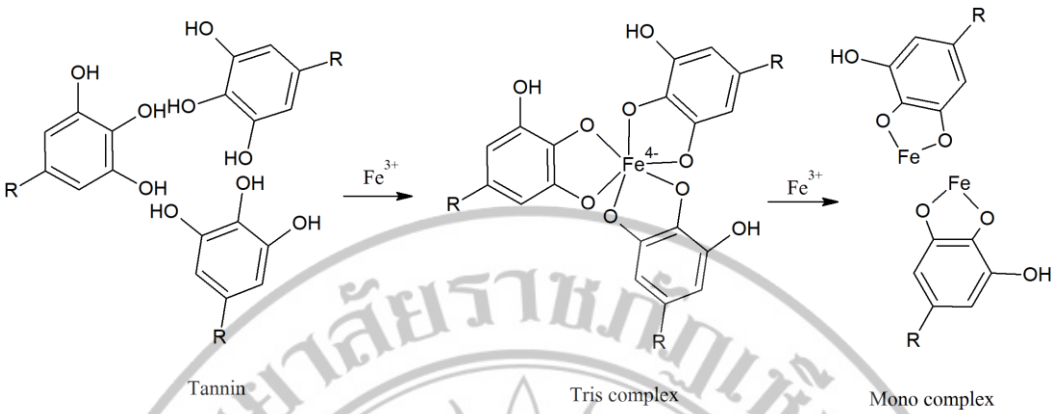
2) แอนทราควิโนน (Antraquinones) เป็นสารที่พบในธรรมชาติมีสีเหลืองส้ม แดงเข้มจนเกือบถึงดำ แต่ไม่ได้มีส่วนแต่งสีสันให้กับธรรมชาติเหมือนสารสี (Pigments) อื่น ๆ เช่น ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) หรือ แอนโทไซยานิน (Anthocyanins) สารประกอบควินิน (Quinines) มีโครงสร้างเป็นอะโรมาติก ไดคีโตน (Aromatic diketone) ประกอบด้วย วงแหวนเบนซีน (Benzene ring) ตั้งแต่ 1 วงแหวนขึ้นไป และมีหมู่คีโตน 2 หมู่ อยู่ในตำแหน่งพารา (Para) ซึ่งกันและกัน แอนทราควิโนน พบในธรรมชาติทั้งรูปแบบอิสระและรูปแบบไกลโคไซด์ ซึ่งสามารถถูกไฮโดรไลส์ (Hydrolysed) ได้ด้วยกรด ด่าง หรือเอนไซม์ สีของควินิน จะเปลี่ยนได้ตาม pH ในกรดสีของควินินจะออกเหลืองหรือสีส้มและจะเปลี่ยนไปทางสีแดงเมื่ออยู่ในด่าง ควินินถูกใช้ประโยชน์ในทางยาจะมีฤทธิ์แก้โรคผิวหนัง กลาก เกลื้อน ใช้เป็นยาระบายและยาถ่าย พืชที่พบเช่น ใบมะขามแขก ใบขี้เหล็ก ใบชุมเห็ดเทศ ว่านหางจระเข้

3) แทนนิน (Tannins) เป็นสารจำพวกสารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compounds) เป็นสารที่มีโครงสร้างซับซ้อนพบได้เฉพาะในพืช (รูป 2.3) คำว่าแทนนิน หมายถึง สารจากพืชที่สามารถเข้ารวมตัวกับ โปรตีนของหนังสัตว์ (Animal hide) ทำให้ไม่เกิดการเน่าเปื่อยตามธรรมชาติ ดังนั้นทางด้านอุตสาหกรรมฟอก จึงมักใช้แทนนินในการฟอกหนังสัตว์โดยฟอกจากหนังดิบสดๆให้กลายเป็นหนังฟอกเพื่อนำไปผลิตเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องหนัง อีกทั้งสารในกลุ่มแทนนินยังใช้เป็นยาฝาดสมานและยาแก้ท้องเสีย ช่วยรักษาแผลไฟไหม้ สมุนไพรที่มีแทนนิน เช่น เปลือกทับทิม (*Punica granatum* L.) เปลือกอบเชย (*Cinnamomum* spp.) และใบฝรั่ง (*Psidium guajava* L.) เป็นต้น ตัวอย่างเช่น กรดแทนนิก (Tannic acid) และกรดแกลลิก (Gallic acid)



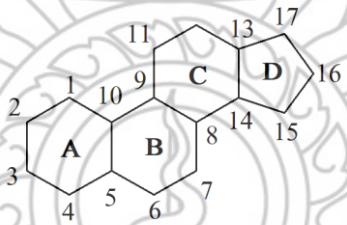
รูป 2.3 โครงสร้างของกรดแทนนิก (Tannic acid)

การทดสอบแทนนินด้วยปฏิกิริยาการเกิดสีหรือตะกอนซึ่งการทดสอบนี้จะใช้รีเอเจนต์เฉพาะเช่น สารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์เจือจาง ดังรูปที่ 2.4 สามารถทดสอบแทนนินได้ทั้งสองชนิด กรณีปรากฏสีน้ำเงินเขียวหรือสีเขียวดำถึงสีเขียวอมน้ำตาล แสดงว่ามีแทนนินชนิดแทนนินไฮโดรไลซ์ เกิดสีน้ำเงินเข้มหรือสีเขียวเข้มถึงสีดำ แสดงว่ามีแทนนินชนิดแทนนินควบแน่น



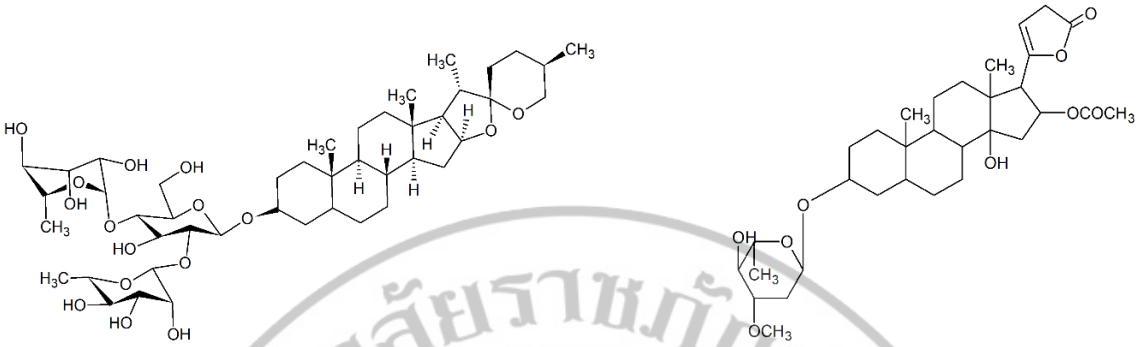
รูป 2.4 การเกิดปฏิกิริยาของสารกลุ่มแทนนินกับสารละลายเฟอร์ริก (Fe^{3+})

4) สเตอรอยด์ (Steroids) เป็นสารประกอบอินทรีย์จำพวกพอลิไอโซพรีน (Polyisoprene) ที่เกิดจาก ไอโซพรีน (Isoprene) 6 หน่วยมาเชื่อมต่อกันและมีโครงสร้างหลักเป็น ไซโคลเพนทาโนเปอร์ไฮโดรฟีแนนทรีน (Cyclopentanoperhydrophenanthene) ดังรูปที่ 2.5 วงแหวน A, B และC จะอยู่ในลักษณะคอนฟอร์เมอร์แบบเก้าอี้ (Chair conformation) การเชื่อมต่อกันระหว่างวงแหวน A และ B จะมีไอโซเมอร์ได้ 2 แบบ คือ แบบทรานส์ (Trans) และแบบซิส (Cis) สเตอรอยด์ที่พบในธรรมชาติมีหลากหลายชนิดที่สามารถพบในพืชและสัตว์ บทบาทสำคัญของสเตอรอยด์ในสิ่งมีชีวิตส่วนใหญ่คือ ฮอร์โมน



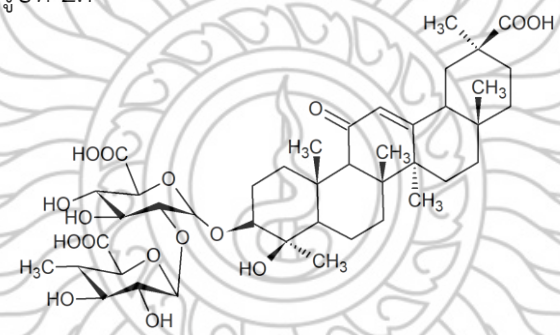
รูป 2.5 โครงสร้างหลักของ สเตอรอยด์ (Steroid)

5) ไกลโคไซด์ (Glycosides) เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่เกิดจากส่วนที่ไม่ใช่น้ำตาลที่เรียกว่าอะไกลโคน (Aglycone) จับกับส่วนที่เป็นน้ำตาล (Glycoside) ซึ่งละลายน้ำได้ดี โครงสร้างของอะไกลโคน มีความแตกต่างกันหลายแบบทำให้ประเภทและสรรพคุณทางเภสัชวิทยาของไกลโคไซด์มีหลายชนิดที่ใช้เป็นยา ไกลโคไซด์จำแนกตามสูตรโครงสร้างของอะไกลโคนได้หลายประเภทคือ คาร์ดิแอคไกลโคไซด์ (Cardiac glycosides) ตัวอย่างเช่น โอลีแอน- ดริน (Oleandrin) สกัดได้จากใบ ของยี่โถ (Nerium incidum Mill.) ใช้บำบัดรักษาอาการโรคหัวใจ ใช้เป็นยาขับถ่าย ซาโปนินไกลโคไซด์ (Saponin glycosides) ตัวอย่างเช่น ไดออสซิน (Dioscin) เป็น สเตียรอยด์ดัลซาโปนิน (Steroidal saponins) สกัดได้จากเมล็ด ลูกซัด (Trigonella foenum-graecum L.) มีฤทธิ์ทำให้แผลแห้งเร็ว รักษาแผลไฟไหม้น้ำร้อนลวก



รูป 2.6 ตัวอย่างของสารในกลุ่ม ไกลโคไซด์

6) ซาโปนิน (Saponins) หรือซาโปนินไกลโคไซด์ มีส่วนอะไกลโคนเป็นสารพวก สเตอรอยด์ (Steroids) หรือ ไตรเทอร์พีนอยด์ (Triterpenoids) ส่วนนี้จะจับกับส่วนน้ำตาล หรืออนุพันธ์ของน้ำตาลที่ตำแหน่ง C_3 ได้เป็น ออกซิเจน-ไกลโคไซด์ (O-glycoside) ซาโปนินไกลโคไซด์ มีคุณสมบัติบางอย่างคล้ายสบู่ เช่น สามารถเกิดฟองเมื่อเขย่ากับน้ำ เป็นสารลดแรงตึงผิวที่ดี ตัวอย่างเช่น กลีซีร์ริซิน (Glycyrrhtzin) พบในชะเอมเทศ (*Glycyrrhiza glabra* Linn.) ซึ่งมีอะไกลโคนเป็นไตรเทอร์พีนอยด์และมีโมเลกุลของน้ำตาล 2 โมเลกุลเกาะตำแหน่งที่ 3 ดังรูปที่ 2.7

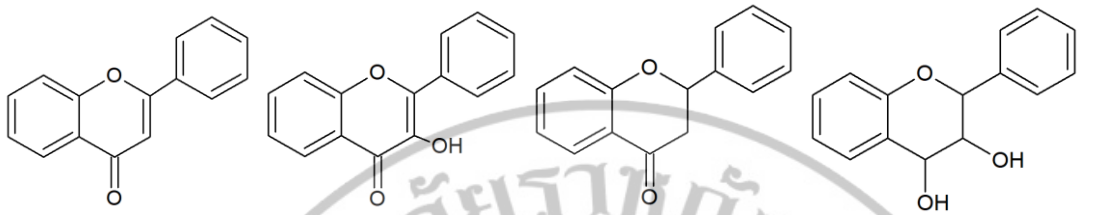


รูป 2.7 โครงสร้างของกลีซีร์ริซิน (Glycyrrhizin)

การทดสอบซาโปนินสามารถทำได้หลากหลายวิธีเช่น การทดสอบฟอง (Froth test) เมื่อเขย่าสารสกัดที่มีซาโปนินไกลโคไซด์ นานประมาณ 30 นาที จะเกิดฟองที่มีลักษณะเหมือนรังผึ้ง (Honey comb froth) เป็นวงแหวนขนาด 6 เหลี่ยม จัดเรียงตัวซ้อนกัน และคงทนอยู่ประมาณ 30 นาที ซึ่งฟองจะหายไปเมื่อเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ยืนยันโดยหยดสารละลายเบสลงในสารสกัด ซึ่งกรดจะทำปฏิกิริยากับเบส ได้เกลือ เมื่อเขย่าจะเกิดฟองในปริมาณมากและมีความคงทนนานกว่า 30 นาที แต่ถ้าไม่เกิดฟอง แสดงว่าเป็นอะไกลโคนของซาโปนินไกลโคไซด์ นอกจากนี้ ถ้าฟองเกิดจากโปรตีน จะหายไปหลังจากต้ม

7) ฟลาโวนอยด์ (Flavonoid) มีโครงสร้างหลัก ได้แก่ ฟีนิลเบนซิล-แกมมา-ไพโรน (C6-C3-C6) พบทั่วไปในพืชต่าง ๆ ยกเว้น สาหร่าย แบคทีเรีย รา รวมทั้งแมลงบางชนิด ฟลาโวนอยด์ประเภทแชลโคน ฟลาโวน (Flavone) ฟลาโวนอล (Flavonol) ฟลาวาโนน (Flavanone) ออโรน (Aurone) แอนโธไซยานิดิน (Anthocyanin) ลิวโคแอนโธไซยานิดิน (Leucoanthocyanin) และคาทีชิน (Catechin) โครงสร้างดังรูปที่ 2.8 สารฟลาโวนอยด์เป็นสารที่ไม่มีสีแต่สามารถดูดกลืนรังสีได้ในช่วง 315 – 380 นาโนเมตร ซึ่งเป็นช่วงคลื่นที่

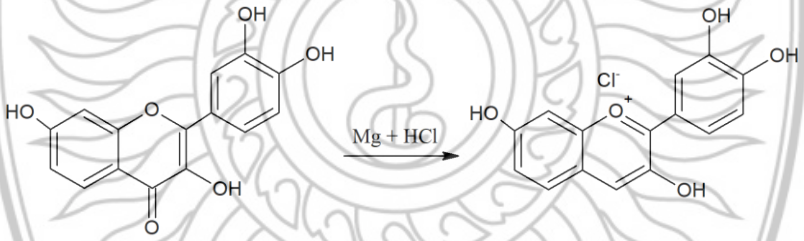
แมลงสามารถมองเห็นได้ ดังนั้นฟลาโวนอยด์จึงมีบทบาทสำคัญในการล่อแมลงเพื่อการผสมเกสร ฟลาโวนอยด์ที่พบมากในพืชชั้นสูง ได้แก่ Kaempferol และ Quercetin และที่พบได้บ้าง ได้แก่ Myricetin และ Gelangin



รูป 2.8 ตัวอย่างของสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์

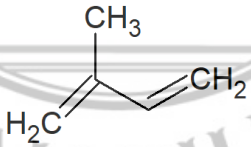
เนื่องจากฟลาโวนอยด์จะมีหมู่ไฮดรอกซิลเกาะอยู่กับโครงสร้างหลัก ส่งผลให้ฟลาโวนอยด์มีขั้วมาก ดังนั้น จึงมักสกัดจำพวกนี้ด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วมาก

การทดสอบฟลาโวนอยด์ด้วยปฏิกิริยาการเกิดสีส่วนใหญ่จะทดสอบโดยใช้ปฏิกิริยาไซยานิดิน (Cyanidin reaction) ประกอบด้วยโลหะแมกนีเซียมและกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ดังรูปที่ 2.9 ให้ผลการทดสอบเฉพาะฟลาโวนอยด์ที่มีฟีนิลเบนซิล-แกมมา-ไพโรนซึ่งเป็นโครงสร้างหลัก กล่าวคือ สีส้มถึงสีแดง แสดงว่ามีฟลาโวน สีแดงถึงสีแดงเข้มหรือ สีแดงเลือดหมู (Crimson) แสดงว่ามีฟลาโวนอล สีแดงเข้มถึงสีแดงอมม่วง (Margenta) แสดงว่ามี ฟลาโวโนนไกลโคไซด์ ความเข้มข้นของสีที่เกิดขึ้นจะขึ้นอยู่กับปริมาณของฟลาโวนอยด์ บางครั้งอาจเห็นสีไม่ชัดเจน เนื่องจากสีของสารสกัดบดบัง แก้ไขโดยเติมออกทิลแอลกอฮอล์ (Octyl alcohol) ลงไป เพื่อทำให้มองเห็นสีที่ชัดเจนขึ้น



รูป 2.9 การเกิดปฏิกิริยาไซยานิดินของสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์

8) เทอร์พีนอยด์ (Terpenoids) เป็นกลุ่มของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่พบได้มากในธรรมชาติ เป็นไฮโดรคาร์บอนชนิดที่ไม่อิ่มตัว ถ้าอยู่ในรูปของเหลว สามารถติดไฟได้ที่พบได้ทั่วไปเช่น น้ำมันหอมระเหย เรซิน หรือโอเรโอเรซิน เป็นต้น เทอร์พีนอยด์จะประกอบด้วยหน่วยของไอโซพรีน (Isoprene) ที่มีคาร์บอน 5 อะตอม (C_5H_8) ดังรูปที่ 2.10



รูป 2.10 Isoprene (C_5H_8) ส่วนประกอบสำคัญของสารกลุ่มเทอร์พีนอยด์

ซึ่งมีการแบ่งประเภทของเทอร์พีนอยด์ ออกเป็นหลายประเภท เช่น เซสควิเทอร์พีน (Sesquiterpene ; C_{15}) เป็นส่วนประกอบสำคัญของน้ำมันหอมระเหยหลายชนิดไดเทอร์พีนส์ (Diterpenes ; C_{20}) เป็นองค์ประกอบพื้นฐานในเรซินและแท๊กซอลที่ใช้เป็นสารต้านมะเร็งไตรเทอร์พีนส์ (Triterpenes ; C_{30})

ที่เป็นองค์ประกอบในสารกลุ่มสเตอรอยด์ สเตอรอลและคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ที่ใช้เป็นยาออกฤทธิ์ต้านการอักเสบ ยาระงับความรู้สึก และยาฆ่าแมลง

การทดสอบเทอร์พีนอยด์ด้วยปฏิกิริยาการเกิดสีสามารถทดสอบเฉพาะเทอร์พีนบางชนิดเท่านั้นที่สามารถทำปฏิกิริยากับรีเอเจนต์แล้วเกิดสี เช่น การทดสอบแซลโควสกิ (Salkowski test) โดยสกัดพืชด้วยอีเทอร์ แล้วเติมคลอโรฟอร์มและกรดซัลฟิวริกเข้มข้นเล็กน้อย จะปรากฏสีน้ำตาลแดงตรงรอยต่อของสารละลายใช้สำหรับการทดสอบเทอร์พีนทั่วไป และรีเอเจนต์ 2,6-ได-เทอร์ต-บิวทิล-พารา-ครีซอล (2,6-di-tert-butyl-p-cresol) ในเอธานอลจะปรากฏสารละลายสีม่วงใช้ทดสอบเพนทะไซคลิกไทรเทอร์พีน (Pentacyclic triterpenes)

2.4 การเตรียมตัวอย่างพืช

การเตรียมตัวอย่างพืชสมุนไพรต้องคำนึงถึงปัจจัยหลายอย่าง เช่น สารสำคัญในพืช พืชที่ใช้ในการสกัดจะต้องไม่มีพืชอื่นเจือปน ไม่มีโรคพืช อายุพืชที่ผลิตสารสำคัญ ความเสถียรขององค์ประกอบทางเคมี และการเก็บรักษา การเตรียมตัวอย่างโดยถูกวิธีจะเป็นการคงคุณภาพของพืชเอาไว้ โดยการเตรียมพืชก่อนการสกัดนั้น จึงต้องทำความสะอาด เพื่อกำจัดสิ่งปนเปื้อน และการนำพืชตัวอย่างไปอบควรใช้อุณหภูมิที่ไม่เกิน 60 องศาเซลเซียส หรือตากให้แห้งในที่อากาศสามารถถ่ายเทได้สะดวก เพื่อป้องกันไม่ให้สารสำคัญในพืชสลายตัว แล้วนำสารตัวอย่างไปลดขนาดเพื่อสามารถให้ตัวทำละลายเข้าไปแทรกกับผิวสัมผัสของพืชให้ได้มากที่สุด จึงจะทำให้สารสกัดที่ได้มามีปริมาณขององค์ประกอบทางเคมีที่มาก การทำให้พืชแห้งก่อนการสกัดนั้นมีข้อดีคือจะเป็นการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในพืชและทำให้ปราศจากน้ำในเซลล์พืช ซึ่งจะทำให้ตัวทำละลายอินทรีย์ละลายสารในพืชได้ดีกว่าตัวอย่างพืชสดโดยทั่วไปการสกัดสารเบื้องต้นไม่ว่าจะสกัดด้วยวิธีใดหรือตัวทำละลายใดก็จะได้องค์ประกอบที่เป็นของเหลวผสมกึ่งของแข็งหรือเป็นผงที่ไม่อันตรายหรือสารสกัดอย่างหยาบ (Crude extract) ซึ่งเป็นสิ่งที่สกัดออกมาจากพืชโดยใช้ตัวทำละลาย ซึ่งอาจจะมีองค์ประกอบทางเภสัชวิทยาประกอบด้วย (อรุณรัตน์ สัณฐิติกวินสกุล, 2557 ; Handa S.S. *et al.*, 2008)

2.5 การเลือกตัวทำละลายในการสกัดสารตัวอย่าง

การสกัดสารตัวอย่างที่มีองค์ประกอบทางเคมีที่ไม่ใช่น้ำมันหอมระเหย มักนิยมสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์เช่น เฮกเซน อีเทอร์ ไดคลอโรมีเทน คลอโรฟอร์ม แอซีโทน เอทิลแอซีเทตและแอลกอฮอล์ เป็นต้น โดยหลักการเลือกตัวทำละลายนั้นอาศัยหลักการต่างๆ เช่น การมีขั้วที่ใกล้เคียงกับสารที่ต้องการสกัด ไม่ทำปฏิกิริยากับองค์ประกอบเคมีในพืช ไม่ระเหยง่ายและยากเกินไป ไม่เป็นพิษ หาง่ายและราคาไม่แพง โดยตัวทำละลายที่ผู้วิจัยเลือกใช้ในการวิจัยนี้คือ เมทานอลเนื่องจากเมทานอลเป็นสารที่มีขั้วสูง สามารถสกัดสารที่มีขั้วจากสารตัวอย่างได้ดีกว่า เช่นสารในกลุ่มฟีนอลิก จากงานวิจัยพบว่าเมทานอลสามารถสกัดสารประกอบฟีนอลได้ในปริมาณที่มากกว่าตัวทำละลายชนิดอื่น (Stankovic M., 2011) และสามารถสกัดสารพฤกษเคมีได้ดีกว่าตัวทำละลายชนิดอื่น ๆ ดังตารางที่ 2.1

ตาราง 2.1 ตัวอย่างสารพฤกษเคมีที่สกัดได้จากตัวทำลายที่แตกต่างกัน (Jannatul A. *et al.*, 2013)

Water	Ethanol	Methanol	Choloroform	Dichoromethanol	Ether	Acetone
Anthocyanin	Tannins	Anthocyanin	Terpenoids	Terpenoids	Alkaloids	Flavonoids
Tannins	Polyphenol	Terpenoids	Flavonoids		Terpenoids	
Saponins	Flavonol	Tannins				
Terpenoids	Terpenoids	Saponins				
	Alkaloids	Flavones				
		Polyphenols				

2.6 การสกัดสารตัวอย่าง

การสกัดสารสำคัญในพืช มีอยู่หลายวิธีเช่น วิธีการแช่หมัก (Maceration) วิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายโดยเครื่องสกัดซอกห์เลตและการสกัดด้วยตัวทำละลายโดยคลื่นไมโครเวฟ เป็นต้น

1) การสกัดแบบแช่หมัก (Maceration) เป็นวิธีการหมักพืชโดยใช้ตัวทำละลายในสภาวะปิดเพื่อป้องกันการระเหยจากตัวทำลาย โดยแช่ไว้ในอุณหภูมิห้อง ทิ้งไว้ประมาณ 5-7 วัน โดยต้องหมั่นเขย่าหรือคนบ่อย ๆ เพื่อให้ตัวทำละลายเข้าไปละลายสารจากพืชตัวอย่าง เมื่อครบกำหนดแช่ ให้รินสารละลายและพยายามบีบคั้นสารละลายให้ออกจากพืชให้ได้มากที่สุด โดยมักจะหมักไว้ประมาณ 2-3 รอบ หรือจนกว่าสารตัวอย่างจะไม่สามารถละลายได้อีก โดยวิธีการนี้มักใช้กับการสกัดสารที่ไม่ทนความร้อนมากนัก (ปิยศิริ สุนทรนนท์ และคณะ, 2557 ; อรุณรัตน์ สัณฐิติกวินสกุล, 2557 ; Banu K.S. and Cathrine L., 2015)

2) การทำให้สารสกัดเข้มข้น (Concentration) หลังจากได้สารละลายที่ผ่านกระบวนการสกัดมาแล้ว สารสกัดที่ได้มักจะเป็นสารละลายที่เจือจางจึงจำเป็นต้องทำให้ผ่านกระบวนการทำให้สารละลายนั้นมีความเข้มข้นมากขึ้นเพื่อความสะดวกในการแยกองค์ประกอบของสารที่สำคัญที่นิยมใช้คือ การกลั่นในระบบสุญญากาศ (Vacuum distillation system) เป็นการระเหยตัวทำละลายโดยใช้อุณหภูมิต่ำ โดยเครื่องจะต่อกับปั๊มสุญญากาศ (Vacuum pump) เพื่อลดความดันให้เกือบเป็นสุญญากาศ โดยหลักการทำงานของเครื่อง คือ นำขวดก้นกลมที่มีสารสกัดต่อเข้ากับเครื่องมือ จากนั้นเปิดปั๊มเพื่อให้เกิดระบบสุญญากาศ ปิดระบบสุญญากาศตรง ปลายเครื่องควบแน่น ให้ความร้อนขวดก้นกลมโดยสัมผัสกับน้ำในเครื่องอังน้ำพร้อมกับหมุนขวดก้นกลมตลอดเวลา เพื่อให้สารสกัดเกิดการกระจายความร้อนอย่างสม่ำเสมอ จนกระทั่งตัวทำละลายระเหยกลายเป็นไอผ่านไปยังเครื่องควบแน่น ซึ่งต่อกับระบบหล่อน้ำเย็น ทำให้ไอควบแน่นกลายเป็นของเหลวตกลงสู่ภาชนะรองรับ (อรุณรัตน์ สัณฐิติกวินสกุล, 2557)

2.7 อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ (Free radical and Antioxidant)

อนุมูลอิสระ (Free radical) คือ อะตอมหรือโมเลกุลซึ่งไม่เสถียรเนื่องจากอิเล็กตรอนเดี่ยวของอะตอมในออร์บิทัลชั้นนอกสุดที่ระดับพลังงานสูง พบได้ทุกแห่งทั้งในสิ่งแวดล้อมและในสิ่งมีชีวิตโดยเฉพาะอย่างยิ่งกระบวนการผลิตพลังงานภายในเซลล์ หรือจากกระบวนการแมทาบอลิซึม (Metabolism) โดยปกติในร่างกายมนุษย์จะมีโมเลกุลหรืออะตอมที่มีจำนวนอิเล็กตรอนอยู่เป็นจำนวนคู่ การที่อะตอมหรือโมเลกุลเกิดการสูญเสียอิเล็กตรอนไปนั้นจะส่งผลให้อะตอมหรือโมเลกุลนั้น ๆ ไม่เสถียรและไวต่อการเกิดปฏิกิริยาโดยอนุมูลอิสระจะแย่งกันเข้าไปจับกับอิเล็กตรอนโมเลกุลอื่น ๆ ที่อยู่รอบข้างกลายเป็นอนุมูลอิสระแทนที่อิเล็กตรอนที่

ขาดหายไปเพื่อให้ตัวเองเกิดความสมดุลหรือเสถียร ซึ่งจะเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง จึงส่งผลให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่อื่น ๆ ต่อเนื่องกันไป และเกิดขึ้นในเซลล์ตลอดเวลาดังสมการ (2.1 และ 2.2)

$$R^{\bullet} + O_2 \longrightarrow ROO^{\bullet} \quad \text{... (2.1)}$$

$$ROO^{\bullet} + RH \longrightarrow ROOH + R^{\bullet} \quad \text{... (2.2)}$$

อนุมูลอิสระในร่างกายส่วนมากเกิดจากกระบวนการเมทาบอลิซึมของร่างกายหรือในสภาวะที่ผิดปกติ เช่น ภาวะของโรคหรือภาวะที่ร่างกายแวดล้อมไปด้วยมลพิษ โดยในภาวะที่ผิดปกตินี้ จะส่งผลให้ร่างกายเกิดการสะสมของอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น อนุมูลอิสระจึงส่งผลให้เซลล์ของร่างกายเสียหาย ถ้ามีมากเกินไปจะสามารถทำลายสารชีวโมเลกุลทุกประเภทและส่งผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์ ดีเอ็นเอ (DNA) อาร์เอ็นเอ(RNA) โดยพบว่าในระยะสั้นอนุมูลอิสระจะส่งผลต่อการอักเสบ การทำลายเนื้อเยื่อ ในระยะยาวจะส่งผลให้เซลล์เสื่อมหรือเกิดการแก่ของเซลล์ แต่หากมีปริมาณอนุมูลอิสระมากเกินกว่าร่างกายจะกำจัดได้จะทำให้เกิดสภาวะที่เรียกว่า “Oxidative stress” โดยภายใต้สภาวะนี้อนุมูลอิสระจะส่งผลต่อการทำลายระบบต่าง ๆ ในร่างกายให้เสียสมดุลและส่งผลเสียต่อเซลล์ ทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต รวมทั้งเป็นสาเหตุของความชราและโรคต่าง ๆ เช่น โรคความจำเสื่อม (Alzheimer’s disease) ไขข้ออักเสบ (Arthritis) โรคหัวใจขาดเลือด (Coronary heart disease) ความผิดปกติของปอดและระบบประสาท โรคเกี่ยวกับระบบทางเดินหายใจ หรือโรคมะเร็ง (Cancer) ซึ่งเป็นสาเหตุแห่งการเสียชีวิตอันดับต้น ๆ ของคนไทยและคนทั่วโลก ดังนั้น ในร่างกายของมนุษย์จึงมีกระบวนการต้านหรือกำจัดอนุมูลจำพวกนี้อยู่แล้วโดยอาศัยการสร้างเอนไซม์หรือสารต่าง ๆ ที่มีความเข้มข้นต่ำ ๆ หรือได้รับจากการรับประทานอาหาร เช่น เบต้า-แคโรทีน (β-carotene) วิตามินซี (Vitamin C) ซึ่งเป็นสารพฤกษเคมีที่สามารถพบในพืชผักและผลไม้ โดยสามารถชะลอหรือป้องกันการสร้างอนุมูลอิสระพวกนี้ได้ โดยสารที่สามารถป้องกัน ยับยั้ง หรือทำลายอนุมูลอิสระพวกนี้ได้เรามักเรียกว่าสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant)

สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) คือ สารที่มักพบในอาหารจำพวก พืชผัก และผลไม้ เป็นโมเลกุลของสารที่สามารถจับกับอนุมูลอิสระ เพื่อยับยั้งป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่นั้น โดยมักยับยั้งอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในเซลล์ที่ใช้ออกซิเจน ได้แก่ Superoxide radical ($O_2^{\bullet -}$), Peroxyl radicals ($O_2^{\bullet -2}$), Hydroxyl radicals ($OH^{\bullet -}$) และ Peroxyl radical ($ROO^{\bullet}$) เพื่อไม่ให้อนุมูลอิสระเหล่านี้ก่อตัวขึ้นได้อีก โดยสารต้านอนุมูลอิสระมีมากมายหลายชนิดที่ทำหน้าที่แตกต่างกันไป สารต้านอนุมูลอิสระในธรรมชาติมักไม่ก่อให้เกิดผลข้างเคียง จึงมีบทบาทสำคัญในการบำรุงรักษาและป้องกันการเกิดโรคเช่น โรคเสื่อมของเนื้อเยื่อ (Degenerative diseases) หัวใจและสมองขาดเลือด (Cardiac and cerebral ischema) การอักเสบของเนื้องอก (Tumour inflammation) เป็นต้น ฉะนั้นการจะต่อต้านหรือยับยั้งโรคเหล่านี้ได้จึงต้องอาศัยสารต้านอนุมูลอิสระจากภายนอกร่างกาย เช่น วิตามินซี (Vitamin C) วิตามินอี (Vitamin E) ฟลาโวนส์(flavones) เบต้า-แคโรทีน (β-carotene) และผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ได้จากพืช โดยสารต้านอนุมูลอิสระจะมีทั้งที่เป็นเอนไซม์และไม่เป็นเอนไซม์ หรือสารประกอบที่ละลายในน้ำและสารประกอบที่ละลายในไขมัน โดยสารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้มักมีกลไกในการทำงานต้านอนุมูลอิสระด้วยกันหลากหลายแบบ เช่น การดักจับอนุมูลอิสระ (Radical scavenging) การยับยั้งการทำงานของออกซิเจนที่ขาดอิเล็กตรอน (Singlet oxygen quenching) จับกับโลหะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Metal chelation) หยุดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระ (Chain-breaking) เสริมฤทธิ์ (Synergism) และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (Enzyme inhibition) ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ เป็นต้น (บุหรัน พันธุ์สวรรค์, 2556 ;

เรณู คำหอม, 2559 ; เนตรนภา เมยกลางและเฉลิม เรืองวิริยะชัย, 2557 ; ปิยศิริ สุนทรนนท์ และคณะ, 2557 ; Ames B. N. *et al*, 1993 ; Stankovic M., 2011 ; Doughari J. H., 2012)

2.7.1 การหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระโดยรวม (Determination of total antioxidant compounds)

1) การหาปริมาณฟีนอลิกรวม (Total phenolic content) มีหลักการคือ เป็นการวัดปริมาณความเข้มข้นของสารประกอบทั้งหมดที่มีหมู่ไฮดรอกซิลที่อยู่ในโมเลกุล โดยไม่คำนึงถึงน้ำหนักโมเลกุลของสารประกอบฟีนอลิกนั้น ๆ ดังนั้น การวิเคราะห์ในรูปแบบนี้จึงไม่มี การระบุชนิดและโครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิกที่มีอยู่ในสารตัวอย่าง

การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกด้วยวิธีโฟลิน-ซิโอแคลตู (Folin-Ciocalteu method) โดยใช้หลักการแตกตัวของฟีนอลิก (Phenolic) เป็นโปรตอนและไอออนลบของ ฟีนอลเลท (Phenolate) ซึ่งไอออนลบจะไปรีดิวซ์ โฟลิน-ซิโอแคลตูรีเอเจนท์ (Folin-Ciocalteu reagent) ได้เป็นสารละลายสีน้ำเงิน การวิเคราะห์ปริมาณ ฟีนอลิกจึงเป็นการวัดความสามารถของการรีดิวซ์ในลักษณะเดียวกับการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ การศึกษาส่วนใหญ่จึงพบความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระกับปริมาณ ฟีนอลิก อย่างไรก็ตาม ยังมีสารชนิดอื่นที่ไม่ใช่ฟีนอลิก เช่น น้ำตาลอะโรเมติกเอมีน กรดแอสคอบิก กรดอินทรีย์ และอื่น ๆ อีกมาก ที่สามารถรีดิวซ์ โฟลิน-ซิโอแคลตู รีเอเจนท์ ได้สีน้ำเงินเช่นเดียวกัน จึงทำให้การรายงานผลนั้นสูงเกินจริง การวิเคราะห์นี้จะใช้กรดแกลลิก (Gallic acid) เป็นสารมาตรฐานแล้วรายงานอยู่ในรูปของ Gallic Acid Equivalent (GAE) ในหน่วยของมิลลิกรัมแกลลิก/กรัมตัวอย่างและคำนวณ ดังสมการ (2.3) (วรานนท์ ทองอินลา และคณะ, 2557)

$$\text{Gallic Acid Equivalent (GAE)} = \frac{\text{มิลลิกรัมกรดแกลลิก (mg gallic acid)}}{\text{กรัมของสารสกัดตัวอย่าง (g extract)}} \quad \ldots (2.3)$$

2) การหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoid Content) เป็นการหาปริมาณฟลาโวนอยด์โดยวิธีการวิเคราะห์ด้วยการเปรียบเทียบความเข้มของสี (colorimetric method) โดยใช้อลูมิเนียมคลอไรด์ ($AlCl_3$) (เพชรรุ่ง เทพทอง และคณะ, 2555)

มีหลักการที่เกี่ยวข้องคือการใช้วิธีการตรวจวัดสี (Colorimetric) โดยอลูมิเนียมคลอไรด์ ($AlCl_3$) และโซเดียมไนเทรต ($NaNO_2$) ทำปฏิกิริยากับ สารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 506.0 นาโนเมตร

จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปวัดหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์จากกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของเควอร์ซิติน และค่าการดูดกลืนแสงในหน่วย Quercetin equivatents (QE) มิลลิกรัม/กรัมตัวอย่าง และคำนวณดังสมการ (2.4)

$$\text{Quercetin equivatents (QE)} = \frac{\text{มิลลิกรัมเควอร์ซิติน (mg Quercetin)}}{\text{กรัมของสารสกัดตัวอย่าง (g extract)}} \quad \ldots (2.4)$$

สำหรับกลไกในการต้านอนุมูลอิสระของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์นั้น มีรายงานการศึกษาอย่างกว้างขวาง แต่ทั้งนี้ยังไม่มีรายงานยืนยันที่ชัดเจนถึงกลไกการออกฤทธิ์ อย่างไรก็ตามกลไกหลักในการออกฤทธิ์

ของสารกลุ่มนี้เป็นสารต้านออกซิเดชันโดยหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ (Chain breaking antioxidant) ในการยับยั้งหรือขจัดอนุมูลอิสระ โดยทำหน้าที่เป็นตัวให้ไฮโดรเจนแก่อนุมูลเหล่านั้น หลังจากที่ฟลาโวนอยด์ถูกออกซิไดซ์แล้วจะได้อนุมูลของฟลาโวนอยด์ฟีนอกซิลเป็นผลิตผล และอนุมูลที่ได้นี้มีความเสถียรมากกว่า เนื่องจากโครงสร้างของฟลาโวนอยด์มีการเคลื่อนที่ของอิเล็กตรอนตลอดเวลา (Electron delocalize) ดังแสดงในปฏิกิริยา

$$\text{Flavonoids-OH} + R^{\bullet} \longrightarrow \text{Flavonoid-O}^{\bullet} + RH$$

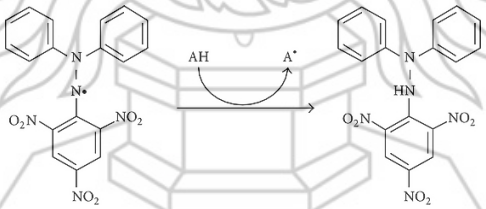
2.7.2 การหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Determination of antioxidant activity)

การหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเป็นการทดสอบเชิงปริมาณโดยต้องทราบความเข้มข้นที่แน่นอนของอนุมูลอิสระและวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งหรือกำจัดอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างที่สนใจโดยวัดปริมาณอนุมูลอิสระที่ลดลงหรือที่เหลือโดยอาศัยการดูดกลืนแสงที่วัดโดยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ โดยมีอยู่หลายวิธีที่นิยมใช้ ได้แก่ (บุหรัน พันธุ์สวรรค์, 2556)

1) การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (Diphynyl-Picryhydrazyl (DPPH) Radical Scavenging Assay)

เป็นการเป็นการทดสอบด้วยวิธีทางเคมีโดยใช้สารที่มีคุณสมบัติเป็นอนุมูลอิสระในที่นี้ก็คืออนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH$^{\bullet}$, diphenyl-picryhydrazyl radical) ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่คงตัว และมีสีม่วงสามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดโดยใช้เครื่องสเปกโตโฟโตรมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 515.0 นาโนเมตร เมื่อ DPPH$^{\bullet}$ ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระที่ละลายด้วยเอทานอล (สารที่ให้อิเล็กตรอน) จะทำให้สีม่วงจางลง ๆ จนเป็นสีเหลือง ดังสมการ (2.5) ซึ่งก่อนนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงต้องตั้งทิ้งไว้ที่มืดเป็นเวลา 30 นาทีเพื่อให้เกิดปฏิกิริยา ทำให้สามารถหาการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างได้จากการคำนวณสีที่จางลงของการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH สูตรคำนวณได้จากการนำค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงจากการใส่ตัวอย่างเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้น (ก่อนใส่สารตัวอย่าง) ดังสมการ (2.6)

$$DPPH^{\bullet} + AH \longrightarrow DPPH\text{-}H + A^{\bullet} \quad \ldots (2.5)$$



DPPH$^{\bullet}$ (สีม่วง) DPPH-H (สีเหลือง)

$$\text{สูตรการคำนวณ DPPH radical scavenging (\%)} = \left[\frac{(A_0-(A_s-A_{s0})}{A_0}\right] \times 100 \quad \ldots (2.6)$$

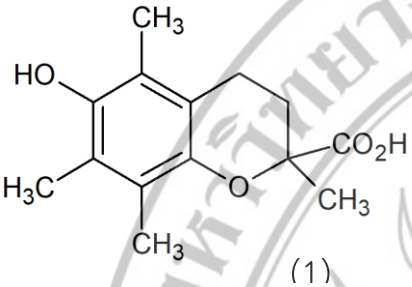
โดย A_0 = ค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้น

A_s = ค่าการดูดกลืนแสงหลังจากเติมสารตัวอย่าง

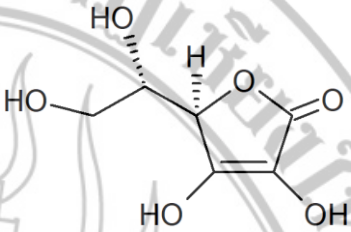
A_{S0} = ค่าการรบกวนการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง

สารมาตรฐานที่ใช้ในการเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ คือ โทรล็อกซ์ (Trolox, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchlorman-2-carboxylic acid) และวิตามินซี (Ascorbic acid) นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ มาคำนวณหาร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ (% ABTS free-radical inhibition) จากนั้นหาค่า

(Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity : VCEAC) ทำการสร้างกราฟมาตรฐานจากสารละลายมาตรฐานวิตามินซี (Ascorbic acid) และหาค่า (Trolox equivalent antioxidant capacity : TEAC) โดยการสร้างกราฟมาตรฐานจากสารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์ จากนั้นหาความเข้มข้นของสารสกัดตัวอย่าง ที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากกราฟมาตรฐาน นำไปคำนวณหาค่า (Vitamin C equivalent antioxidant capacity : VCEAC) ในรูปมิลลิกรัมของวิตามินซี ต่อกรัมของสารสกัดตัวอย่าง (mg Vitamin C/g extract) และนำไปคำนวณหาค่า (Trolox equivalent antioxidant capacity : TEAC) ในรูปมิลลิกรัมของโทรลอกซ์ต่อกรัมของสารสกัดตัวอย่าง (mg Trolox /g extract)



(1)



(2)

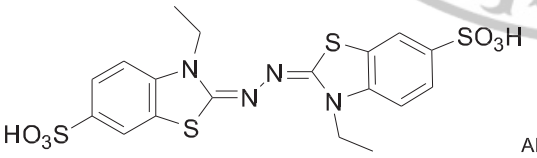
รูป 2.11 โครงสร้างของโทรลอกซ์ (1) และวิตามินซี (2)

ข้อดีของวิธีนี้ คือ ง่าย สะดวก และรวดเร็ว ส่วนข้อเสีย คือ $DPPH^{\bullet}$ ค่อนข้างเสถียรไม่ไวต่อปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกายจริง จึงทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ช้า ทำให้ค่าการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่วัดได้น้อยกว่าความเป็นจริง และต้องวัดในปฏิกิริยาที่เป็นแอลกอฮอล์ ซึ่งจะทำให้โปรตีนตกตะกอนจึงไม่สามารถวิเคราะห์ในตัวอย่างที่เป็นเลือดได้ อีกทั้งสารปนเปื้อนและโลหะจะรบกวน (Interfere) ซึ่งสามารถเป็นตัวรีดิวซ์แล้วทำให้สีของอนุมูลอิสระ DPPH จางลงได้เช่นกัน

2) การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (ABTS radicalcation decolorization assay)

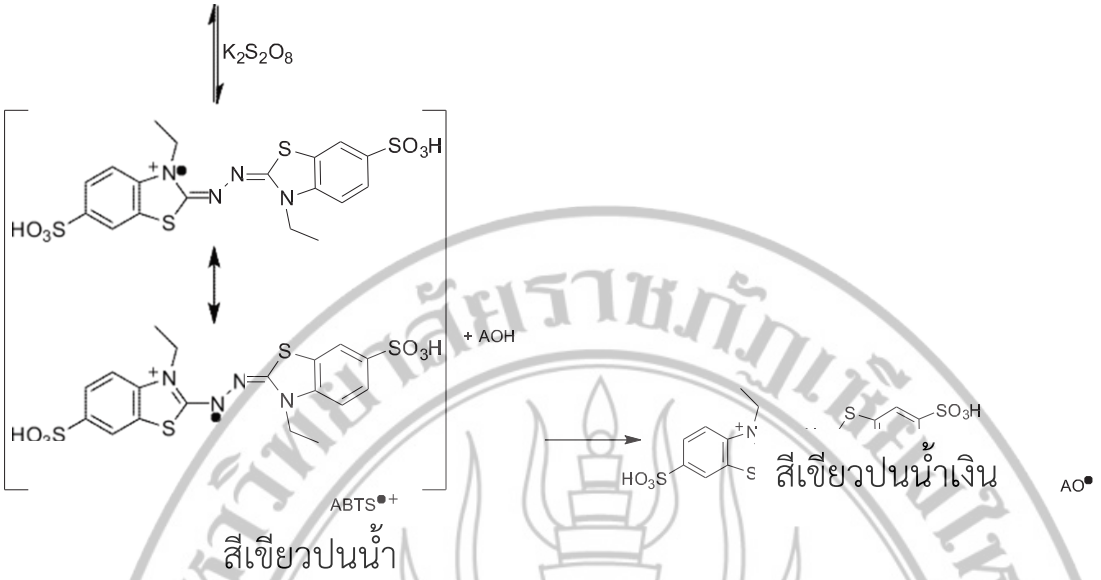
เป็นวิธีการวัดความสามารถในการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส ($ABTS^{\bullet+}$,2,2′-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical) เป็นสารสังเคราะห์ที่มีสีเขียวปนน้ำเงินสามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 734.0 นาโนเมตร เนื่องจากสีของ $ABTS^{\bullet+}$ ปกติจะมีค่าการดูดกลืนแสงสูง จึงต้องทำการเจือจาง $ABTS^{\bullet+}$ ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จากนั้นนำ $ABTS^{\bullet+}$ ทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่างที่ละลายด้วยเอทานอลเจือจางซึ่งจะทำให้สีจางลง และตั้งทิ้งไว้เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา จึงสามารถหาความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างได้จากการคำนวณสีที่จางลงของการยับยั้งอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ ซึ่งวิธีการคำนวณและการเทียบกับสารมาตรฐานโทรลอกซ์ และวิตามินซี กระทำเช่นเดียวกับวิธี DPPH

ข้อดีของวิธีการนี้ คือ $ABTS^{\bullet+}$ ละลายได้ดีในน้ำ และตัวทำละลายอินทรีย์จึงทำปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็ว และทำปฏิกิริยาได้ดีในช่วง pH กว้าง ส่วนข้อเสีย คือ $ABTS^{\bullet+}$ ไม่เป็นสารธรรมชาติที่พบในร่างกายหรือในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต และต้องมีการทำปฏิกิริยากับสารอื่นก่อนถึงจะเกิดเป็นอนุมูลอิสระ



ABTS

ใสไม่มี



รูป 2.12 ปฏิกิริยาออกซิเดชันของ ABTS โดยใช้โพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟตเพื่อทำให้เกิด ABTS$^{\bullet+}$ และการทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ
ที่มา : Oliveira S.D. *et al.* (2014)

2.8 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (กิตติศักดิ์, 2556)

2.8.1 ความหมายของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คือ การนำเอา เซลล์ โพรโทพลาสต์เนื้อเยื่อ หรืออวัยวะส่วนต่างๆ ของพืช มาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ในสภาพปลอดเชื้อ ภายใต้สภาพแวดล้อมที่ควบคุม เช่น อุณหภูมิ และแสงสว่าง เป็นต้น

เนื่องจากพืชประกอบด้วยอวัยวะต่างๆ แต่ละอวัยวะก็ประกอบด้วยเนื้อเยื่อหลายชนิด คือ

1) การเพาะเลี้ยงพืชทั้งต้น (culture of intact plants) คือ การนำเอาเมล็ดมาเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ เช่น การเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้

2) การเพาะเลี้ยงคัพภะ (embryo culture) คือ การแยกเอาต้นอ่อน หรือคัพภะไม่ว่าแก่หรืออ่อนออกจากเปลือกหุ้มเมล็ดแล้วนำมาเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง เช่น การเพาะเลี้ยงคัพภะของมะพร้าวกะทิ

3) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และอวัยวะส่วนต่างๆ ของพืช (tissue and organ culture) คือ การเพาะเลี้ยงส่วนต่างๆ และอวัยวะของพืชที่แยกออกมาเพาะเลี้ยง เช่น ปลายยอด ปลายราก

4) การเพาะเลี้ยงแคลลัส (callus culture) คือ การเพาะเลี้ยงกลุ่มของเซลล์ที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ

5) การเพาะเลี้ยงเซลล์ หรือเซลล์แขวนลอย (cell or cell suspension culture) คือ การเพาะเลี้ยงเซลล์เดี่ยว หรือกลุ่มเซลล์ที่ได้มาจากแคลลัสในอาหารเหลวที่มีการเขย่าตลอดเวลา

6) การเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์ (protoplast culture) คือ การเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ไร้ผนังเซลล์

2.8.2 ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ปัจจุบันมีการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาประยุกต์ใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ อย่างมากมาย ทั้งในด้านเกษตรกรรม ชีววิทยา เภสัชวิทยา การแพทย์ และอุตสาหกรรม ได้แก่

1) การขยายพันธุ์พืชให้ได้ปริมาณมากในเวลาอันรวดเร็ว

การใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อผลิตต้นพันธุ์พืชเศรษฐกิจให้ได้ต้นพืชที่มีลักษณะดีเหมือนต้นพันธุ์เดิมสามารถทำได้โดยการนำชิ้นเนื้อเยื่อ (explant) มาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสมต่อพืชชนิดนั้นๆ จะสามารถเพิ่มจำนวนต้นพืชได้เป็นทวีคูณในระยะเวลาอันสั้น ต้นที่ได้จากการขยายพันธุ์แบบนี้เรียกว่า โคลน ซึ่งมีลักษณะเหมือนต้นพันธุ์เดิมทุกประการเพราะได้มาจากเซลล์ร่างกาย ตัวอย่างเช่น การขยายพันธุ์หญ้าหวานโดยการเลี้ยงชิ้นส่วนข้อบนอาหารวุ้นสูตรมูราชิเกะ และสกุ๊ก (Murashige & Skoog, 1962) หรือ สูตรเอ็มเอส (MS) ที่เติม ไคเนติน (Kinetin) ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร จะทำให้ได้ยอดที่ได้มีลักษณะแข็งแรงจำนวน 9 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ โดยใช้เวลา 4 สัปดาห์ หรือ 1 เดือน ดังนั้นหากเริ่มต้นใช้ชิ้นเนื้อเยื่อเพียง 1 ชิ้น แล้วทำการย้ายเลี้ยง (subculture) ลงอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม ไคเนติน ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ใหม่ทุกๆ 1 เดือนไปเรื่อยๆ ภายในเวลา 1 ปี (12 เดือน) จะสามารถผลิตต้นอ่อนหญ้าหวานได้มากถึง 282,429,536,481 ต้น (9^{12} ต้น) (กิตติศักดิ์, 2556)

2) การผลิตพืชปลอดโรค

การขยายพันธุ์โดยทั่วไปนั้นมักจะพบปัญหาการปนเปื้อนของเชื้อก่อโรคต่างๆ ทั้งที่แสดงอาการของโรคให้เห็น และไม่แสดงอาการจนกระทั่งนำไปปลูกเป็นเวลานานแล้วจึงแสดงอาการออกมาให้เห็น จนเป็นเหตุให้เกิดการสูญเสียทั้งเวลา ต้นทุน และแรงงาน ต่างจากการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชซึ่งสามารถขยายพันธุ์พืชปลอดโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากเทคนิคดังกล่าวเป็นการเลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาพปลอดเชื้อ และหากเกิดการปนเปื้อน (contamination) เชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ โดยเฉพาะเชื้อรา และแบคทีเรียจะแสดงอาการปนเปื้อนออกมาบนอาหารสังเคราะห์อย่างชัดเจนทันทีเนื่องจากเชื้อรา และแบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วบนอาหารสังเคราะห์ทำให้สามารถคัดแยกต้นพันธุ์ที่มีการปนเปื้อนออกได้ก่อน ในกรณีการปนเปื้อนของไวรัสซึ่งเป็นจุลินทรีย์ขนาดเล็กอาศัยในเซลล์พืชนั้นจะไม่แสดงอาการออกมาให้เห็น ดังนั้นจำเป็นจะต้องตรวจสอบเนื้อเยื่อก่อนการเลี้ยงเพื่อให้แน่ใจว่าปลอดเชื้อไวรัส เพราะหากพืชมีการปนเปื้อนไวรัสจะทำให้มีอาการผิดปกติหลายอย่าง ตัวอย่างเช่น พืชดอกที่ติดไวรัสนั้นดอกจะมีขนาดเล็กลง สีกลีบดอกผิดปกติ ผลผลิตลดลง กลีบดอกหยิก หรือ สีด่าง เพราะฉะนั้นปัจจุบันในแง่การค้าพืชสวนประดับจะใช้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขยายพันธุ์ และพืชเศรษฐกิจบางชนิดจะมีมาตรฐานว่าต้นที่ขายต้องปลอดไวรัสโดยใช้วิธีทดสอบทางเทคโนโลยีชีวภาพ และบางทีอาจใช้เป็นเรื่องการกีดกันทางการค้าระหว่างประเทศได้ การผลิตพืชปลอดไวรัสนั้นสามารถทำได้โดยการเลือกเนื้อเยื่อส่วนที่ปลอดไวรัสมากที่สุดมาทำการเพาะเลี้ยง เช่น เนื้อเยื่อเจริญส่วนปลาย และคัพภะในเมล็ด ทั้งนี้เนื่องจากเนื้อเยื่อส่วนดังกล่าวนั้นไม่มีท่อน้ำ และท่ออาหารทำให้อนุภาคของไวรัสในลำต้นไม่สามารถเคลื่อนที่ไปถึงได้ ตัวอย่างเช่น การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดของกล้วยไม้จะทำให้ได้ต้นกล้วยไม้ที่ปลอดไวรัส เป็นต้น

3) การปรับปรุงพันธุ์พืช

งานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชด้านต่างๆ ได้หลาย

ด้าน ดังนี้

3.1) การสร้างพืชมอโนพลอยด์ (monoploidization)

สามารถทำได้โดยการเพาะเลี้ยงส่วนสืบพันธุ์ของพืชเช่น อับเรณู ละอองเรณู หรือไข่อ่อน ซึ่งมีโครโมโซมชุดเดียว (1n) ทำให้ได้พืชที่มีโครโมโซมชุดเดียว เพื่อใช้ประโยชน์ในการสร้างพืชพันธุ์แท้ที่มีโครโมโซม 2 ชุด (2n) เหมือนกันทุกประการ (homozygous plant) โดยการกระตุ้นให้เกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซมเป็นสองเท่า (double chromosome) ด้วยสารโคลชิซิน (colchicines) ซึ่งปกติการผลิตพืชพันธุ์แท้จะต้องใช้การผสมตัวเองอย่างน้อย 6 รุ่นขึ้นไปจึงจะคงที่ ประโยชน์ของพืชพันธุ์แท้ คือ ให้ลักษณะที่ดี ผลใหญ่ ดอกใหญ่ นิยมใช้กับผัก ไม้ดอก และพืชไร่

3.2)การสร้างพืชพอลีพลอยด์ (polyploidization)

ต้นพืชที่เซลล์ดังกล่าวมีโครโมโซมสองชุดหรือ 2n นั้นเรียกว่า ดิพลอยด์ (diploid) ส่วนต้นพืชที่มีโครโมโซมมากกว่าสองชุด เรียกว่า พอลิพลอยด์ (polyploid) เช่น พืชที่มี 3n, 4n, 5n และ 6n นั้นเรียกว่า ทริพลอยด์ (triploid) เตตราพลอยด์ (tetraploid) เพนตาพลอยด์ (pentaploid) และ เฮคซาพลอยด์ (hexaploid) ตามลำดับ การชักนำให้จำนวนโครโมโซมในเซลล์ของพืชเกิดการเพิ่มขึ้นมากกว่าเดิมสามารถทำได้โดยการสารเคมี เช่น โคลชิซิน นิยมใช้เทคนิคนี้กับกล้วยไม้ เนื่องจากกล้วยไม้ที่เป็นพอลีพลอยด์จะมีลักษณะของต้น และดอกเปลี่ยนแปลงไป เช่น ลำต้นจะอวบใหญ่ปล้องสั้น และต้นเตี้ยลง ลำต้นอาจจะแข็งแรง หรือโตเร็วกว่า ใบจะกว้างขึ้น หนาขึ้น และสีเขียวเข้มขึ้น ส่วนดอกจะมีขนาดใหญ่ขึ้น และสีเข้มขึ้น (ครรชิต, 2541) นอกจากนี้ยังสามารถเพาะเลี้ยงพืชที่มีจำนวนโครโมโซม 3 ชุด (triploid) ได้โดยการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของเอนโดสเปิร์ม (3n) เพื่อผลิตพืชที่ไม่มีเมล็ด เช่น แตงโมไร้เมล็ด เป็นต้น

4) การแก้ปัญหาการผสมพันธุ์

การสร้างความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยการผสมพันธุ์นั้น บ่อยครั้งที่การผสมพันธุ์ล้มเหลวเนื่องจากความเข้ากันไม่ได้ระหว่างพ่อแม่พันธุ์ การถ่ายละอองเกสรในหลอดทดลอง การปฏิสนธิในหลอดทดลอง การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโออ่อน การเพาะเมล็ดอ่อนตลอดจนการผสมโพรโทพลาสต์(protoplast fusion) ต่างเป็นวิธีทางการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ช่วยให้นักปรับปรุงพันธุ์พืชผลิตลูกผสมใหม่ ๆ ซึ่งไม่มีโอกาสสำเร็จได้ด้วยวิธีปกติ เช่น ลูกผสมระหว่างมะเขือเทศ และมันฝรั่งลูกผสม 5 สกุลของกล้วยไม้ ลูกผสมผักในวงศ์กะหล่ำตลอดจนลูกผสมยาสูบ เป็นต้น

5) การคัดเลือกพันธุ์พืช

เซลล์พืชจำนวนมากสามารถเพาะเลี้ยงได้โดยใช้พื้นไม่มาก ทำให้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเหมาะสมแก่การคัดเลือกพันธุ์พืช เพราะเซลล์หนัก 1 กรัมจะมีจำนวนไม่น้อยกว่า 100,000 เซลล์ การคัดเลือกพันธุ์ในหลอดทดลองนั้นใช้องค์ประกอบของอาหารเป็นตัวคัดเลือก เช่น การเติมเกลือลงในอาหารเพื่อคัดเลือกพืชทนเค็ม การเติมพอลีเอทิลีนไกลคอล (polyethylene glycol) น้ำหนักโมเลกุลสูงลงในอาหารเพื่อคัดเลือกพืชทนแล้ง เป็นต้น ทั้งนี้การคัดเลือกต้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไว้ในสภาพการคัดเลือกให้นานเพียงพอและใช้ตัวคัดเลือกที่ระดับความเข้มข้นซึ่งเหมาะสมด้วย เพื่อป้องกันการปรับตัวทางสรีรวิทยาชั่วคราวของเซลล์ในเนื้อเยื่อที่ต้องการคัดเลือก

นอกจากประโยชน์ด้านการปรับปรุงพันธุ์ที่กล่าวแล้วทั้ง 4 ข้อ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยังช่วยทำให้งานพันธุวิศวกรรมระดับโมเลกุลสำเร็จได้อีกด้วยเพราะทำให้เซลล์เพียงเซลล์เดียวซึ่งถูกถ่ายยีนส์พัฒนาเป็นต้นพืชแปลงพันธุ์ได้

6) การผลิตสารเคมีจากพืช

พืชเป็นแหล่งผลิตสารเคมีที่มีประโยชน์กับการดำรงชีวิตของมนุษย์หลายชนิด เช่น สารให้สี

กลิ่น และรสชาติ ใช้เป็นสารต้านแมลง และใช้ด้านเภสัชวิทยา ซึ่งมีประโยชน์ในทางอุตสาหกรรม แต่สารเหล่านี้มีปริมาณที่น้อยมากในพืชธรรมชาติจึงจำเป็นจะต้องใช้พืชจำนวนมากในการผลิต การปลูกพืชในแปลงเพื่อผลิตสารเหล่านี้ทำให้ต้องสิ้นเปลืองพื้นที่ และต้องพึ่งสภาพแวดล้อม การใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อผลิตสารทุติยภูมิจะมีประโยชน์อย่างยิ่ง เนื่องจากให้สารที่มีคุณสมบัติคงที่ไม่ขึ้นกับสภาวะแวดล้อม และยังสามารถชักนำให้ผลิตสารได้มากกว่าในธรรมชาติ โดยการเพาะเลี้ยงในสภาพเครียดเพื่อกระตุ้นให้พืชสร้างสารออกมามากขึ้น หรือการเพาะเลี้ยงแบบเซลล์แขวนลอย (suspension culture) ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (bioreactor) คล้ายกับการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ ช่วยให้การผลิตสารที่ต้องการทำได้ตลอดเวลาโดยเสียค่าใช้จ่ายต่ำลงตัวอย่างของสารเคมีที่ผลิตได้ เช่น อินซูลิน (insulin) จากมะระ แคพไซซิน (capsaicin) จากพริก ซาโปนิน (saponins) จากโสม และ เซอร์เพนทีน (serpentine) จากแพงพวยฝรั่ง เป็นต้น จะเห็นได้ว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชช่วยเพิ่มปริมาณและคุณภาพของผลผลิตตลอดจนลดต้นทุนการผลิต ทำให้การพัฒนาอุตสาหกรรมการเกษตรเป็นไปได้อย่างรวดเร็ว

7) การศึกษาทางชีวเคมี และสรีรวิทยาของพืช

ชิ้นส่วนพืชที่เลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สามารถติดตามการพัฒนา และการเปลี่ยนแปลงต่างๆ ได้อย่างชัดเจน ถูกต้อง และแม่นยำ เนื่องจากไม่มีจุลินทรีย์จากภายนอกมารบกวน ไม่มีอิทธิพลของเนื้อเยื่อหรืออวัยวะอื่นๆ จึงทำให้ชิ้นเนื้อเยื่อ (explant) ที่ต้องการศึกษาสามารถแสดงศักยภาพได้ง่ายกว่า เช่น เกิดตายอด ราก ตาดอก เป็นต้น จึงนิยมนำมาศึกษาสัญฐานวิทยา อีกทั้งยังสามารถควบคุมสภาพแวดล้อมได้ง่ายกว่าสภาพธรรมชาติ เช่น แสง อุณหภูมิ ธาตุอาหาร ฮอร์โมน ค่าความเป็นกรดด่าง ก๊าซในบรรยากาศรอบๆ เนื้อเยื่อที่เราเลี้ยง นอกจากนี้ยังใช้เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง ผู้อาศัย (host) และ ปรสิต (parasite) เพื่อศึกษาเกี่ยวกับจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ เช่น ไรโซเบียม กับการเกิดปมในรากถั่ว เป็นต้น

8) การเก็บรักษา และการแลกเปลี่ยนพันธุ์พืช

ในปัจจุบันพันธุ์หายากหลายชนิดได้สูญพันธุ์ไป และหลายชนิดกำลังใกล้จะสูญพันธุ์ สาเหตุสำคัญเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม และการกระทำของมนุษย์เอง เนื่องจากการขยายพันธุ์พืชโดยการปลูกพืชไว้ในแปลงขนาดใหญ่ และการเก็บเมล็ด หรือหัวพันธุ์ไว้มีปัญหาหลายอย่างคือ 1. การเข้าทำลายของโรค และแมลง 2. ความผิดปกติของสภาพอากาศ 3. อุบัติภัยตามธรรมชาติ และ 4. ปัญหาด้านเศรษฐกิจ นอกจากนี้พืชหลายชนิดยังมีเมล็ดซึ่งมีอายุสั้น เช่น ยางพารา กาแฟ หรือต้องใช้พื้นที่ขนาดใหญ่และแรงงานมาก กรณีที่พืชนั้นขยายพันธุ์ด้วยวิธีไม่อาศัยเพศเท่านั้น เช่น กล้วย มันฝรั่ง มันเทศ มะม่วง เป็นต้น การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงเป็นทางเลือกที่ดีกว่าวิธีปกติ เนื่องจากสามารถเก็บชิ้นส่วนพืชพืชขนาดเล็ก ๆ ไว้ในอาหารที่ผสมสารชะลอการเจริญเติบโต หรือสารที่ดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อเพื่อทำให้พืชมีการเจริญเติบโตในอัตราที่ช้ามากๆ เป็นการประหยัดเวลา แรงงาน ค่าใช้จ่าย และสามารถคงสภาพความมีชีวิตได้ยาวนาน เนื่องจากไม่จำเป็นต้องเปลี่ยนอาหารบ่อยครั้งตามปกติ นอกจากนี้ยังมีวิธีการเก็บรักษาเซลล์ หรือเนื้อเยื่อในไนโตรเจนเหลวที่มีอุณหภูมิต่ำถึง -196 องศาเซลเซียส ซึ่งสามารถเก็บรักษาเนื้อเยื่อไว้ได้นานโดยไม่จำเป็นต้องเปลี่ยนอาหาร ข้อดีของการเก็บรักษาพันธุ์พืชโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชคือ ใช้พื้นที่น้อย สามารถใช้พื้นที่แนวตั้งได้ ลดความเสี่ยงในการเก็บรักษาจาก โรค แมลง และการสูญหาย สามารถเลี้ยง และเก็บรักษาได้ทุกฤดูกาล สามารถส่งพันธุ์พืชเพื่อแลกเปลี่ยนกับประเทศอื่นๆ ได้ง่าย เพราะกฎหมายบางประเทศจะเข้มงวดมาก เช่น ออสเตรเลีย ญี่ปุ่น ข้อเสีย คือ เมื่อเก็บไว้นานๆ อาจจะเกิดการกลายพันธุ์ได้ ถ้าสภาพที่เก็บไม่เหมาะสม หรือเก็บไว้นานๆ ทำให้ความสามารถในการงอกเป็นต้นใหม่ลดลงจึงเก็บในอุณหภูมิต่ำอย่างยิ่งยวด คือ -196 องศาเซลเซียส ในไนโตรเจนเหลว จะหยุดกระบวนการต่างๆ ภายในเซลล์

2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เกสินี ธนากรเมธา และคณะ (2557) ได้ทำการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์ KB ของเอื้องทอง (*Dendrobium ellipsophyllum*) ซึ่งเป็นพืชสกุลเดียวกับเอื้องคำ โดยทำการสกัดด้วยเมทานอล จากผลการศึกษาพบว่าสามารถแยกสารบริสุทธิ์จากเอื้องทองได้ทั้งหมด 4 ชนิด คือ 4,4′-dihydroxy-3,5-dimethoxybibenzyl, 4,5,4′-trihydroxy-3,3'dimethoxybibenzyl, (2S)-homoeriodictyol และ luteolin ซึ่งสารทั้งหมดพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีโดยเทคนิคสเปกโตรสโคปี (NMR, MS) ร่วมกับการเปรียบเทียบข้อมูลที่เคยมีรายงานมาก่อน ซึ่งสารที่มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่อง ปาก KB ในระดับปานกลาง คือ 4,5,4′-trihydroxy-3,3′-dimethoxybibenzyl และ luteolin โดยมีค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งช่องปาก KB ได้ 50% (IC50) คือ 61.93 และ 96.87 µM ตามลำดับ ซึ่งมีชุดควบคุมผลบวก คือ ellipticine (IC50 4.99 µM) และ doxorubicin (IC50 1.53 µM)

วรพล ศีลศร และคณะ (ม.ป.ป.) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging วิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวม และแอนโทไซยานินรวมของสารสกัดกล้วยไม้หวายม่วงแดง (*Dendrobium Sonia*) ซึ่งเป็นพืชสกุลเดียวกันกับเอื้องคำ ใน 2 สภาวะ คือ กรด และกลาง สารสกัดหยาบที่ได้ถูกนำมาสกัดต่อด้วยเฮกเซนและเอทิลอะซิเตท ตามลำดับ พบว่าสารสกัดส่วนเอทิลอะซิเตท สภาวะกลาง แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณ ฟีนอลิกรวมสูงกว่าสารสกัดส่วนอื่น ๆ (ร้อยละ 90.39 ±0.44 และ 863.13 ± 5.11 mgGAE/ 100 g crude extract ตามลำดับ) นอกจากนี้สารสกัดส่วนน้ำ สภาวะกรดมีปริมาณแอนโทไซยานินรวมสูงที่สุด (0.052 ± 0.016 µg/ml)

นิสา จุลโพธิ์ (2559) ได้ศึกษาสารพฤกษาเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกกล้วยไม้สกุลหวาย 4 ชนิด คือ สายพันธุ์เอียสกุล สายพันธุ์เจสซิก้า สายพันธุ์บูรณะเจต และ สายพันธุ์ข้าว 5 เอ็น พบสารพฤกษาเคมีต่างๆ คือเทอร์พีนอยด์ สเตียรอยด์ คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ ฟลาโวนอยด์ แทนนิน และคูมาริน นอกจากนี้ยังได้ศึกษาหาสารต้านอนุมูล ด้วยวิธี DPPH free radical scavenging พบว่าสายพันธุ์ขาว 5 เอ็น มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดที่ความ เข้มข้น 250.00 µg/mL (27.28%) รองลงมาเป็นสายพันธุ์เจสซิก้า (25.52%) สายพันธุ์บูรณะเจต (23.81%) และสายพันธุ์เอียสกุล (14.50%) ตามลำดับ

Ranjitha และคณะ (2016) ได้ศึกษา ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของพืชจำนวน 20 ชนิด สกัดโดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย และสกัดด้วยวิธี maceration โดยทดสอบกับเชื้อทั้งหมด 3 เชื้อคือ Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus และ Escherichia coli พบว่าพืชทุกชนิดมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบได้ และในบรรดาพืชวงศ์ Orchidaceae กล้วยไม้ *Coelogyne nervosa* มีฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อได้ดีที่สุด

กิตติศักดิ์ (2558) ได้พัฒนาอาหารอย่างง่ายจากสารละลายธาตุอาหารสำหรับปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อม่วงเทพรัตน์ (*Exacum affine* Balf. f. ex Regel) และหญ้าหวาน (*Stevia rebaudiana* Bertoni) โดยการนำชิ้นส่วนข้อของม่วงเทพรัตน์ และหญ้าหวานมาเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นจากสารละลายธาตุอาหารสำหรับปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน ชื่อทางการค้า Hydrowork สูตรสำหรับผักสลัด stock A และ B ความเข้มข้นอย่างละ 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิลิตรต่อลิตร เติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารโดยการเติมน้ำยาฟอกผ้าขาว Haiter สูตรมาตรฐาน 0.1 มิลลิลิตรต่อลิตร เปรียบเทียบ

กับอาหารวุ้นสูตร MS ที่ฆ่าเชื้อโดยหม้อนึ่งความดันไอ และการเติมน้ำยาฟอกผ้าขาว ทุกชุดการทดลองถูกนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 5 สัปดาห์ พบว่าอาหารวุ้นจากสารละลายสำหรับปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน stock A และ B ความเข้มข้นอย่างละ 5 มิลลิลิตรต่อลิตร สามารถชักนำให้พืชทั้งสองชนิดมีจำนวนยอด จำนวนใบ และความสูงของยอดมากกว่าอาหารสูตร MS ทั้งที่ฆ่าเชื้อโดยหม้อนึ่งความดันไอ และการเติมน้ำยาฟอกผ้าขาวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ดังนั้นอาหารสูตรดังกล่าวจึงสามารถใช้ทดแทนอาหารวุ้นสูตร MS ได้เนื่องจากส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ดีกว่า ต้นทุนถูกกว่า และขั้นตอนการเตรียมง่ายกว่า

กิตติศักดิ์ (2559) รายงานการศึกษาการใช้สารละลายธาตุอาหารสำหรับปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินทดแทนธาตุอาหารในสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อว่านสี่ทิศโดยการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนหัวของว่านสี่ทิศบนอาหารวุ้นที่เตรียมจากอาหารสำหรับปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน stock A และ B ความเข้มข้นเท่ากันอย่างละ 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิลิตรต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เป็น 5.7 เติมผงวุ้น 7 กรัมต่อลิตร นำไปต้มจนวุ้นละลาย รอจนอุณหภูมิของอาหารลดลงถึง 60 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมน้ำยาฟอกผ้าขาวไฮเตอร์ 0.1 มิลลิลิตรต่อลิตร เปรียบเทียบกับอาหารวุ้นสูตร MS ทำการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ในสภาพให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าชิ้นส่วนหัวว่านสี่ทิศที่เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นที่เตรียมจากอาหารสำหรับปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน stock A และ B ความเข้มข้นเท่ากันอย่างละ 3, 4 และ 5 มิลลิลิตรต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอด ความสูงของยอด และจำนวนราก ได้ไม่แตกต่างจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 แสดงให้เห็นว่าสารละลายธาตุอาหารสำหรับปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินสามารถใช้ทดแทนธาตุอาหารในสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อว่านสี่ทิศได้

กนกวรรณ และคณะ (2558) ศึกษาผลของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจากสารละลายสำหรับปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน(Hydroponics) ต่อการงอก และการเจริญเติบโตของเมล็ดเอื้องกุหลาบกระเป๋าเปิดโดยการเพาะเมล็ดบนอาหารวุ้นที่เตรียมจากสารละลายสำหรับปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน stock A และ B ความเข้มข้นอย่างละ 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิลิตรต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับอาหารสูตร Vacin and Went (VW) ทำการเพาะเลี้ยงในสภาพให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25±2 °C เป็นเวลา 16 สัปดาห์ พบว่าทุกสิ่งทดลองสามารถชักนำให้เกิดการงอกของเมล็ดได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ยกเว้นอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่ไม่เติมสารละลายปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินซึ่งทำให้เกิดการงอกของเมล็ดเพียง 24.44 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบว่าอาหารที่เตรียมจากสารละลายสำหรับปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน stock A และ B ความเข้มข้นอย่างละ 5 มิลลิลิตรต่อลิตร สามารถชักนำให้ต้นอ่อนที่งอกจากเมล็ดมีการเจริญเติบโตในระยะพัฒนาการที่ 6 มากที่สุดคือ 60 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมากกว่าสิ่งทดลองอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่เตรียมจากสารละลายสำหรับปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน stock A และ B ความเข้มข้นอย่างละ 5 มิลลิลิตรต่อลิตร มีประสิทธิภาพดี และสามารถนำมาใช้เป็นอาหารเพาะเลี้ยงเมล็ดเอื้องกุหลาบกระเป๋าเปิดทดแทนอาหารสูตร VW ได้ เนื่องจากสามารถชักนำให้ต้นอ่อนมีการเจริญเติบโตได้มากกว่า มีต้นทุนการเตรียมน้อยกว่า วิธีการเตรียมง่ายกว่า

วรรธนา และคณะ (2558) ศึกษาผลของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่เตรียมจากสารละลายธาตุอาหารสำหรับปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน ร่วมกับเครื่องดื่มชูกำลัง หรือเครื่องดื่มผสมวิตามิน 3 ชนิด โดยการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของหญ้าหวาน บนอาหารวุ้นที่ประกอบด้วย สารละลายธาตุอาหารปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินชื่อทางการค้า Hydro work (HW) สูตรสำหรับผักสลัด stock A และ B ความเข้มข้นอย่างละ 5 ml/Lน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และเติมกระทิงแดง หรือ M 150 หรือ Vitamix v 500 ความเข้มข้น 0, 5, 10 และ 15 ml/Lรวม 10 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 30 ซ้ำ เพาะเลี้ยงในสภาพให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าอาหารวุ้นสูตร HW ร่วมกับ Vitamix v 500 ความเข้มข้น 5 มิลลิลิตรต่อลิตรให้ต้นอ่อนมีการเจริญเติบโตสูงที่สุด ทั้งจำนวนยอด จำนวนใบ จำนวนรากและ ความสูงของยอด แสดงให้เห็นว่าอาหารวุ้นสูตรดังกล่าว สามารถใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการขยายพันธุ์หญ้าหวานได้ด้วยต้นทุนที่ต่ำ และวิธีการเตรียมที่ง่าย เหมาะสมที่จะส่งเสริมให้กับเกษตรกร และชุมชนต่างๆ เพื่อใช้ผลิตต้นพันธุ์หญ้าหวานเพื่อการค้าต่อไป

Chotikadachanarong (2013) ศึกษาผลของการใช้น้ำยาฟอกผ้าขาวเพื่อฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชทดแทนการใช้หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) เพื่อลดต้นทุน และขั้นตอนในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถูกศึกษาโดยการเตรียมอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) เติมน้ำตาลซูโครส 3% (w/v) และปรับค่า pH เป็น 5.8 ก่อนเติมผงวุ้น 7 g/L แล้วนำไปต้มจนเดือด จากนั้นรอจนอุณหภูมิของอาหารลดลงถึง 60 องศาเซลเซียส จึงเติมน้ำยาฟอกผ้าขาวความเข้มข้น 0.01, 0.05, 0.3 และ 0.5% (v/v) ลงในอาหาร คนให้เข้ากันก่อนเทใส่ขวดขนาด 4 ออนซ์ ขวดละ 20 mL แล้วปิดฝา โดยชุดควบคุมคืออาหารสูตรเดียวกันที่ใช้หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) อุณหภูมิ 121 ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที นำขวดอาหารทั้งหมดไปวางบนชั้นเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีการให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน ผลการทดลองไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในทุกชุดการทดลอง และเมื่อนำชิ้นส่วนข้อของม่วงเทพรัตน์ (*Exacum affine* Balf. f. ex Regel) มาเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS (1962) ที่ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์โดยการเติมน้ำยาฟอกผ้าขาวความเข้มข้น 0.01 และ 0.05% (v/v) พบว่าอาหารที่ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์โดยการเติมน้ำยาฟอกผ้าขาว 0.01% (v/v) มีการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อไม่แตกต่างจากชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารที่ผ่านการ autoclave ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

กิตติศักดิ์ (2558) รายงานการประยุกต์ใช้เครื่องใช้ในครัวเรือนที่มีราคาถูก เช่น หม้อนึ่งไอน้ำ และเตาไมโครเวฟเพื่อลดต้นทุนในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเพาะเลี้ยงเยื่อพืชทดแทนการใช้หม้อนึ่งความดันไอ โดยการนึ่งอาหารวุ้นสูตร MS ด้วยหม้อนึ่งไอน้ำเป็นเวลา 30 45 60 75 และ 90 นาทีหรือการฆ่าเชื้อด้วยเตาไมโครเวฟกำลังไฟ 360 600 และ 800 วัตต์ เป็นเวลา 3 นาที พบว่าการนึ่งด้วยไอน้ำอย่างน้อย 30 นาที สามารถฆ่าเชื้อในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้ 100% ในขณะที่ การใช้ไมโครเวฟกำลังไฟฟ้า 600 หรือ 800 วัตต์ เป็นเวลา 3 นาที ทำให้อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลอดเชื้อได้ 93% เมื่อนำอาหารที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยวิธีการนึ่งด้วยไอน้ำ 30 นาที และไมโครเวฟกำลังไฟ 600 วัตต์ เป็นเวลา 3 นาที มาใช้ในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของม่วงเทพรัตน์ กุหลาบหนูและหญ้าหวาน พบว่าการเจริญและพัฒนาของยอดที่เกิด จากข้อของพืชทั้งสามชนิดไม่แตกต่างกับการเลี้ยงบนอาหารที่ฆ่าเชื่อด้วยหม้อนึ่งความดันไออย่างมีนัยสำคัญทาง สถิติ ($p<0.05$)

สรุปได้ว่าหม้อนึ่งไอน้ำ และเตาไมโครเวฟ สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเพาะเลี้ยงเยื่อพืช ทดแทนการใช้หม้อนึ่งความดันไอได้

กิตติศักดิ์ (2561) ศึกษาผลของอาหารอย่างง่ายจากสารละลายสำหรับปลูกพืชโดยไม่ใช่ดิน และอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงต่อการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของลานไพลิน โดยนำชิ้นส่วนข้อของลานไพลินมาทำการฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลาย Haiter (6% sodium hypochlorite, NaOCl) ความเข้มข้น 10% เป็นเวลา 15 นาที แล้วเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่เตรียมจากสารละลายสำหรับปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน ชื่อทางการค้า Hydrowork สูตรสำหรับผักสลัด Stock A และ B ความเข้มข้นอย่างละเท่าๆ กันคือ 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิลิตรต่อลิตร เติมน้ำตาลทราย 30 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เป็น 5.7 เติมผงวุ้น 7 กรัมต่อลิตร เติมน้ำยาฟอกผ้าขาว Haiter 0.5 มิลลิลิตรต่อลิตร นำไปเพาะเลี้ยงสภาพให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ในห้องควบคุมอุณหภูมิ 25±2°C เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในห้องที่ไม่ควบคุมอุณหภูมิ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าทุกชุดการทดลองสามารถชักให้เกิดยอดเฉลี่ย 1.69 ถึง 1.92 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ และเมื่อทำการย้ายออกปลูกในสภาวะโรงเรือนเป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่ามีอัตราการรอดชีวิตของต้นอ่อน 100%

บัวสอน และอารยา (2557) ศึกษาการงอก และการพัฒนาต้นอ่อนเอื้องเขาแกะในสภาพปลอดเชื้อด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยนำเมล็ดเอื้องเขาแกะจากฝักอายุ 6 เดือนมาเลี้ยงบนสูตรอาหาร Murashige and Skoog (1962) (MS) และVacin and Went (1949) (VW) ร่วมกับการเติมสารควบคุมการเติบโต BA ที่ระดับความเข้มข้น 0, 3 และ 5 มก./ล. พบว่าเมล็ดเอื้องเขาแกะงอกได้ดีบนอาหาร MS ทุกสูตร โดยใช้เวลางอก 25 วัน และเมื่อเลี้ยงโปรโตคอร์มที่เกิดขึ้นอีก 60 วัน พบว่าโปรโตคอร์ม สามารถเจริญบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 3 มก./ล. ได้ดีที่สุด ขนาดโปรโตคอร์มเฉลี่ย 1.19 มม. จากนั้นนำโปรโตคอร์ม มาชักนำให้เกิดยอดและรากบนอาหาร VW และ VW ดัดแปลงเป็นเวลา 90 วัน พบว่าอาหาร VW ที่เติมน้ำมะพร้าว 100 มล./ล.สามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอด จำนวนใบ และจำนวนรากมากที่สุด เป็นจำนวนเฉลี่ย 4.4 ยอด 8.6 ใบ และ 3.5 ราก ตามลำดับ อาหารสูตร VW ที่เติมกล้วยหอมบด 100 ก./ล. สามารถชักนำให้เกิดรากยาวที่สุด เท่ากับ 3.5 ซม. และ ให้ความสูงต้นอ่อนสูงที่สุดเท่ากับ 1.63 ซม.

วุฒิชัย และสมปอง (2557) เพาะเลี้ยงแคลลัสกล้วยไม้เขากวางอ่อน และการชักนำเป็นพืชต้นใหม่ โดยนำแคลลัสวางเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด และความเข้มข้นต่างๆ พบว่าอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS) เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ ซิลเวอร์ไนเตรทความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และผงถ่าน 0.2 เปอร์เซ็นต์ให้การเจริญเติบโตแคลลัสได้ดีที่สุด น้ำหนักสดแคลลัสสูงสุด 499 มิลลิกรัม และเกิดเนื้อเยื่อสีน้ำตาลน้อย สำหรับการชักนำเป็นพืชต้นใหม่ พบว่าอาหารสูตร ½MS เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ผงถ่าน 0.2 เปอร์เซ็นต์ และน้ำตาลซูโครส 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ระยะแรกได้ 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อย้ายโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ระยะแรกที่ได้จากการวางเลี้ยงบนอาหาร ½MS เติมน้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ ไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ผงถ่าน 0.2 เปอร์เซ็นต์และน้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ สามารถพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้20 เปอร์เซ็นต์

โสภา และนูรีญา (2557) ศึกษาผลของ Paclobutrazol (PBZ) ร่วมกับ Benzyladenine (BA) และ Thidiazuron (TDZ) ต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้อั้วนวลจันทร์ (*Calanthe vestita* Lindl.) ในหลอด

ทดลอง โดยวางเลี้ยงต้นกล้าบนอาหารแข็งสูตร 1/2MS (half strength Murashige and Skoog medium) เติมและไม่เติม PBZ ร่วมกับ BA หรือ TDZ เข้มข้น 0 0.1 0.5 และ 1.0 มก./ล. เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ ต้นกล้ากล้วยไม้อั้วนวลจันทร์ จากผลการศึกษา พบว่า อาหารเติม PBZ ร่วมกับ BA และ TDZ ส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นกล้าดีกว่าอาหาร ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต การเติม BA เข้มข้น 0.1 มก./ล. ให้น้ำหนักสด ความยาวรากและความยาวใบมากที่สุด คือ 857.33 มก. 4.03 และ 9.26 ซม. ตามลำดับ ในขณะที่ การวางเลี้ยงบนอาหารเติม TDZ เข้มข้น 0.1 มก./ล. ให้จำนวนราก และจำนวนใบมากที่สุด คือ 9.93 ราก และ 3.53 ใบ ตามลำดับ และเมื่อนำต้นกล้ามาทดสอบวัสดุปลูกที่แตกต่างกัน เป็นเวลา 30 วัน พบว่า เวอร์มิคูไลท์ให้อัตราการรอดชีวิตสูงสุดที่ 91.67

วุฒิชัย และอนุพันธ์ (2554) เพาะเมล็ดกล้วยไม้ดินเหลืองประไพ (*Eulophia promensis* Lindl.) บนอาหารสูตร Vacin and Went (1949) ที่เติมน้ำมะพร้าว 150 ml/l น้ำต้มมันฝรั่ง 50 g/l น้ำตาล 20 g/l, ผงวุ้น 7 g/l เลี้ยงไว้ในที่ให้ได้รับแสงแตกต่าง กัน เป็นเวลา 24 สัปดาห์ พบว่า เมล็ดกล้วยไม้ดินเหลืองประไพที่เลี้ยงไว้ในที่มืด 24 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 12 สัปดาห์ แล้วย้ายออกเลี้ยงในที่มีแสง 12 ชั่วโมงต่อวันต่อไปอีก 12 สัปดาห์ จะมีอัตราการงอกในระยะที่ 3.1 ระยะที่ 3.2 และ ระยะที่ 5 สูงที่สุดคิดเป็น 81.80 ± 3.27a, 51.20 ± 9.37a และ 9.60 ± 1.98a เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ แต่เมล็ดกล้วยไม้ ดินเหลืองประไพที่เลี้ยงไว้ในที่มืดเป็นเวลา 10 สัปดาห์แล้วย้ายออกที่มีแสง 12 ชั่วโมงต่อวันเลี้ยงจนอายุครบ 24 สัปดาห์ พบว่า จะมีอัตราการงอกในระยะที่ 4 และในระยะที่ 6 สูงที่สุดคิดเป็น 33.20 ± 8.77a และ 3.60 ± 0.83a เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

รัตนาวลี และคณะ (2557) ศึกษาการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้เอื้องนางชี (*Dendrobium kontumense* Gagnep.) โดยนำยอดที่มีขนาด 0.5 ซม ที่เจริญมาจากโปรโตคอร์มมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร half-Murashige and Skoog (½ MS) และ MS พบว่าอาหารสูตร MS เกิดเป็นยอดได้ดีที่สุดโดยมีจำนวนยอดเฉลี่ย 1.40 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ และความยาวยอดเฉลี่ย 2.86 ซม. จากนั้นนำต้นอ่อนที่ได้ย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม naphthaleneacetic acid (NAA) ความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 2, 3, 4 และ 5 มก./ล. ร่วมกับ N_6 -benzyladenine (BA) ความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 2, 3, 4 และ 5 มก./ล. พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0.5 มก./ล. และ BA 0.5 มก./ล. สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีที่สุดมีจำนวนยอดเฉลี่ย 2.80 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ ความยาวยอดเฉลี่ย 4.02 ซม. จำนวนรากเฉลี่ย 8.16 รากต่อต้น และความยาวรากเฉลี่ย 15.00 ซม. ย้ายต้นอ่อนมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 0, 5, 10, 15, 20 และ 25% พบว่าน้ำมะพร้าว 15% ชักนำให้เกิดต้นใหม่ได้ดีที่สุด และนำต้นอ่อนมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมกล้วยน้ำว้าบด 0, 2, 4, 6, 8 และ 10% บพว่าอาหารที่เติมกล้วยน้ำว้าบด 6% ชักนำให้เกิดต้นใหม่ได้ดีที่สุด และเมื่อย้ายออกปลูกในกากมะพร้าวสับมีอัตราการรอดชีวิต 90%