# การขยายพันธุ์ในหลอดทดลองและพฤกษเคมีของเปราะโคราช

วิทยานิพนธ์

ของ

สิทธิศักดิ์ สะลิวรรณ์

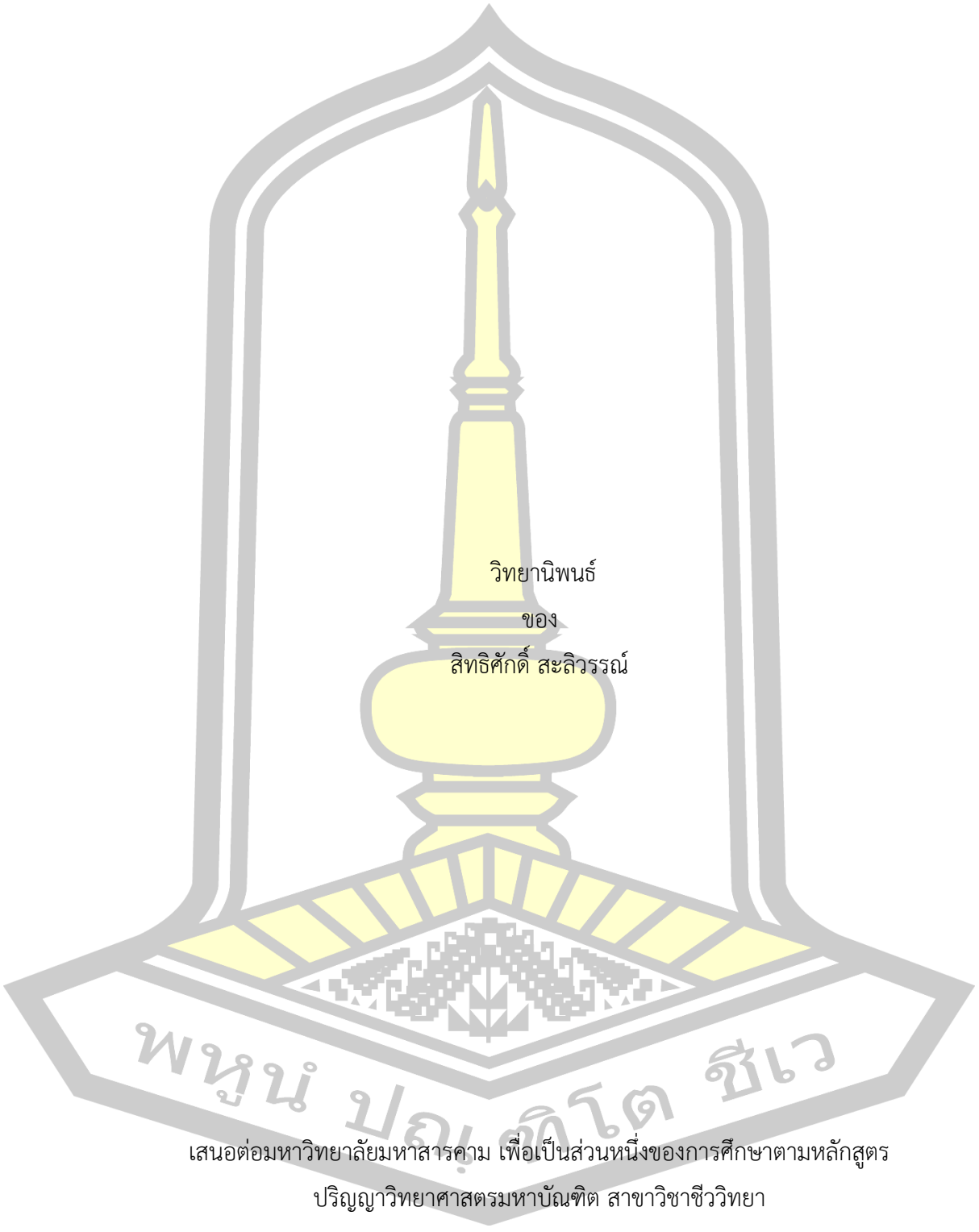
เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

พฤษภาคม 2566

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

# การขยายพันธุ์ในหลอดทดลองและพฤกษเคมีของเปราะโคราช



วิทยานิพนธ์

ของ

สิทธิศักดิ์ สะลิวรรณ์

เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

พฤษภาคม 2566

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

*In Vitro* Propagation and Phytochemical Profiles of *Kaempferia koratensis* Picheans.

Sittisak Saliwan

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of Requirements

for Master of Science (Biology)

May 2023

Copyright of Mahasarakham University

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของนายสิทธิศักดิ์ สะลิวรรณ์ แล้วเห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รศ. ดร. หนูเดือน เมืองแสน )

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รศ. ดร. ปิยะพร แสนสุข )

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รศ. ดร. สุรพล แสนสุข )

.....กรรมการ
(รศ. ดร. วรนันต์ นาคบรรพต )

.....กรรมการ
(ผศ. ดร. สุธิรา มณีฉาย )

มหาวิทยาลัยอนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

.....
(ศ. ดร. ไพโรจน์ ประมวล )
คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

.....
(รศ. ดร. กริสน์ ชัยมูล )
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

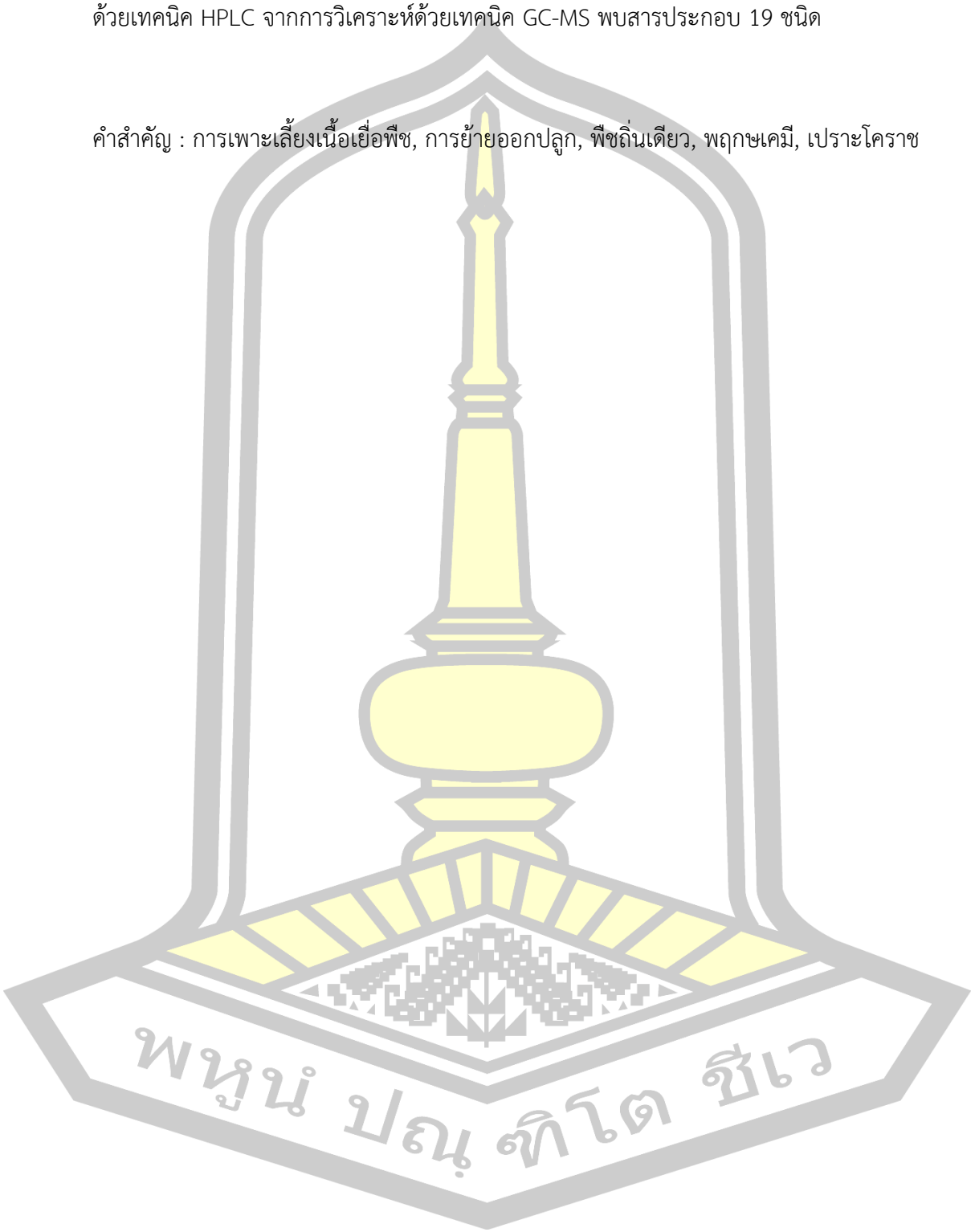
**ชื่อเรื่อง** การขยายพันธุ์ในหลอดทดลองและพฤกษเคมีของเปราะโคราช
**ผู้วิจัย** สิทธิศักดิ์ สะลิวรรณ์
**อาจารย์ที่ปรึกษา** รองศาสตราจารย์ ดร. ปิยะพร แสนสุข
รองศาสตราจารย์ ดร. สุรพล แสนสุข
**ปริญญา** วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต **สาขาวิชา** ชีววิทยา
**มหาวิทยาลัย** มหาวิทยาลัยมหาสารคาม **ปีที่พิมพ์** 2566

## บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาวิธีการขยายพันธุ์เปราะโคราช (*Kaempferia koratensis* Picheans.) ซึ่งเป็นพืชถิ่นเดียวของประเทศไทยด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ต้นอ่อนเปราะโคราช (ขนาด 1 ซม.) มาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งและอาหารเหลวสูตร MS ที่เติมฮอร์โมนออกซิน ไซโทไคนิน และเติมฮอร์โมนร่วมกันที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบจำนวนยอดมากที่สุด 4.60 ยอด/ชิ้นส่วนพืช เมื่อเพาะเลี้ยงต้นอ่อนในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA 2 มก./ล. ร่วมกับ TDZ 3 มก./ล. และ NAA 0.2 มก./ล. และพบจำนวนรากมากที่สุด 8.60 ราก/ชิ้นส่วนพืช เมื่อเพาะเลี้ยงต้นอ่อนในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA 4.0 มก./ล. และ NAA 0.2 มก./ล. ในอาหารเหลวสูตร MS พบการเกิดยอดมากที่สุด 6.0 ยอด/ชิ้นส่วนพืช เมื่อเพาะเลี้ยงต้นอ่อนในอาหารสูตร MS ที่เติม Kinetin 1.0 มก./ล. TDZ 2.0 มก./ล. และ NAA 0.2 มก./ล. ต้นอ่อนเปราะโคราชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนำมาย้ายปลูกในกระถางที่มีดินร่วน ดินทราย และดินร่วนผสมดินทราย (1:1) ภายในเรือนเพาะชำ พบอัตราการรอดชีวิตของต้นอ่อนเปราะโคราช 100% เมื่อย้ายปลูกในวัสดุทุกชนิด การศึกษาสารพฤกษเคมีของต้นเปราะโคราชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ เปรียบเทียบกับต้นพืชที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง พบว่าใบเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง บนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมน มีปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุดเท่ากับ 107.21 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และมีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์มากที่สุดเท่ากับ 15.73 มิลลิกรัมสมมูลของรูทินต่อกรัมน้ำหนักแห้ง เมื่อวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay และ FRAP assay พบว่าใบเปราะโคราชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด 8.18 มิลลิกรัมสมมูลโทรลอกซ์ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และ 28.97 มิลลิกรัมสมมูลเฟอร์รัสซัลเฟตต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ใบที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง ใบและเหง้าของเปราะโคราชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาตินำมาสกัดและวิเคราะห์พฤกษเคมีด้วยเทคนิคโครโมโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) และแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมทรี (GC-MS) พบสารประกอบฟีนอลิก 7 ชนิด (กรดแกลลิก กรดวานิลลิก กรดชินนามิก กรดคาเฟอิก กรดไซรินจิก กรดเฟอรูลิก และกรดคูมาริก) และ

สารประกอบฟลาโวนอยด์ 3 ชนิด (รูทิน แคมพ์เฟอรอล และเคอร์ซิติน) ในเปราะโคราชเมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS พบสารประกอบ 19 ชนิด

คำสำคัญ : การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช, การย้ายออกปลูก, พืชถิ่นเดียว, พฤกษเคมี, เปราะโคราช



**TITLE** *In Vitro* Propagation and Phytochemical Profiles of *Kaempferia koratensis* Picheans.

**AUTHOR** Sittisak Saliwan

**ADVISORS** Associate Professor Piyaporn Saensouk , Ph.D.

Associate Professor Surapon Saensouk , Ph.D.

**DEGREE** Master of Science **MAJOR** Biology

**UNIVERSITY** Mahasarakham University **YEAR** 2023

## ABSTRACT

This research studied a propagation protocol for *Kaempferia koratensis* Picheans. which is an endangered plant of Thailand using the plant tissue culture technique. Microshoot (1 cm long) of *K. koratensis* was cultured on solid and liquid Murashige and Skoog (MS) supplemented with various concentrations of auxin, cytokinin, and their combinations for eight weeks. The results showed that the highest number of shoots and roots were 4.60 shoots/explant when the microshoots were cultured on solid MS medium added with 2.0 mg/l BA plus 3.0 mg/l TDZ and 0.2 mg/l NAA and 8.60 roots/explant when the microshoots were cultured on solid MS medium added with 4 mg/l BA plus 0.2 mg/l NAA respectively. In liquid MS medium, the best result for shoot multiplication was 6.0 shoots/ explant achieved on MS medium supplemented with 1 mg/l Kinetin, 2 mg/l TDZ and 0.2 mg/l NAA. The *in vitro*-derived plantlets of *K. koratensis* Pichean. were transplanted into a pot containing soil, sand and soil: sand (1: 1) in a greenhouse. The survival rates were 100% when *K. koratensis* Pichean. was transplanted to all potting mixtures. Comparative study on phytochemical profile of *K. koratensis* by total phenolic content (TPC), total flavonoid content (TFC) and antioxidant activity of leaves of micropropagated plants and leaves and rhizomes of conventionally propagated plants. The result showed that the leaves of *K. koratensis* from *in vitro* plants when cultured on MS medium without plant growth regulators showed the highest values of TPC (107.21 mg GAE/g DW) and TFC (15.73 mg Ru/g DW). Leaves of *K. koratensis*

from natural conditions showed the highest antioxidant activity 8.18 mg TE/g DW and 28.97 mg $Feso_4$/g DW when measured by DPPH assay and FRAP assay, respectively. Leaves of micropropagated plants and leaves and rhizomes of conventionally propagated plants were extracted and analyzed phytochemical profile by high-performance liquid chromatography (HPLC) and gas-chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Seven phenolic compounds (gallic acid, vanillic acid, cinnamic acid, caffeic acid, syringic acid, ferulic acid and *p*-coumaric) and 3 flavonoid (rutin, kaempferol and quercetin) compounds were found in leaves and rhizomes of *K. koratensis* when analyzed with HPLC. GC-MS analysis showed 19 compounds

Keyword : Endemic plant, Kaempferia koratensis Picheans, Plant tissue culture, Phytochemical profile, Transplantation

# กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยความกรุณา และความช่วยเหลืออย่างสูงยิ่งจาก รองศาสตราจารย์ ดร.ปิยะพร แสนสุข อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และรองศาสตราจารย์ ดร.สุรพล แสนสุข อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษา ช่วยแก้ไขข้อบกพร่องในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้เสร็จสมบูรณ์ ตลอดจนให้ความช่วยเหลือ ดูแลในด้านต่าง ๆ ตลอดมา ผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.หนูเดือน เมืองแสน ประธานกรรมการสอบ ที่กรุณาให้ข้อเสนอแนะเพิ่มเติมและแนวคิดในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.วรนันต์ นาคบรรพต และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุธิรา มณีฉาย ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ แก้ไข และข้อเสนอแนะด้านต่าง ๆ ในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสมบูรณ์

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ศูนย์เครื่องมือกลาง คณะวิทยาศาสตร์ และเจ้าหน้าที่ศูนย์เครื่องมือกลาง มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่ให้ความรู้และความช่วยเหลือ แนะนำ อำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือวิเคราะห์ในการทำวิจัย

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนการวิจัยสำหรับนิสิตระดับบัณฑิตศึกษา งบประมาณเงินรายได้ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2565 ที่ให้ทุนสนับสนุนการทำวิจัยในครั้งนี้ ขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำวิจัย และขอขอบคุณ คุณปิยะมาศ ปานทอง ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณครอบครัวอันเป็นที่รักของข้าพเจ้า คุณธนา สะลิวรรณ์ คุณสุบิน สะลิวรรณ์ และคุณเอนกพงศ์ สะลิวรรณ์ ที่ให้โอกาสในการศึกษา สนับสนุนกำลังทรัพย์ เป็นแรงผลักดัน และเป็นกำลังใจให้ข้าพเจ้าตลอดมา

ขอขอบคุณ คุณวิภา เยาวไชย ดร.สุกัญญา นนทะลี คุณชลลดา ไม้งาม คุณรัตติยา ทุงจันทร์ และคุณกสานติ์ หาญชนะ ที่คอยช่วยเหลือ ให้คำปรึกษา และคอยให้กำลังใจเสมอมา ตลอดจนขอขอบคุณเพื่อนพี่น้องทุกคนที่มีส่วนเกี่ยวข้องในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ประโยชน์และคุณค่าจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอมอบบูชาพระคุณบิดามารดา บูรพาจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่าน

สิทธิศักดิ์ สะลิวรรณ์

# สารบัญ

**หน้า**


บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ฉ

กิตติกรรมประกาศ ..... ช

สารบัญ ..... ฌ

สารบัญตาราง ..... ฏ

สารบัญภาพ ..... ฐ

บทที่ 1 บทนำ ..... 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา ..... 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย ..... 3

1.3 ขอบเขตของการวิจัย ..... 3

1.4 สถานที่ทำการวิจัย ..... 3

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ ..... 4

1.6 ระยะเวลาและแผนการวิจัย ..... 5

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ..... 6

2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของพืชสกุลเปราะ ..... 6

2.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของเปราะโคราช ..... 6

2.3 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ..... 7

2.4 อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ..... 7

2.5 ฮอร์โมนพืชหรือสารควบคุมการเจริญเติบโตพืช ..... 7

2.6 สภาพความเป็นกรดและด่างของอาหาร (pH of nutrient medium) ..... 8

2.7 สารพฤกษเคมี ..... 8

2.8 วิธีการสกัดสาร ..... 8
2.9 ประเภทของสารพฤกษเคมี ..... 10
2.10 ประโยชน์ของสารพฤกษเคมี ..... 12
2.11 สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ..... 12
2.12 เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) ..... 13
2.13 เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี – แมสสเปกโทรเมทรี (Gas Chromatography Mass Spectrometry, GC-MS) ..... 13
2.14 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสกุลเปราะ ..... 15
2.15 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์องค์ประกอบทางพฤกษเคมี ..... 21
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการวิจัย ..... 33
3.1 พืชที่ใช้ทำการทดลอง ..... 33
3.2 วัสดุและอุปกรณ์ ..... 33
3.3 วิธีดำเนินการวิจัย ..... 36
3.3 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ ..... 42
บทที่ 4 ผลการทดลอง ..... 43
4.1 การชักนำให้เกิดยอดปลอดเชื้อ และการเพิ่มปริมาณพืชทดลอง ..... 43
4.2 ศึกษาผลของฮอร์โมน BA, BA ร่วมกับ NAA และ BA ร่วมกับ TDZ และ NAA ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดและรากในเปราะโคราช ..... 43
4.3 ศึกษาผลของฮอร์โมน BA ร่วมกับ Kinetin และ NAA ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดและรากเปราะโคราชเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง ..... 48
4.4 ศึกษาผลร่วมระหว่างฮอร์โมนออกซินและไซโทไคนินที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดและรากเปราะโคราชเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ..... 52
4.5 การย้ายเปราะโคราชออกปลูกในเรือนเพาะชำ ..... 55

4.6 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ..... 58
4.7 ศึกษาองค์ประกอบทางพฤกษเคมีของเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง และที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ ด้วยเทคนิคเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง และแก๊สโครมาโทกราฟี – แมสสเปกโทรเมทรี (GC-MS) ..... 62
บทที่ 5 สรุป และอภิปรายผลการทดลอง ..... 76
บรรณานุกรม ..... 89
ภาคผนวก ..... 103
ประวัติผู้เขียน ..... 121

พหูน ปณ ฑิโต ชีเว

# สารบัญตาราง

**หน้า**

ตาราง 1 ผลของฮอร์โมน BA, BA ร่วมกับ NAA และ BA ร่วมกับ TDZ และ NAA ความเข้มข้นแตกต่างกันต่อการชักนำให้เกิดยอดและรากในเปราะโคราช เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ..... 45

ตาราง 2 ผลของฮอร์โมน BA ร่วมกับ Kinetin และ NAA ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดและรากเปราะโคราช เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ..... 49

ตาราง 3 ผลของฮอร์โมน BA ร่วมกับ TDZ และ Kinetin ความเข้มข้นแตกต่างกันต่อการชักนำให้เกิดยอดและรากของเปราะโคราชเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ..... 53

ตาราง 4 การย้ายต้นอ่อนเปราะโคราชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อออกปลูกในเรือนเพาะชำเป็นเวลา 8 สัปดาห์..... 56

ตาราง 5 วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ในชิ้นส่วนเปราะโคราชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ และเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง 60

ตาราง 6 การเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP assay..... 60

ตาราง 7 การวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่าง TPC, TFC, DPPH, % inhibition และ FRAP ..... 61

ตาราง 8 ชนิดและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกจากชิ้นส่วนต่าง ๆ ของเปราะโคราชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ และเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมน วิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ..... 67

ตาราง 9 ชนิดและปริมาณของสารประกอบฟลาโวนอยด์จากชิ้นส่วนต่าง ๆ ของเปราะโคราชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ และเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงใน .. หลอดทดลอง บนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมนวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง..... 71

ตาราง 10 องค์ประกอบทางเคมีจากใบและเหง้าของเปราะโคราชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติและเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง..... 74

ตาราง 11 ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากชิ้นส่วน ใบ และเหง้าเปราะโคราชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ และใบที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมน ..... 87

# สารบัญภาพ

**หน้า**

ภาพที่ 1 ลักษณะใบและดอกพืชสกุลเปราะ (Kaempferia L.) ..... 6

ภาพที่ 2 ต้นเปราะโคราช (*K. koratensis*) ..... 33

ภาพที่ 3 การเจริญของยอดเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน BA, BA ร่วมกับ NAA หรือ TDZ ความเข้มข้นแตกต่างกัน เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ..... 46

ภาพที่ 4 การเจริญของรากเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน BA, BA ร่วมกับ NAA หรือ TDZ ความเข้มข้นแตกต่างกัน เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ..... 47

ภาพที่ 5 การเจริญของยอดเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน BA ร่วมกับ NAA และ Kinetin ความเข้มข้นแตกต่างกัน เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ..... 50

ภาพที่ 6 การเจริญของรากเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน BA ร่วมกับ NAA และ Kinetin ความเข้มข้นแตกต่างกัน เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ..... 51

ภาพที่ 7 ยอดเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่เติม BA และ Kinetin ร่วมกับ TDZ และ NAA เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ..... 54

ภาพที่ 8 ต้นอ่อนเปราะโคราชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อย้ายปลูกในเรือนเพาะชำในดินร่วน ดินทราย และดินร่วนผสมดินทราย (สเกล 1 ซม.) ..... 57

ภาพที่ 9 โครมาโทรแกรมของสารมาตรฐานเวลาคงค้าง (retention time, RT) ของสารมาตรฐานสารประกอบฟีนอลิก ..... 63

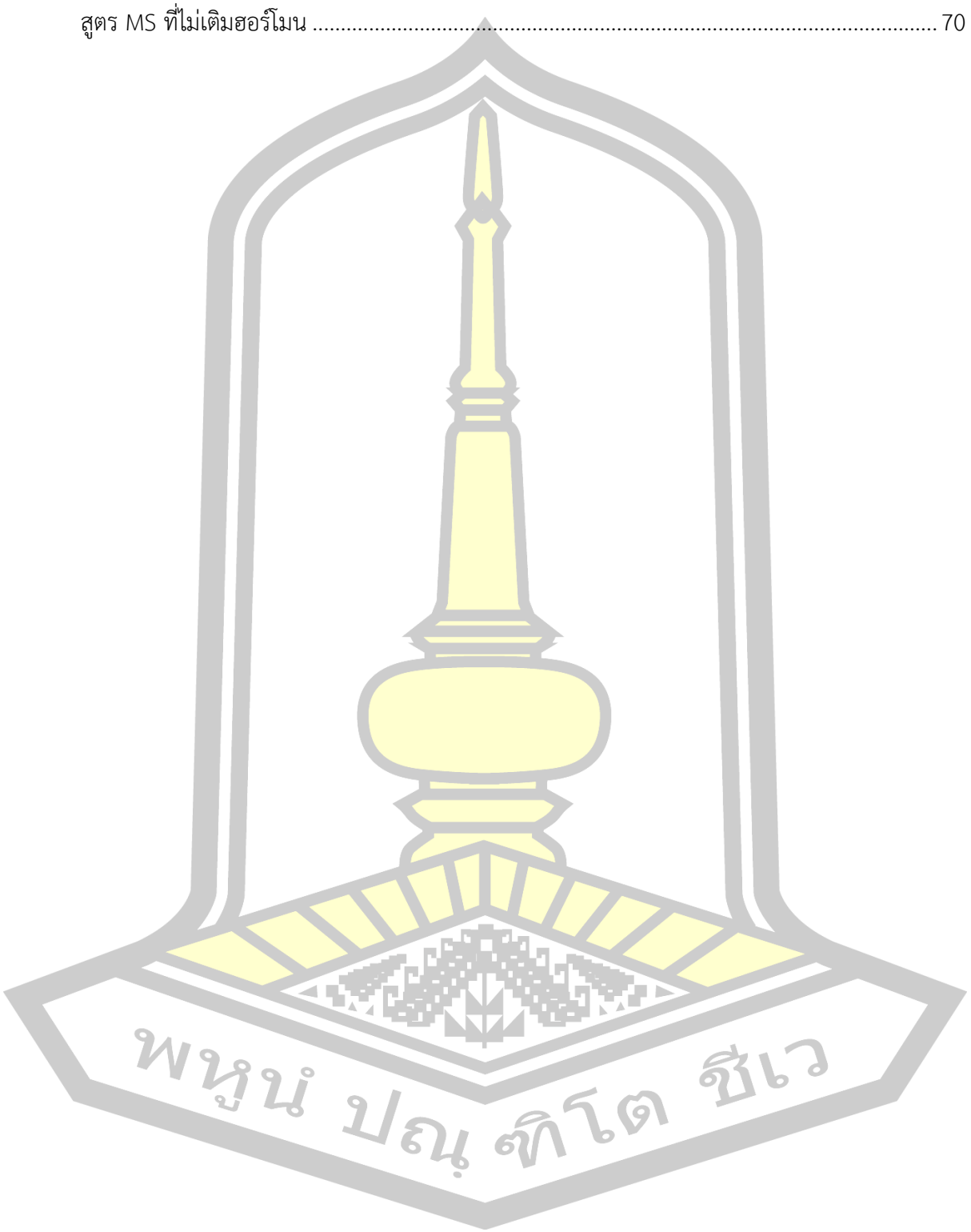
ภาพที่ 10 โครมาโทรแกรมของสารมาตรฐานเวลาคงค้าง (retention time, RT) ของสารมาตรฐานสารประกอบฟลาโวนอยด์ ..... 63

ภาพที่ 11 โครมาโทรแกรมแสดงค่าเวลาคงค้างของเปราะโคราชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ ... 65

ภาพที่ 12 โครมาโทรแกรมแสดงค่าเวลาคงค้างของเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมน ..... 66

ภาพที่ 13 โครมาโทรแกรมแสดงค่าเวลาคงค้างเปราะโคราชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ ..... 69

ภาพที่ 14 โครมาโทรแกรมแสดงค่าเวลาคงค้างใบเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง บนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมน ..... 70



# บทที่ 1
# บทนำ

## 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เปราะโคราช (*Kaempferia koratensis* Picheans.) เป็นพืชในสกุลเปราะ (*Kaempferia* L.) พืชวงศ์ขิง (Zingberaceae) อันดับ Zingiberales กระจายพันธุ์ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ จีนตอนใต้ และอินเดีย ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของพืชสกุลเปราะคือ เป็นพืชล้มลุกหลายปีที่มีลำต้นใต้ดินหรือเหง้า (rhizome) ทอดขนานไปกับพื้นดิน ลำต้นเหนือดินเป็นกาบใบที่หุ้มเป็นลำต้นเทียม (pseudostem) กาบใบสั้น และมี 1-2 ใบ แผ่นใบแบนราบติดพื้นดิน (จิราภรณ์ ผุดผ่อง และคณะ, 2558) สารสกัดจากพืชในสกุลเปราะนำมาใช้ประโยชน์ทั้งทางด้านสมุนไพร มีฤทธิ์ในการต้านโรคหอบหืด โรคมะเร็ง โรคลมชัก โรคความดันโลหิตสูง โรคเรื้อน โรคหลอดลมอักเสบ โรคไขข้อ ใช้บรรเทาอาการไอ ภูมิแพ้ กระตุ้นการขับปัสสาวะและขับลม (Swapna *et al.,* 2004) เปราะโคราชเป็นพืชถิ่นเดียว (endemic plant) (POWO, 2023) ในประเทศไทยโดยพบทางภาคตะวันออก และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จากการสอบถามชาวบ้านในจังหวัดนครราชสีมาพบว่า มีการนำใบอ่อนเปราะโคราชมารับประทานเป็นผักสด ลวกหรือนึ่งใบอ่อนรับประทานกับน้ำพริก หรือนำใบอ่อนมาประกอบอาหารเช่น แกงอ่อม และหมกปลา เปราะโคราชถูกนำมาใช้รับประทานหรือปรุงอาหาร เช่น นำมาเป็นผักเครื่องเคียงกับขนมจีนจะให้รสชาติเผ็ดร้อน หรือนำมาผัดกับน้ำมันก็ได้ เป็นต้น (Picheansoonthon, 2011)

พืชสร้างสารปฐมภูมิ (primary metabolite) ขึ้นมาเพื่อใช้ในการดำรงชีวิต และเจริญเติบโต ได้แก่ โปรตีน คาร์โบไฮเดรต น้ำตาล และไขมัน เป็นต้น สารปฐมภูมิที่พบในพืชสามารถนำไปใช้เป็นอาหารสำหรับมนุษย์ นอกจากนี้ยังใช้เป็นแหล่งของยารักษาโรค จะเห็นได้ว่าสารสกัดจากพืชที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาได้ถูกนำมาใช้เพื่อเป็นยา อาหารเสริม รวมถึงการนำไปใช้เพื่อแต่งสี กลิ่น ในเครื่องสำอาง สารที่ถูกนำมาใช้เหล่านี้จัดเป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ปกติพืชสร้างสารทุติยภูมิเพื่อทำหน้าที่ในการป้องกันตัวเองจากจุลชีพ แมลง และสัตว์ต่างๆ ที่มารบกวนหรือบุกรุก ทำให้พืชสามารถปรับตัวเพื่อดำรงชีวิตในสิ่งแวดล้อมได้ โดยสารทุติยภูมิที่พบในพืชส่วนใหญ่จะพบในปริมาณที่ต่ำ สารทุติยภูมิกลุ่มที่พบในพืช ได้แก่ แอลคาลอยด์ (alkaloid) เทอร์พีนอยด์ (terpinoid) ฟีนอลลิก (phenolic) สเตียรอยด์ (steroid) และ ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) เป็นต้น โครงสร้างสารเหล่านี้พบหลากหลายในพืชชนิดต่างๆ ปัจจุบันมีการค้นพบสารทุติยภูมิในพืชมากกว่า 1,000,000 ชนิด (Collin, 2001) สารทุติยภูมิที่พบในพืชมีคุณสมบัติเป็นสารที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาโดยเป็นแหล่งสำคัญที่ใช้ในการผลิตยา และถูกนำมาใช้ในการรักษาโรค เนื่องจากแหล่งที่มาของผลิตภัณฑ์จาก

ธรรมชาติกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ได้มาจากพืช จะเห็นได้ว่าสารทุติยภูมิที่พืชสร้างขึ้นมีคุณค่าทางยาแต่การผลิตสารในพืชมีปริมาณจำกัด ในขณะที่ปริมาณความต้องการในการใช้ยาและสารที่นำมาใช้เพื่อผลิตยามีเพิ่มมากขึ้น ทำให้ไม่เพียงพอต่อความต้องการในปัจจุบัน (Rao & Ravishankar, 2002) ด้วยความก้าวหน้าในการวิเคราะห์ และพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีในปัจจุบัน ได้มีส่วนช่วยให้การตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างสูตรโครงสร้างกับสารที่ได้จากพืช และฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาสามารถทำได้รวดเร็วและถูกต้องมากขึ้น และการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาช่วยในการเพิ่มจำนวนพืชแล้ววิเคราะห์สารสำคัญในพืชเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในด้านอื่น ๆ (Zhong, 2002)

ปัจจุบันได้มีการวิจัยเพื่อเพิ่มการผลิตสารทุติยภูมิที่ได้จากพืช สามารถทำได้โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นพื้นฐาน เพื่อใช้ในการพัฒนาและปรับปรุงวิธีการต่าง ๆ ในการเพิ่มปริมาณสารรวมไปถึงการเพิ่มผลผลิตของสารที่เซลล์พืชผลิตได้ โดยเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในหลอดทดลองทดแทนการเพาะปลูกพืชจากธรรมชาติ แนวทางการศึกษาวิจัยโดยใช้เทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในรูปแบบต่าง ๆ โดยการนำพืชจากธรรมชาติมาชักนำให้เกิดแคลลัส (callus induction) จากนั้นนำแคลลัสที่ได้ไปเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย (cell suspension culture) หรือชักนำแคลลัสที่ได้ให้เกิดอวัยวะ อาจทำการกระตุ้นให้เกิดยอด แล้วเพาะเลี้ยงเฉพาะส่วนยอด (shoot culture) หรือกระตุ้นให้เกิดราก แล้วทำการเพาะเลี้ยงราก (root culture) หรือชักนำให้เกิดเป็นต้นอ่อนจากส่วนแคลลัสเพื่อทำการขยายพันธุ์พืช (micropropagation) อาจกล่าวได้ว่าเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ถูกนำมาประยุกต์ และพัฒนาวิธีการต่าง ๆ ในการปรับปรุงพันธุ์พืช นำไปสู่การเพิ่มขีดความสามารถในการผลิตเภสัชภัณฑ์จากพืช (Zhong, 2002) เปราะโคราชเป็นพืชที่พบได้ในบางพื้นที่จึงมีความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ และเปราะโคราชขยายพันธุ์โดยใช้เหง้า หรือเมล็ด มีการพักตัวในช่วงฤดูแล้งและแตกหน่อใหม่ในช่วงฤดูฝน แต่มักเกิดโรคและเชื้อราจากดินในปริมาณสูงทำให้สามารถขยายพันธุ์ได้ปริมาณน้อย จึงได้นำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาช่วยเพิ่มจำนวน และขยายพันธุ์ให้ได้ปริมาณมากโดยปลอดโรค สามารถขยายพันธุ์ได้ตลอดทั้งปีโดยไม่คำนึงถึงฤดูกาล พืชต้นใหม่ที่ได้มีลักษณะพันธุกรรมเหมือนต้นแม่ทุกประการ ทำให้ได้ผลผลิตสม่ำเสมอทุกต้น และสามารถเพิ่มจำนวนต้นได้ในเวลาอันรวดเร็วเพื่อที่จะนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป (Shirin *et al.,* 2000; Chirangini *et al.,* 2005; Rahman *et al.,* 2005; Kochuthressia *et al.,* 2012) มีรายงานว่าเมื่อนำพืชมาเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง พืชจะสามารถสร้างสารทุติยภูมิได้เหมือนในสภาพธรรมชาติหรือบางครั้งสร้างสารออกฤทธิ์ได้มากกว่า หรือสร้างสารออกฤทธิ์ชนิดที่ไม่สามารถสร้างได้ในสภาพธรรมชาติ เปราะโคราชเป็นพืชในวงศ์ขิงที่ยังไม่มีรายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในหลอดทดลองและยังไม่มีรายงานการนำพืชชนิดนี้มาวิเคราะห์องค์ประกอบทางพฤกษเคมี ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเปราะโคราชในหลอดทดลองเพื่อเป็นการขยายพันธุ์ การอนุรักษ์พันธุกรรมพืชถิ่นเดียวรวมทั้งเพื่อนำความรู้ที่ได้ไปต่อยอดในการสกัดสารทุติยภูมิในการใช้ประโยชน์ทางด้านเภสัชภัณฑ์ต่อไป

**1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย**

1. เพื่อศึกษาผลของฮอร์โมน BA, BA ร่วมกับ NAA และ BA ร่วมกับ TDZ และ NAA ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดและรากของเปราะโคราชเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง

2. เพื่อศึกษาผลของฮอร์โมน BA ร่วมกับ Kinetin และ NAA ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดและรากของเปราะโคราชเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง

3. เพื่อศึกษาผลร่วมระหว่างออกซินและไซโทไคนินที่เหมาะสมต่อการชักนำต้นอ่อนเปราะโคราชให้เกิดยอดและรากเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว

4. เพื่อศึกษาชนิดของวัสดุปลูกที่เหมาะสมเมื่อย้ายเปราะโคราชออกปลูกในเรือนเพาะชำ

5. เพื่อเปรียบเทียบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองและที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ

6. เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางพฤกษเคมีของเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง และที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง และแก๊สโครมาโทกราฟี – แมสสเปกโทรเมทรี

**1.3 ขอบเขตของการวิจัย**

ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการขยายพันธุ์เปราะโคราชในหลอดทดลอง โดยนำชิ้นส่วนยอดมาเพาะเลี้ยงในอาหารอาหารสูตร MS (Murashige & Skoog, 1962) ที่เติมฮอร์โมนกลุ่มออกซินและไซโทไคนิน ที่ระดับความเข้มข้นความแตกต่างกัน ทำการทดลองละ 10 ซ้ำ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ บันทึกการเจริญเติบโต ศึกษาชนิดของวัสดุปลูกที่เหมาะสมเมื่อย้ายเปราะโคราชออกปลูกในเรือนเพาะชำ และศึกษาสารพฤกษเคมีของเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง และในสภาพธรรมชาติ

**1.4 สถานที่ทำการวิจัย**

1. ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (SC1-306) ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

2. ศูนย์เครื่องมือกลาง มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

3. เรือนเพาะชำ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

4. ป่าสาธารณะจังหวัดนครราชสีมา

**1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ**

1. ทราบระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน BA, BA ร่วมกับ NAA และ BA ร่วมกับ TDZ และ NAA ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดและรากของเปราะโคราชเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง

2. ทราบระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน BA ร่วมกับ Kinetin และ NAA ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดและรากของเปราะโคราชเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง

3. เพื่อศึกษาผลร่วมระหว่างออกซินและไซโทไคนินที่เหมาะสมต่อการชักนำต้นอ่อนเปราะโคราชให้เกิดยอดและรากเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว

4. ทราบชนิดของวัสดุปลูกที่เหมาะสมเมื่อย้ายเปราะโคราชออกปลูกในเรือนเพาะชำ

5. ทราบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองและที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ

6. ทราบองค์ประกอบทางพฤกษเคมีของเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง และที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง และแก๊สโครมาโทกราฟี – แมสสเปกโทรเมทรี

พหูน ปณฺฑิโต ชีเว

**1.6 ระยะเวลาและแผนการวิจัย**

| แผนการวิจัย | ปี พ.ศ. 2561-2566 | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | ก.ค-ธ.ค 61 | ม.ค-มิ.ย 62 | ก.ค-ธ.ค 62 | ม.ค-มิ.ย 63 | ก.ค-ธ.ค 63 | ม.ค-มิ.ย 64 | ก.ค-ธ.ค 64 | ม.ค-มิ.ย 65 | ก.ค-ธ.ค 65 | ม.ค-มิ.ย 66 |
| ศึกษาค้นคว้าและเก็บรวบรวมข้อมูล | ← | — | — | → | | | | | | |
| เพิ่มจำนวนต้นพืช | | | | | | | | | | |
| ศึกษาผลของฮอร์โมน BA, BA ร่วมกับ NAA และ BA ร่วมกับ TDZ และ NAA | ← | — | → | | | | | | | |
| ศึกษาผลของฮอร์โมน BA ร่วมกับ Kinetin และ NAA | ← | — | → | | | | | | | |
| ศึกษาผลร่วมระหว่างออกซินและไซโทไคนิน ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดและรากเปราะโคราชเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว | | | | | | | | | | |
| ศึกษาการย้ายเปราะโคราชออกปลูกในเรือนเพาะชำ | ← | — | → | | | | | | | |
| ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของเปราะโคราช | | | | ← | — | → | | | | |
| ศึกษาองค์ประกอบทางพฤกษเคมีด้วยเทคนิคเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง และแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมทรี | | | | ← | — | → | | | | |
| บันทึกและวิเคราะห์ผลการทดลอง | | | | | ← | — | — | → | | |
| เขียนต้นฉบับและส่งตีพิมพ์ | | | | | | ← | — | → | | |
| จัดทำวิทยานิพนธ์ฉบับสมบูรณ์ | | | | | | | | ← | — | → |

# บทที่ 2
# เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

## 2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของพืชสกุลเปราะ

พืชสกุลเปราะ (*Kaempferia* L.) เป็นไม้ล้มลุก มีเหง้า สูง 20-30 ซม. ใบเดี่ยว มี 2-4 ใบ ตั้งตรง รูปรีหรือแกมรูปหอก กว้าง 5-8 ซม. ยาว 15-25 ซม. บางชนิดปลายใบแหลม บางชนิดใบแผ่ราบตามพื้นดิน โคนใบสอบ ดอกออกเป็นช่อสั้นจากเหง้าใต้ดินก่อนแทงใบ มีกาบใบหุ้มช่อดอก 2-3 ใบ ดอกบานกว้าง 2.5-3 ซม. กลีบรองดอกเชื่อมกันเป็นหลอด ยาว 3-3.2 ซม. กลีบดอกเป็นหลอด ยาว 5-5.5 ซม. ปลายแผ่แยก 3 แฉก รูปขอบขนาน กลีบปากมีสีสันต่างๆตามชนิด ยาว 4 ซม. กว้าง 2-3 ซม. แบ่งเป็น 2 พู รูปรี ปลายมน รอยเว้าระหว่างพูลึกมาก เกสรเพศผู้ที่เป็นหมันสีขาว ปลายมนกลม เกสรเพศผู้ที่สมบูรณ์ ก้านชูสั้น ปลายมี 3 พู รังไข่มีขนสั้น (ภาพ 1) ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของพืชสกุลเปราะ บางชนิดมีใบแหลมตั้งขึ้น บางชนิดมีใบแผ่แบนราบไปตามพื้นดิน (Techaprasan *et al.,* 2010)

**ภาพที่ 1** *ลักษณะใบและดอกพืชสกุลเปราะ (Kaempferia L.)*

## 2.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของเปราะโคราช

เปราะโคราช (*Kaempferia koratensis* Pichean.) เป็นพืชวงศ์ขิง สกุลเปราะ เป็นไม้ล้มลุก มีหลายเหง้า มี 2 ใบ แผ่แบนราบกับพื้นคล้ายใบมีด ใบหนา สีเขียวเข้ม ผิวใบด้านล่างมีขน ใบประดับเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า มีขน ปลายแหลม ขอบใบประดับแยกออกจากกัน หลอดกลีบเลี้ยง

ยาว 3.1–4.5 ซม. เกสรเพศผู้รูปไข่ สีขาว เป็นหมัน กลีบปากปลายสีขาวมีสีเหลืองที่ฐาน กว้าง 2.2–2.7 ซม. ปลายแหลมโค้งมน อับเรณูรูปไข่ ยาว 8–12 มม. เกสรเพศเมียรูปกรวย รังไข่มีขนาด 4x2 มม. ออกดอกและติดผลในเดือนมิถุนายนจนถึงเดือนกันยายน เป็นพืชที่ถูกค้นพบครั้งแรกในปี พ.ศ. 2554 โดย ศาสตราจารย์ ดร.เภสัชกรชยันต์ พิเชียรสุนทร พบในป่าเต็งรัง บริเวณเขาตะกุดรัง ตำบลอุดมทรัพย์ อำเภอวังน้ำเขียวจังหวัดนครราชสีมา ซึ่งอยู่ห่างจากสถานีวิจัยสิ่งแวดล้อมสะแกราชประมาณ 20 กิโลเมตร ซึ่งตอนนั้นได้รายงานว่า พบเฉพาะบริเวณแหล่งตัวอย่างต้นแบบ (typelocality) เท่านั้น จึงเป็นพืชถิ่นเดียวของจังหวัดนครราชสีมาและถือเป็นพืชถิ่นเดียวของไทย ชาวบ้านในท้องถิ่นเรียกว่า ว่านเปราะขาวหรือว่านตูบหมูขาว (Picheansoonthon, 2011)

**2.3 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช**

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (plant tissue culture) คือการนำเอาชิ้นส่วนใดชิ้นส่วนหนึ่งของพืชไม่ว่าจะเป็นเซลล์ เนื้อเยื่อ หรืออวัยวะ หรือเซลล์ที่ไม่มีผนังเซลล์ (โพรโทพลาสต์) นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ ซึ่งประกอบด้วยแร่ธาตุ น้ำตาล วิตามิน หรือสารควบคุมการเจริญเติบโต ในสภาพปลอดเชื้อ และอยู่ในสภาวะควบคุมสิ่งแวดล้อม ได้แก่ อุณหภูมิ แสง และความชื้น (ปิยะพร แสนสุข, 2557)

**2.4 อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช**

อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ประกอบด้วย

1. สารอนินทรีย์ (inorganic nutrient)
2. สารอินทรีย์ (organic nutrient)
    2.1 สารประกอบพวกไนโตรเจน (nitrogenous substance)
    2.2 แหล่งคาร์บอน (carbon source)
3. สารควบคุมการเจริญเติบโต (plant growth regulators)
    3.1 ออกซิน (auxin)
    3.2 ไซโทไคนิน (cytokinin)
    3.3 จิบเบอเรลลิน (gibberellins)
4. อาหารเสริม (growth supplements)
5. วุ้น (agar)

**2.5 ฮอร์โมนพืชหรือสารควบคุมการเจริญเติบโตพืช**

ฮอร์โมนพืช (plant hormones) หมายถึงสารที่สร้างขึ้นส่วนใดส่วนหนึ่งของพืชแล้วมีพืชต่อการเจริญเติบโตพืช ส่วนสารควบคุมการเจริญเติบโตพืช (plant growth regulators) หมายถึงสารที่มีคุณสมบัติคล้ายฮอร์โมนพืช รวมทั้งฮอร์โมนพืช แล้วมีผลต่อกระบวนการทางสรีรวิทยาของพืช

ปริมาณที่ทำให้มีการตอบสนองต่อพืชในปริมาณที่น้อยหรือต่ำ หน่วยเป็นไมโครโมลหรือมิลลิกรัมต่อลิตร (ปิยะพร แสนสุข, 2557)

1. ฮอร์โมนในกลุ่มออกซิน เช่น 3-Indoleacetic acid (IAA), 3-Indolebutyric acid (IBA), Naphthaleneacetic acid (NAA), Naphthoxyacetic acid (NOA), Para-Chlorophenoxy acetic acid (p-CAP), 2,4-Dicholophrnoxy acetic acid (2,4-D) และ 1,4,5-Trichlorophenoxy acetic acid (2,4,5-T) นิยมใช้ฮอร์โมนในกลุ่มออกซินกระตุ้นการแบ่งเซลล์และกระตุ้นการเกิดราก นอกจากนี้ยังนิยมใช้ 2,4-D ในการกระตุ้นให้เกิดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

2. ฮอร์โมนในกลุ่มไซโทไคนิน เช่น Benzyladenine (BA) หรือ benzyl aminopurine (BAP), 6-Furfurylamino purine (Kinetin), Zeatin, N6-Isopentenyl adenine (2iP), Tetrahydropyranyl benzyladenine (TBA) และ N, phenyl-N'-1,2,3 thidiazole-5-yl urea (Tridiazuron, TDZ) ใช้ฮอร์โมนในกลุ่มนี้เพื่อกระตุ้นการแบ่งเซลล์ การเกิดหน่อเล็กๆ (adventitious shoot) และการเกิดยอด

3. สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มอื่นๆ เช่น Gibeberellic acid ($GA_3$) และ Abscissic acid (ABA) (ปิยะพร แสนสุข, 2557)

**2.6 สภาพความเป็นกรดและด่างของอาหาร (pH of nutrient medium)**

ผลในการกระตุ้นการเจริญเติบโตและการเลือกกระตุ้น (Selectivity) ของอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงนั้นขึ้นอยู่กับ pH ด้วย โดยทั่วไปจะปรับให้มีค่าเป็น 5.0 -6.0 และ pH จะเปลี่ยนแปลงตลอดเวลาขณะเพาะลี้ยงเนื้อเยื่อ

**2.7 สารพฤกษเคมี**

สารพฤกษเคมี (phytochemical) หรือ ไฟโตนิวเทรียนท์ (phytonutrients) หมายถึงสารเคมีที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพพบเฉพาะในพืช สารกลุ่มนี้อาจเป็นสารที่ทำให้พืชผักชนิดนั้นๆ มีสี กลิ่นหรือรสชาติที่เป็นลักษณะเฉพาะตัว สารพฤกษเคมีเหล่านี้หลายชนิดมีฤทธิ์ต่อต้านหรือป้องกันโรคบางชนิดและโรคสำคัญที่มักจะกล่าวกันว่าสารกลุ่มนี้ช่วยป้องกันได้คือโรคมะเร็ง กลไกการทำงานของสารพฤกษเคมีเมื่อเข้าสู่ร่างกายอาจเป็นไปโดยการช่วยให้เอนไซม์บางกลุ่มทำงานได้ดีขึ้น เอนไซม์บางชนิดทำหน้าที่ทำลายสารก่อมะเร็งที่เข้าสู่ร่างกาย มีผลทำให้สารก่อมะเร็งหมดฤทธิ์ ซึ่งปัจจุบันพบสารพฤกษเคมีแล้วมากกว่า 15,000 ชนิด (วินัย ดะห์ลัน, 2550)

**2.8 วิธีการสกัดสาร**

2.8.1 การสกัดด้วยตัวทำละลาย (solvent extraction)

เทคนิคการสกัดด้วยตัวทำละลาย ใช้หลักการของการละลาย ฉะนั้นจำเป็นต้องทราบถึงหลักการของการละลาย ความมีขั้ว (polarity) ของทั้งตัวทำละลายและสารสำคัญ โดยสารสำคัญจะ

สามารถละลายในตัวทำละลายได้ก็ต่อเมื่อความเป็นขั้วของตัวสารสำคัญกับตัวทำละลายมีค่าใกล้เคียงกัน (like dissolves like) คือ ตัวถูกละลายที่มีขั้วจะละลายในตัวทำละลายที่มีขั้วเพราะแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลมีขั้วเป็นแรงไดโพล-ไดโพล (dipole-dipole) ในทางตรงข้าม ตัวถูกละลายที่ไม่มีขั้วจะละลายในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว เพราะแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลไม่มีขั้วเป็นแรงแวนเดอวาลส์ (van der waals force) เหมือนกัน ทั้งนี้ตัวทำละลายที่มีขั้วไม่เท่ากันจะมีความสามารถในการละลายสารชนิดเดียวกันได้ไม่เท่ากัน ความมีขั้วจะมีความสัมพันธ์กับค่าคงที่ไดอิเล็กตริก (dielectric constant) ของตัวทำละลาย กล่าวคือ ค่าคงที่ไดอิเล็กตริกที่อยู่ในช่วง 1–20, 20–50 และมากกว่า 50 บ่งชี้ว่าตัวทำละลายนั้นไม่มีขั้ว กึ่งมีขั้ว และมีขั้ว ตามลำดับ ค่าคงที่ไดอิเล็กตริกนี้สามารถบ่งชี้ถึงความเป็นขั้วของตัวทำละลายได้ในระดับหนึ่งโดยข้อมูลของตัวทำละลายบางชนิด

2.8.2 การสกัดแบบหมัก (maceration)

หลักการการสกัดแบบการหมัก คือ การแช่ตัวอย่างในตัวทำละลาย จนกระทั่งตัวทำละลายแทรกซึมเข้าไปละลายสารสำคัญในตัวอย่าง หลังจากนั้นจึงกรองแยกตัวอย่างออกจากตัวทำละลายและปรับปริมาตรสารสกัดตามความต้องการ ข้อดีของการสกัดแบบหมัก คือ เหมาะกับสารสำคัญที่ไวต่อความร้อน ข้อเสีย คือ ต้องกวนบ่อย ใช้ตัวทำละลายมาก และมีค่าใช้จ่ายสูง (Neelapong *et al.*, 2018)

2.8.3 การสกัดด้วยคลื่นไมโครเวฟ (microwave assisted extraction)

วิธีสกัดด้วยไมโครเวฟจะใช้พลังงานไมโครเวฟเพื่อแบ่งประเภทของสารตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์โดยการนำตัวอย่างลงไปในตัวทำละลายจากนั้นรังสีไมโครเวฟจะทำปฏิกิริยากับขั้วของตัวอย่างที่นำมาสกัดทำให้เกิดความร้อนบนพื้นผิวของตัวอย่าง ความร้อนที่เกิดขึ้นมาจากการหมุนของโมเลกุลในขั้วของตัวอย่างที่เกิดจากคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า โดยการรบกวนพันธะไฮโดรเจน และช่วยเพิ่มการเคลื่อนย้ายไอออนที่ละลายน้ำในการแทรกซึมตัวทำละลายให้เข้าไปในเนื้อของตัวอย่างที่นำมาสกัด วิธีการสกัดด้วยไมโครเวฟเหมาะสำหรับใช้สกัดร่วมกับตัวทำละลายที่มีขั้ว (Azwanida, 2015)

2.8.4 การสกัดด้วยคลื่นเสียง (sonication extraction)

วิธีการสกัดด้วยคลื่นเสียงจะเกี่ยวข้องกับการใช้คลื่นอัลตราซาวน์ที่ย่านความถี่ตั้งแต่ 20 kHz - 2,000 kHz โดยใช้กลไกการเกิดช่องว่างระหว่างอากาศและคลื่นเสียงอัลตราซาวน์เพื่อเพิ่มผิวสัมผัสระหว่างตัวทำละลายกับตัวอย่างที่นำมาสกัดให้มีความสามารถในการซึมผ่านผนังเซลล์ คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของตัวอย่างที่สัมผัสคลื่นเสียงอัลตราซาวน์จะมีการเปลี่ยนแปลงและถูกทำลายผนังเซลล์ โดยวิธีการสกัดโดยใช้คลื่นเสียงเป็นวิธีที่เรียบง่ายมักนิยมนำไปใช้ในการสกัดสารพฤกษเคมีในพืช (Azwanida, 2015)

2.8.5 การสกัดด้วยเครื่อง soxhlet (soxhlet extraction)

การสกัดโดยใช้เครื่อง Soxhlet จะใช้ขวดก้นกลมที่มีตัวทำละลายและตัวอย่างที่นำมาสกัดโดยให้ความร้อนต่ำ ตัวทำละลายในขวดจะระเหยกลายเป็นไอผ่านท่อแก้วขึ้นไปยังเครื่องควบแน่นซึ่งใช้ความเย็น ไอน้ำของตัวทำละลายจะถูกควบแน่นจะกลายเป็นของเหลวไหลลงสู่อุปกรณ์ซึ่งจะมีตัวอย่างที่ต้องการสกัดบรรจุอยู่ภายใน trimber จะสังเกตได้ว่าในส่วนของอุปกรณ์ที่มีตัวอย่างจะมีระดับของเหลวของตัวทำละลายสูงขึ้น จนกระทั่งระดับของตัวทำละลายถึงขีดที่กำหนด สารสกัดและตัวทำละลายที่ได้จะไหลกลับสู่ขวดก้นกลมด้านล่างเหมือนเดิมโดยผ่านทางแขนไซฟอน (siphone arm) เมื่อให้ความร้อนอย่างต่อเนื่องตัวทำละลายที่อยู่ในขวดก้นกลมจะระเหยแล้วเข้าสู่วงจรการสกัดเดิมวนไปเรื่อย ๆ จนกระทั่งไม่มีสารสกัดออกมาจากตัวอย่างที่นำมาสกัดอีก โดยการสังเกตจากสีของตัวอย่าง วิธีการสกัดโดยใช้เครื่อง soxhlet เป็นวิธีที่นิยมเป็นอย่างมากในการสกัดสารพฤกษเคมีจากพืชเนื่องจากสามารถสกัดสารสารพฤกษเคมีได้อย่างครบถ้วนและมีประสิทธิภาพ (De Castro & Priego-Capote, 2010)

**2.9 ประเภทของสารพฤกษเคมี**

กลุ่มสารเคมีที่พบในพืชมีจำนวนมากสามารถแบ่งกลุ่มสารเคมีในพืชตามสารตั้งต้น (biosynthetic origin) ของสารเหล่านี้ได้เป็น 2 กลุ่ม คือ สารปฐมภูมิ (primary metabolites) และสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) สารปฐมภูมิ เป็นสารเคมีพื้นฐานที่พบในพืชชั้นสูงโดยทั่วไป พบได้ในพืชเกือบทุกชนิด เป็นกลุ่มสารที่เกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมที่จำเป็น (essential metabolism) ของเซลล์ ส่วนใหญ่เป็นสารที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์แสงของพืช และกระบวนการชีวสังเคราะห์ กรดอะมิโนบางชนิด สารปฐมภูมิ เช่น คาร์โบไฮเดรต (carbohydrates) ไขมัน (lipids) โปรตีน (proteins) กรดอะมิโน (amino acids) และเอนไซม์ (enzymes) ส่วนสารทุติยภูมิ เป็นสารประกอบที่พบแตกต่างกันในพืชแต่ละชนิด สารเหล่านี้เกิดจากกระบวนการชีวสังเคราะห์ มักจะแสดงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาอย่างชัดเจน อย่างไรก็ตามสารทุติยภูมิยังเกี่ยวข้องในวงจรเมแทบอลิซึมพื้นฐานในเซลล์สิ่งมีชีวิต สารทุติยภูมิสามารถแบ่งเป็นกลุ่มใหญ่ๆ ได้ดังนี้

1. อัลคาลอยด์ (alkaloids) เป็นสารอินทรีย์ที่มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบ มักพบมากในพืชชั้นสูงมีสูตรโครงสร้างซับซ้อนและแตกต่างกัน ปัจจุบันพบอัลคาลอยด์มากกว่า 5,000 ชนิด คุณสมบัติของอัลคาลอยด์ส่วนใหญ่มักมีรสขม เป็นผลึกไม่มีสี สามารถรวมตัวกับทั้งกรดอินทรีย์ และกรดอนินทรีย์ อยู่ในรูปของเกลือ ในธรรมชาติมักพบอยู่ในรูปเกลือของกรดอินทรีย์ในรูปอิสระ (free base) ไม่ละลายน้ำหรือละลายได้เพียงเล็กน้อย แต่สามารถละลายน้ำได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ อัลคาลอยด์ มีประโยชน์ในการรักษาโรคตัวอย่างเช่น caffeine

2. ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) สารประกอบโพลีฟีนอลิก (polyphenolic compound) จำพวกฟีนิลโครโมน (phenyl choromones) พบมากในธรรมชาติโดยมักพบเป็นเม็ดสี (pigment) ในส่วนต่าง ๆ ของพืชโดยเฉพาะในส่วนดอกมีโครงสร้างพื้นฐานเป็น $C_6$-$C_3$-$C_6$ ส่วนใหญ่จะประกอบไปด้วย pyran ring จับกับ 3 carbon chain และ 1 benzene ring ฟลาโวนอยด์หลายชนิดมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ตัวอย่างเช่น genistein ที่พบมากในถั่วเหลือง และ kaempferol ที่พบมากในกระชาย

3. แอนทราควิโนน (anthaquinones) เป็นสารควิโนนที่พบมากที่สุดพบได้ทั้งในรูปอิสระและกลัยโคไซด์ มีโครงสร้างพื้นฐานประกอบด้วย 3 วงแหวน เป็นสารที่มีสีแดง-ส้ม แต่อาจจะพบได้ตั้งแต่สีเหลือง-น้ำตาล ส่วน aglycone ของแอนทราควิโนนละลายได้ดีในด่างให้สีชมพู-แดง ละลายได้ในตัวทำละลาย เช่น เบนซีน อีเทอร์ คลอโรฟอร์ม แอนทราควิโนนเกือบทุกตัวมีจุดหลอมเหลวสูง ส่วนใหญ่นำมาใช้ประโยชน์เป็นยาระบายและยาถ่าย นอกจากนี้ใช้เป็นสีย้อม ยารักษาเชื้อราที่ผิวหนังอีกด้วย ตัวอย่างเช่น chrysophanol

4. คูมาริน (coumarin) เป็นแลคโทนของ O-hydroxy cinnamic acid ในพืชพบได้ทั้งในรูปอิสระและในรูปกลัยโคไซด์ คูมารินเกือบทั้งหมดในธรรมชาติจะมีออกซิเจนที่ตำแหน่งที่ C-7 (อาจพบในรูปของ hydroxyl หรือ alkoxyl) สารบางตัวระเหยได้นำมาใช้ประโยชน์ในหลายด้าน เช่น สารแต่งกลิ่น ยาบำรุงเลือด รักษาโรคด่างขาว ตัวอย่างเช่น umbelliferone

5. ซาโปนิน (saponins) มีส่วน aglycone เป็นสารพวก steroids หรือ triterpenoids ส่วนนี้จะจับกับส่วนน้ำตาล หรืออนุพันธุ์ของน้ำตาลที่ตำแหน่ง $C_3$ ได้เป็น O-glycoside ซาโปนินกลัยโคไซด์มีคุณสมบัติบางอย่างคล้ายสบู่ เช่น สามารถเกิดฟองเมื่อเขย่ากับน้ำเป็นสารลดแรงตึงผิวที่ดี และทำให้เม็ดเลือดแดงแตกได้ตัวอย่างเช่น glycyrrhtzin ซึ่งมี aglycone เป็น triterpenoids และมีโมเลกุลของน้ำตาล 2 โมเลกุลเกาะตำแหน่งที่ 3

6. แทนนิน (tannins) เป็นสารจำพวกโพลีฟีนอลิกที่มีโมเลกุลค่อนข้างใหญ่และซับซ้อน พบได้ทั่วไปในพืชเกือบทุกชนิด เป็นสารที่แยกให้บริสุทธิ์ได้ยากเพราะไม่ตกผลึก พบได้ทั้งในรูปอิสระและรูปกลัยโคไซด์ คุณสมบัติและชนิดของแทนนินขึ้นอยู่กับขนาดของโมเลกุล แทนนินใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมฟอกหนัง เนื่องจากแทนนินสามารถตกตะกอนโปรตีนที่หนังสัตว์ได้ หรือใช้เป็นยาฝาดสมาน เป็นส่วนผสมในตำรายาแก้ท้องเสีย หรือใช้กับบาดแผลที่ผิวหนัง เพื่อให้แผลหายเร็วขึ้น ตัวอย่างเช่น gallotannin

7. เทอร์พีนอยด์ (terpenoids) เป็นสารทุติยภูมิที่พบมากที่สุดในธรรมชาติ พบได้ทั้งในพืชและสัตว์ประกอบด้วยหน่วยที่เล็กที่สุด เรียกว่า isoprene unit ซึ่งเป็นสายโซ่กิ่ง (branch chain) ของ คาร์บอน 5 อะตอม เทอร์พีนอยด์ มีโครงสร้างได้หลายแบบและมีหมู่ฟังก์ชัน (functional group) แตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นกับการจัดเรียงตัวของคาร์บอนใน isoprene unit การปิดวงแหวนและการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation reaction) หรือปฏิกิริยารีดักชัน (reduction reaction)

8. สเตอรอยด์ (steroids) มีโครงสร้างพื้นฐานเป็นสารจำพวกสเตอรอยด์มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับสารในกลุ่ม tetracyclic triterpenes มากเป็นกลุ่มสารที่มีความสำคัญเนื่องจากนำไปใช้ประโยชน์เป็นยาลดการอักเสบ ยารักษาโรคหัวใจ ยาขับปัสสาวะ ตลอดจนนำมาสังเคราะห์เป็นฮอร์โมนเพศ และยาคุมกำเนิด ตัวอย่างเช่น testosterone ซึ่งเป็นฮอร์โมนเพศชาย

9. คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ (cardiac glycosides) เป็นไกลโคไซด์ที่ออกฤทธิ์ที่กล้ามเนื้อหัวใจ โดยไปเพิ่มแรงบีบตัวของกล้ามเนื้อหัวใจ ใช้รักษาโรคหัวใจวาย ผลการรักษาขึ้นอยู่กับชนิดของ aglycone และจำนวนของน้ำตาล น้ำตาลจะช่วยให้คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ ละลายได้ดีขึ้นเป็นผลให้การดูดซึมและการกระจายตัวของสารในร่างกายเพิ่มขึ้น จึงช่วยให้การออกฤทธิ์ของสารดียิ่งขึ้น ตัวอย่างเช่น oleandrin พบในยี่โถ (วันดี กฤษณพันธ์, 2544)

**2.10 ประโยชน์ของสารพฤกษเคมี**

1. ทำให้พืชมีสี กลิ่นและรส
2. ช่วยกำจัดสารพิษ
3. ทำให้ร่างกายทำงานประสานงานกันอย่างมีประสิทธิภาพ
4. ควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์ ควบคุมการออกฤทธิ์ของฮอร์โมน
5. ลดความเสียหายที่เกิดขึ้นกับดีเอ็นเอ เป็นกลไกสำคัญกลไกหนึ่งที่ทำให้ลดการเกิดมะเร็งได้
6. มีฤทธิ์ทางชีวภาพอาจต่อต้าน หรือป้องกันโรคบางชนิด

**2.11 สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant)**

สารต้านอนุมูลอิสระ หรือ antioxidant คือ สารที่สามารถยับยั้ง หรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดอนุมูลอิสระ (free radical) เช่น การเกิดออกซิเดชันของลิพิด (lipid oxidation) สามารถแบ่งตามกลไกการยับยั้งได้เป็น 3 ชนิดคือ

1. preventive antioxidant ป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระ
2. scavenging antioxidant ทำลายหรือยับยั้งอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น
3. chain breaking antioxidant ทำให้ลูกโซ่ของการเกิดอนุมูลอิสระสิ้นสุดลง หรือการช่วยชะลอการเกิดออกซิเดชั่น ซึ่งเป็นตัวทำให้แก่เร็ว ริ้วรอยมากขึ้น และเจ็บป่วยได้ง่าย

อนุมูลอิสระคืออะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนไม่เป็นคู่ อยู่ในวงอิเล็กตรอนวงนอกสุด (outer orbital) เนื่องจากการมีอิเล็กตรอนที่โดดเดี่ยว (unpaired electron) อยู่ในวงโคจรของโมเลกุล ทำให้ไม่เสถียร ทำให้อนุมูลอิสระเป็นสารที่มีความไวในการเข้าทำปฏิกิริยาทางเคมีกับสารอื่นสูงมาก โดยอนุมูลอิสระจะไปแย่งจับหรือดึงเอาอิเล็กตรอนจากโมเลกุลหรืออะตอมสารที่อยู่ข้างเคียงเพื่อให้ตัวมันเสถียรโมเลกุลที่อยู่ข้างเคียงที่สูญเสียหรือรับอิเล็กตรอนจะกลายเป็นอนุมูลอิสระชนิดใหม่

ซึ่งอนุมูลอิสระที่เกิดมาใหม่นี้จะไปทำปฏิกิริยากับสารโมเลกุลอื่นต่อไป เกิดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain reaction) ต่อกันไปเรื่อย ๆ โดยที่อนุมูลอิสระก็มีสมบัติเหมือนสารทั่ว ๆ ไปตรงที่ความสามารถในการเข้าทำปฏิกิริยากับสารอื่นสามารถเปลี่ยนแปลงได้ตามอุณหภูมิความเป็นกรดด่าง (pH) และความชื้น เป็นต้น อนุมูลอิสระมีทั้งที่อยู่ในสภาวะที่เป็นกลางทางไฟฟ้าและอนุมูลในสภาวะที่มีประจุไฟฟ้าโดยมีทั้งประจุบวกและประจุลบสัญลักษณ์ทางเคมีของอนุมูลอิสระคืออิเล็กตรอนเดี่ยวของอนุมูลอิสระจะแสดงด้วยจุดในตำแหน่งข้างบนของสัญลักษณ์ทางเคมีเช่น อนุมูล $R^{\bullet}$ แทนอะตอมหรือโมเลกุลของอนุมูลอิสระที่ไม่จำเพาะเจาะจง ซึ่งอนุมูลอิสระมีทั้งที่เป็นประจุบวก ($R^{+\bullet}$) เช่น อนุมูล pyridinyl ($NAD^{+\bullet}$) และประจุลบ ($R^{-\bullet}$) เช่น อนุมูล superoxide ($O2^{-\bullet}$) หรือเป็นกลาง เช่น อนุมูล peroxyl ($ROO^{\bullet}$) หรืออนุมูล thiyl ($RS^{\bullet}$) เป็นต้น อนุมูลอิสระที่มีความสำคัญในทางชีวภาพ ได้แก่ hydroxyl radical ($^{\bullet}OH$) และ superoxide anion ($O2^{-\bullet}$) เป็นต้น อนุมูลเหล่านี้จัดเป็นอนุมูลที่ไว ในการเกิดปฏิกิริยาทางเคมีกับสารอื่นสูงมาก หรือการเกิดภาวะถูกออกซิไดซ์เกินสมดุล (oxidative stress) คือ การที่อนุมูลอิสระเกิดขึ้นใน ปริมาณมากเกินกว่าที่ระบบป้องกันจะยับยั้งได้หมด ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคต่าง ๆ เช่นโรคหลอดเลือดอุดตัน เป็นสาเหตุร่วมกับการเกิดมะเร็ง ทำให้ผิวหนังเกิดรอยเหี่ยวย่น เป็นต้น (Kaewamatawong & Jounmunkong, 2006)

**2.12 เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)**

โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) เป็นเทคนิคการวิเคราะห์โดยการแยกที่ใช้กันอย่างแพร่หลายทั้งในการวิเคราะห์ทางด้านเภสัชภัณฑ์ ชีวโมเลกุล โพลิเมอร์ สารประกอบอินทรีย์และสารประกอบไอออนิก โครมาโทกราฟีของเหลว (LC) เป็นเทคนิคแยกสารแบบทางกายภาพ ด้วยการทำงานระหว่างสองเฟส คือ เฟสของแข็ง (solid phase) และเฟสของเหลว (liquid phase) ตัวอย่างสารจะถูกแยกออกเป็นส่วนประกอบด้วยตัววิเคราะห์ โดยการกระจาย การแบ่งส่วน การดูดซับ หรือการทำปฏิกิริยาอื่น ๆ ระหว่างเฟสเคลื่อนที่ และเฟสคงที่ จะเป็นอนุภาคซิลิกาที่มีรูพรุนซึ่งจะเป็นตัวดูดซับที่บรรจุอยู่ภายในคอลัมน์ ของเหลวที่เป็นเฟสเคลื่อนที่ ตัวอย่างเช่น ตัวทำละลายอินทรีย์ต่าง ๆ อย่างเฮกเซน HPLC เป็นโครมาโทกราฟีของเหลวในรูปแบบที่ทันสมัยใช้คอลัมน์อนุภาคขนาดเล็ก และใช้การปั๊มของเหลวเคลื่อนที่ด้วยแรงดันสูงในการทำงาน (Dong, 2006)

**2.13 เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี – แมสสเปกโทรเมทรี (Gas Chromatography Mass Spectrometry, GC-MS)**

เป็นเทคนิคที่สามารถทำนายชนิดขององค์ประกอบที่มีอยู่ในสารได้อย่างค่อนข้างแม่นยำโดยอาศัยการเปรียบเทียบลายพิมพ์ของเลขมวล (mass number) ของสารตัวอย่างนั้น ๆ กับข้อมูลที่มีอยู่ นอกจากนี้เทคนิคนี้ยังมีความสามารถในการวิเคราะห์ได้ทั้งในเชิงปริมาณ (quantitative analysis)

และเชิงคุณภาพ (qualitative analysis) ได้อย่างถูกต้อง mass spectrometer เป็นเครื่องที่ใช้ตรวจวัดองค์ประกอบที่มีอยู่ในสารตัวอย่าง โดยอาศัยกลไกคือโมเลกุลขององค์ประกอบที่ถูกแยกออกมาจากสารตัวอย่างโดยเครื่อง GC นั้นจะถูกไอออไนซ์ในสภาวะที่เป็นสุญญากาศ แล้วตรวจวัดออกมาเป็นเลขมวล เทียบกับข้อมูลอ้างอิงแล้วแปลผลออกมาเป็นชื่อขององค์ประกอบนั้นๆ หลักการทำงานของเครื่อง GC-MS นั้นเริ่มจากนำตัวอย่างฉีดเข้าเครื่อง GC จากนั้นสารจะถูกแยกออกเป็นองค์ประกอบต่าง ๆ เมื่อผ่านเข้าสู่คอลัมน์ที่อยู่ในตู้อบความร้อนจากนั้นองค์ประกอบใดที่ถูกแยกออกมาจากคอลัมน์ก่อนก็จะผ่านเข้าไปในส่วนของเครื่อง MS ซึ่งมีสภาวะเป็นสุญญากาศก่อน แล้วเข้าไปในส่วนผลิตไอออนซึ่งจะทำหน้าที่ไอออไนซ์โมเลกุลที่ผ่านเข้ามาให้กลายเป็นประจุ จากนั้นประจุเหล่านี้จะเดินทางผ่านเครื่องคัดเลือกและแยกขนาดของประจุ (mass analyzer) เพื่อให้ทราบว่าประจุเหล่านั้นประกอบไปด้วยขนาดมวลเท่าใดบ้าง ก่อนที่จะเดินทางเข้าสู่เครื่องตรวจวัด เพื่อทำการตรวจหาปริมาณของประจุแล้วแปลผลออกมาเป็นปริมาณขององค์ประกอบแต่ละตัวที่มีอยู่ในสารตัวอย่าง

GC-MS เป็นเทคนิคแรกสุดที่ใช้ในการวิเคราะห์ใช้คอลัมน์อัดแน่น (packed column) ซึ่งมีอัตราการไหลของแก๊สพา (carrier gas) ประมาณ 20 มิลลิลิตรต่อนาที จะใช้ส่วนต่อประสานที่เรียกว่า jet separator เพื่อไม่ให้เครื่อง MS สูญเสียสุญญากาศ โดยตัวอย่างจะถูกชะออกมาทางหัวฉีด (jet) และผ่านเข้าสู่ช่องแคบๆ โมเลกุลของสารตัวอย่างซึ่งหนักกว่าแก๊สพาจะมีโมเมนตัมเพิ่มขึ้นทำให้โมเลกุลแก๊สพาซึ่งเบากว่าจะหักเหและถูกสูบออกไป ส่วนการวิเคราะห์ด้วยคอลัมน์แคปิลารีซึ่งมีอัตราการไหลของแก๊สพาเพียง 0.5-0.2 มิลลิลิตรต่อนาที สามารถต่อตรงเข้าสู่แหล่งกำเนิดไอออนของเครื่อง MS ได้โดยตรง

สารประกอบที่นำมาวิเคราะห์ด้วย GC-MS มักมีมวลโมเลกุลไม่เกิน 700 เอเอ็มยู เนื่องจากสารประกอบนั้นจะต้องระเหยได้ GC-MS สามารถให้ข้อมูลเพื่อการวิเคราะห์ได้หลายประเภท ได้แก่ โครมาโทแกรม ซึ่งอาจเป็นการพล๊อตระหว่างปริมาณของมวลทั้งหมดที่ผ่านเข้าสู่เครื่องวิเคราะห์กับเวลา เรียกว่า TIC (total ion chromatogram) หรือการนับเฉพาะไอออนที่มีมวลต่อประจุค่าหนึ่งๆ เท่านั้นกับเวลา เรียกว่า SIM (selected Ion monitoring) ขีดจำกัดการวิเคราะห์ของ TIC และ SIM อยู่ที่ 1-10 พิโคกรัมตามลำดับ เนื่องจากการพล๊อตแบบ SIM มีสัญญาณรบกวนน้อยกว่า ข้อมูลประเภทที่สอง คือสเปกตรัมมวลของแต่ละพีคบนโครมาโทแกรมสามารถนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์ หาสูตรโมเลกุล สูตรโครงสร้าง และมวลโมเลกุลได้ ข้อมูลสุดท้ายคือ รีเทนชันไทม์ (retention time) สามารถนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์ประกอบสเปกตรัมมวลได้

แหล่งกำเนิดไอออนสำหรับ GC-MS ที่นิยมใช้กันมี 2 แบบ คือ electron Impact (EI) ซึ่งให้สารตัวอย่างชนกับอิเล็กตรอน ทำให้โมเลกุลไอออนของสารตัวอย่างมีพลังงานการสั่นสะเทือนและการหมุนหลงเหลืออยู่มาก โมเลกุลจะแตกออกเป็นไอออนย่อยจำนวนมาก สเปกตรัมมวลจึงมี

รายละเอียดค่อนข้างมาก EI เป็นแหล่งกำเนิดไอออนที่ให้สเปกตรัมมวลที่สามารถทำการสืบค้นในฐานข้อมูลได้ สามารถนำไปใช้ในการพิสูจน์โครงสร้างของสาร แหล่งกำเนิดไอออนอีกแบบหนึ่งคือ chemical Ionization (CI) ซึ่งให้สารตัวอย่างชนกับไอออนของแก๊สรีเอเจนต์ พลังงานในโมเลกุลเหลือไม่มากไม่ค่อยมีการแตกไอออนย่อย รายละเอียดบนสเปกตรัมมวลจึงน้อยกว่าแบบแรก แต่นิยมใช้สำหรับหามวลโมเลกุล

ปัจจุบันเครื่อง GC นิยมต่อกับเครื่องตรวจวัดแบบ dual detector system โดยการต่อคอลัมน์เข้ากับเครื่องตรวจวัด 2 ชนิด เครื่องหนึ่งจะเป็นเครื่องตรวจวัดทั่วไปของ GC โดยนิยมต่อกับ flame ionization detector (FID) ซึ่งเป็นเครื่องตรวจวัดที่สามารถใช้กับสารประกอบทั่วไป ส่วนเครื่องตรวจวัดอีกเครื่องจะเป็นเครื่องตรวจวัดที่สามารถให้ข้อมูลเป็นคุณสมบัติเฉพาะของสารประกอบ เช่น หมู่ฟังก์ชั่น หรือหมู่แทนที่ เช่น MS detector หรือ FTIR detector การต่อเครื่องตรวจวัดระบบนี้ทำได้หลายแบบ อาจทำโดยการแบ่งสารที่ถูกชะออกจากคอลัมน์เป็น 2 ส่วนเข้าสู่เครื่องตรวจวัดแต่ละตัว ในคอลัมน์แบบแคปิลารีสามารถทำได้โดยการใช้ตัวต่อรูปตัว T อาจต้องมีการใช้คอลัมน์ 2 ตัวที่มีวัฏภาคคงที่มีคุณสมบัติเหมือนกันทุกประการ ปลายแต่ละคอลัมน์ต่อกับเครื่องตรวจวัดแต่ละตัว แต่การเลือกคอลัมน์ที่มีวัฏภาคคงที่มีคุณสมบัติเหมือนกันทุกประการค่อนข้างยาก และต้องทำการตรวจสอบคุณสมบัติบ่อยๆ เพื่อผลการแยกสารที่เหมือนกัน นอกจากนั้นยังอาจต่อเครื่องตรวจวัดแบบเรียงลำดับ โดยนำเครื่องตรวจวัด 2 เครื่องมาต่อกัน แต่ข้อจำกัดของการต่อแบบนี้คือ เครื่องตรวจวัดตัวแรกจะต้องไม่ทำลายโครงสร้างของโมเลกุลสารตัวอย่าง เช่น ECD หรือ ETIR เป็นต้น

GC-MS นิยมนำมาประยุกต์ใช้สำหรับการวิเคราะห์สารประกอบที่ระเหยได้ เช่น สารแต่งกลิ่น กรดไขมัน ตัวทำละลายที่หลงเหลืออยู่ น้ำมันหอมระเหยในพืช นอกจากนั้นยังนำมาประยุกต์ใช้งานด้านนิติวิทยาศาสตร์ เช่น การวิเคราะห์สารเสพติด หรือการใช้ตรวจสอบฮอร์โมนในนักกีฬา (อรอุมา และมาลัย, 2549)

**2.14 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสกุลเปราะ**

จิราภรณ์ ผุดผ่อง และคณะ (2558) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเปราะราศี (*K. larsenii* Sirirugsa) ที่มีสถานภาพเป็นพืชที่มีแนวโน้มใกล้สูญพันธุ์ พืชถิ่นเดียว และพืชหายากของประเทศไทยในหลอดทดลอง โดยเพาะเลี้ยงหน่ออ่อนเปราะราศีบนอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS) (1962) ที่เติมฮอร์โมนกลุ่มไซโทไคนิน (BA, Kinetin และ TDZ) ความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 2, 3, 4 และ 5 มก./ล. ฮอร์โมนกลุ่มไซโทไคนิน (BA ร่วมกับ Kinetin หรือ TDZ) และฮอร์โมนกลุ่มออกซิน (IAA, IBA และ NAA) ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5, 1, 1.5 และ 2 มก./ล. เป็นเวลา 8 สัปดาห์ เพื่อชักนำให้เกิดยอดและราก พบว่าหน่ออ่อนเปราะราศีที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 1 มก./ล.

สามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ยมากที่สุด 6.6 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช และหน่ออ่อนเปราะราศีที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม IAA ความเข้มข้น 0.5 มก./ล. สามารถชักนำให้เกิดรากเฉลี่ยมากที่สุด 10.60 รากต่อชิ้นส่วนพืช

Geetha *et al.* (1997) นำหน่ออ่อน *K. galanga* และ *K. rotunda* มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน Kinetin ความเข้มข้น 0.5 มก./ล. ร่วมกับน้ำตาลซูโครส 1.5% และเติมวุ้น 0.7% เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่าชักนำให้เกิดยอด 7 ยอด/ชิ้นส่วนพืช และราก 5 ราก/ชิ้นส่วนพืช เมื่อนำต้นอ่อนที่มีใบ 3-5 ใบ และมีราก 6-10 ราก ย้ายลงปลูกในกระถางภายในเรือนเพาะชำที่มีวัสดุปลูกคือ ดินทราย ดินสวน และเวอร์คูมิไลท์ อัตราส่วน 1:1:1 เป็นเวลา 12-14 สัปดาห์ พบว่ามีการเจริญของรากที่ดี และแข็งแรง มีอัตราการรอดชีวิตสูงถึง 90-95 เปอร์เซ็นต์ ต้นอ่อนที่ย้ายปลูกจะเริ่มมีการงอกใบและรากใหม่เมื่อปลูกไปแล้ว 20-30 วัน

Rahman *et al.* (2004) ชักนำให้เกิดแคลลัสและการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอจากชิ้นส่วนใบของ *K. galanga* เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นเวลา 7 สัปดาห์ พบว่าเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1.5 มก./ล. ร่วมกับ BA 1.0 มก./ล. สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสสูงที่สุด หลังจากนั้นนำแคลลัสย้ายลงในอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน BA ความเข้มข้น 2.0 มก./ล. ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.1 มก./ล. พบว่าสามารถชักนำให้เกิดเอ็มบริโอรูปทรงกลมขนาดเล็กก่อนที่จะนำไปพัฒนาต่อโดยการเลี้ยงบนสูตรอาหารเดียวกัน และเมื่อนำต้นอ่อนย้ายลงปลูกลงในดินและโคโคพีท ปรับสภาพพืชให้ชินกับสภาพแวดล้อม พบว่ามีอัตราการรอดชีวิตสูงถึง 95 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาเมื่อนำต้นอ่อนย้ายปลูกในดินที่มีส่วนผสมของดินสวน ปุ๋ยหมัก และทราย อัตรา 2:2:1 พบว่าต้นอ่อนมีอัตราการรอดชีวิต 90 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้เมื่อนำต้นอ่อนย้ายลงปลูกในกระถางที่มีปุ๋ยอินทรีย์พบว่ามีอัตราการรอดชีวิต 85 เปอร์เซ็นต์

Swapna *et al.* (2004) เพาะเลี้ยงใบและเหง้าของ *K. galanga* บนอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน IAA, BAP, NAA, 2,4-D และ Kinetin ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.5-2.5 มก./ล. เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่ามีการชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนเหง้าสูงสุด 78.3 เปอร์เซ็นต์ บนอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน IAA ความเข้มข้น 2.5 มก./ล. ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 2.5 มก./ล. และมีการชักนำให้เกิดรากจากชิ้นส่วนเหง้าสูงสุด 50 เปอร์เซ็นต์ บนอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน IAA ความเข้มข้น 0.5 มก./ล. ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 2.0 มก./ล.

Chirangini *et al.* (2005) เพาะเลี้ยงตาเหง้าของ *K. galanga* และ *K. rotunda* บนอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน BAP ความเข้มข้น 4.44 มก./ล. พบว่า *K. galanga* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน BAP ความเข้มข้น 4.44 ไมโครโมล. สามารถชักนำให้เกิดยอดสูงสุด 13 ยอด/ชิ้นส่วนพืช และ *K. rotunda* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน NAA ความ

เข้มข้น 2.69 ไมโครโมล. ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 2.22 ไมโครโมล. สามารถชักนำให้เกิดยอดสูงสุด 9 ยอด/ชิ้นส่วนพืช เมื่อนำต้นอ่อนของพืชทั้ง 2 ชนิด ย้ายออกปลูกในกระถางพบว่ามีอัตราการรอดชีวิต 80-90 เปอร์เซ็นต์ และเจริญเติบโตเต็มที่เมื่อย้ายออกปลูกแล้วเป็นเวลา 12 สัปดาห์ ใน *K. rotunda* พบใบมีลักษณะสีดำหลังจากปลูกไปแล้ว 8 สัปดาห์ และเมื่อนำต้นที่ย้ายออกปลูกย้ายลงวัสดุปลูกใหม่ที่มีส่วนผสมของทรายแม่น้ำกับปุ๋ยคอก อัตราส่วน 1:1 พบว่ามีการแตกยอดใหม่ 4-6 ยอด หลังย้ายออกปลูกได้เพียง 2 สัปดาห์ และเจริญเติบเต็มที่หลังปลูกไปแล้ว 4 สัปดาห์

Rahman *et al.* (2005) เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายเหง้าและตาข้างของ *K. galanga* บนอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมนกลุ่มออกซิน (NAA, IBA และ IAA) ร่วมกับฮอร์โมนกลุ่มไซโตไคนิน (BA และ Kinetin) เป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน BA ความเข้มข้น 1.0 มก./ล. ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.1 มก./ล. สามารถชักนำให้เกิดยอดสูงสุด 20.50 ยอด/ชิ้นส่วนพืช และอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน IBA 0.2 มก./ล. สามารถชักนำให้เกิดรากเฉลี่ยสูงสุด 12.40 ราก/ชิ้นส่วนพืช เมื่อย้ายต้นอ่อนออกปลูกด้วยโคโคพีทในกระถาง พบว่าต้นพืชมีความแข็งแรง และมีอัตราการรอดชีวิตสูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาเมื่อนำต้นอ่อนย้ายออกปลูกโดยใช้วัสดุปลูกที่มีส่วนผสมของดินสวน ปุ๋ยหมัก และทราย (อัตราส่วน 2:2:1) ตามลำดับ พบว่ามีอัตราการรอดชีวิต 90 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อนำต้นอ่อนย้ายลงปลูกในวัสดุปลูกเป็นดินและปุ๋ยอินทรีย์ พบว่ามีอัตราการรอดชีวิต 85 เปอร์เซ็นต์

Parida *et al.* (2010) เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตาเหง้าของ *K. galanga* ในอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน BA, IAA, IBA, NAA และ adenine sulphates (Ads) เพื่อชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนตาเหง้า เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่าอัตราการชักนำให้เกิดยอดสูงสุด 11.5 ยอด/ชิ้นส่วนพืช เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน BA ความเข้มข้น 1.0 มก./ล. ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 0.5 มก./ล. เมื่อย้ายต้นอ่อนในหลอดทดลองออกปลูกในเรือนเพาะชำด้วยกระถางดินที่มีส่วนผสมของดิน ปุ๋ยคอก และทราย อัตราส่วน 1:1:1 ตามลำดับ พบว่ามีอัตราการรอดชีวิต 95 เปอร์เซ็นต์

Mohanty *et al.* (2011) เพาะเลี้ยงตาเหง้า *K. galanga* บนอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน BA ความเข้มข้น 1.0 มก./ล. ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 0.5 มก./ล. เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าชักนำให้เกิดยอดสูงสุด 10.1 ยอด/ชิ้นส่วนพืช และมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอด 90 เปอร์เซ็นต์ เมื่อย้ายต้นอ่อนออกปลูกในกระถางใช้วัสดุปลูกที่มีส่วนผสมของดิน ปุ๋ยคอก และทราย อัตราส่วน 1:1:1 ภายในเรือนเพาะชำเป็นเวลา 4 สัปดาห์ เพื่อให้ต้นพืชปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อม จากนั้นปลูกต่อไปจนถึง 12 สัปดาห์พบว่าต้นพืชมีอัตราการรอดชีวิตสูงถึง 96 เปอร์เซ็นต์ และมีความแข็งแรงสามารถเจริญเติบโตได้ตามปกติ

Bhatt *et al.* (2012) เพาะเลี้ยง *K. galanga* บนอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน BA ความเข้มข้น 5 มก./ล. และน้ำตาลซูโครส 30 กรัม ให้แสงสว่าง 16 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 สัปดาห์ พบว่าสามารถชักนำให้เกิดยอดสูงสุด 7.4±1.0 ยอด/ชิ้นส่วนพืช และมีจำนวนรากสูงสุด 31.3 ราก/ชิ้นส่วนพืช เมื่อย้ายต้นอ่อนของ *K. galanga* ออกปลูกในเรือนเพาะชำเป็นเวลา 6 สัปดาห์ โดยมีการให้แสงสว่าง 4 และ 16 ชั่วโมงต่อวัน พบว่าต้นพืชมีอัตราการรอดชีวิตสูงถึง 93.3 เปอร์เซ็นต์ และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ และต้นพืชที่ได้รับแสงสว่างเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน พบว่าต้นพืชมีความสูงที่สุดเท่ากับ 7.4 ซม. ในขณะที่ต้นพืชที่ได้รับแสงสว่างเป็นเวลา 4 ชั่วโมงต่อวัน ต้นพืชมีความสูงเท่ากับ 6.4 ซม. ต้นพืชที่ปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดีแล้วมีลักษณะต้นที่โตและแข็งแรงจะถูกนำไปไว้ในที่โล่งแจ้งเพื่อปลูกในสภาพแวดล้อมแบบธรรมชาติต่อไป

Kalpana & Anbazhagan (2015) เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเหง้าของ *K. galanga* บนอาหารสูตร MS ร่วมกับฮอร์โมน BA, NAA, IBA และ IAA ที่ระดับความเข้มข้น 0.1-3.0 มก./ล. เป็นเวลา 4 สัปดาห์พบว่ามีการชักนำให้เกิดยอดสูงสุด 19.40 ยอด/ชิ้นส่วนพืช บนอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน BA ความเข้มข้น 2.0 มก./ล. ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.2 มก./ล. มีการชักนำให้เกิดยอดขนาดเล็กสูงสุด 19.40 ยอด/ชิ้นส่วนพืช และเกิดราก 10.40 ราก/ชิ้นส่วนพืช เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน IBA ความเข้มข้น 1.0 มก./ล. เมื่อย้ายต้นอ่อนออกปลูกในกระถางพลาสติกด้วยวัสดุปลูกที่มีส่วนผสมของดินแดง ทราย และเวอร์มิคูไลท์ อัตราส่วน 1:1:1 ตามลำดับ พบว่าต้นพืชมีอัตราการรอดชีวิตสูงถึง 81 เปอร์เซ็นต์

Rajasekharan *et al.* (2015) เพาะเลี้ยงเหง้าอ่อนของ *K. galanga* บนอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน NAA ความเข้มข้น 0.54 ไมโครโมล ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 8.87 ไมโครโมล เป็นเวลา 30 วัน พบว่าชักนำให้เกิดยอดสูงสุด 8-10 ยอด/ชิ้นส่วนพืช

Zuraida *et al.* (2015) ศึกษาการชักนำให้เกิดต้นอ่อนในหลอดทดลองจากชิ้นส่วนเหง้าของ *K. parviflora* เพื่อชักนำให้เกิดเหง้าขนาดเล็ก ต้นอ่อนที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่เติมฮอร์โมน BAP 1 มก./ล. ร่วมกับ NAA 1 มก./ล. และน้ำตาลซูโครส 60 ก./ล. เป็นเวลา 4 สัปดาห์ สามารถสร้างเหง้าขนาดเล็ก 60 เปอร์เซ็นต์ จากการทดลองพบว่าน้ำหนักสดสูงสุดของเหง้าขนาดเล็กเท่ากับ 265 มก./ต้น

Saensouk *et al.* (2016) ศึกษาการเกิดแคลลัส ยอดและราก จากชิ้นส่วนเหง้าขนาดเล็กของเปราะป่า (*K. marginata*) บนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ, BA, BA ร่วมกับ TDZ และ BA ร่วมกับ Kinetin ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่ามีอัตราการเกิดแคลลัสสูงสุด 90 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเหง้าขนาดเล็กบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 2 มก./ล. ร่วมกับ TDZ 1.5, 3 และ 4 มก./ล. ให้ผลที่ดีที่สุดในการเพิ่มจำนวนยอด 4.90 ยอด/ชิ้นส่วนยอด เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 2 มก./ล. ร่วมกับ TDZ 1 มก./ล. และเกิดรากสูงสุดจากการเพาะเลี้ยงบน

อาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพืช นำต้นอ่อนที่เจริญเติบโตเต็มที่แล้วย้ายออกปลูกในเรือนเพาะชำในกระถางที่มีส่วนผสมของวัสดุปลูกคือ แกลบเผา ทราย และแกลบผสมทราย อัตราส่วน 1:1 ตามลำดับ เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ต้นพืชที่ย้ายปลูกในแกลบเผา และในแกลบเผาผสมทราย มีการงอกของยอดใหม่ มีอัตราการรอดชีวิตสูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ และมีการงอกใบเฉลี่ย 3.39 ใบ/ยอด โดยมีความสูงเฉลี่ย 9.49 ซม. ยกเว้นในวัสดุปลูกที่เป็นทราย ต้นพืชไม่สามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมได้ และใบเริ่มเปลี่ยนเป็นสีเหลืองหลังจากที่ปลูกผ่านไปแล้ว 2 สัปดาห์ และมีบางต้นตายหลังจากปลูกไปแล้ว 3 ถึง 6 สัปดาห์

Senarath *et al.* (2017) ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพในการเพิ่มจำนวนยอดของ *K. galanga* โดยการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเหง้าบนอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน BA 2 มก./ล. ร่วมกับ Kinetin 1 มก./ล. พบว่ามีอัตราการเกิดยอดสูงสุด 10.85 ยอด/ชิ้นส่วนพืช เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ มีจำนวนใบ 5.21 ใบ และความยาวราก 12.14 ซม. เมื่อนำต้นอ่อนของพืชย้ายปลูกในวัสดุปลูกที่มีส่วนผสมของดิน ทราย และปุ๋ยหมัก อัตราส่วน 1:1:1 พบว่ามีอัตราการรอดชีวิตสูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำต้นอ่อนย้ายปลูกในวัสดุปลูกที่มีดิน และแกลบ อัตราส่วน 1:1 พบว่ามีอัตราการรอดชีวิต 80 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำต้นอ่อนย้ายออกปลูกในวัสดุปลูกที่มีส่วนผสมของดิน และแกลบ อัตราส่วน 1:2 พบว่ามีอัตราการรอดชีวิต 30 เปอร์เซ็นต์

Haque *et al.* (2018) เพาะเลี้ยงตาเหง้า *K. angustifolia* บนอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน BAP ร่วมกับ Kinetin และ NAA ความเข้มข้นแตกต่างกัน พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน BAP ความเข้มข้น 2 มก./ล. ร่วมกับ Kinetin 2 มก./ล. และ NAA 1 มก./ล. พบว่าหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ มีการชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ย 6.60 ยอด/ชิ้นส่วนพืช และเมื่อย้ายลงในอาหารสูตรเดิม ครั้งที่ 2 พบว่ามีการเพิ่มจำนวนของยอดเฉลี่ย 10.30 ยอด/ชิ้นส่วนพืช และทำการย้ายลงอาหารใหม่ด้วยสูตรเดิมเป็นครั้ง 3 พบว่ามีการเพิ่มจำนวนยอดเฉลี่ยสูงที่สุดเท่ากับ 13.70 ยอด/ชิ้นส่วนพืช เมื่อเพาะเลี้ยง *K. angustifolia* บนอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน IBA ความเข้มข้น 2 มก./ล. พบว่ามีการชักนำให้เกิดรากเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 18.50 ราก/ชิ้นส่วนพืช จากนั้นเมื่อนำต้นอ่อนที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองย้ายออกปลูกในสภาพธรรมชาติพบว่ามีอัตราการรอดชีวิตเฉลี่ยสูงถึง 88.90 เปอร์เซ็นต์ หลังจากปลูกไปแล้วเป็นเวลา 36 สัปดาห์ พบว่าต้นพืชที่ย้ายออกปลูกมีการเกิดเหง้าเพื่อขยายพันธุ์

Labrooy *et al.* (2020) ได้เพาะเลี้ยง *K. paviflora* บนอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน BA ความเข้มข้น 35.52 ไมโครโมลาร์ พบว่าสามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ยสูงสุด 22.40 ยอด/ชิ้นส่วนพืช และมีความยาวรากเฉลี่ยสูงสุด 17.80 ราก/ชิ้นส่วนพืช เมื่อนำต้นอ่อนย้ายออกปลูกในเรือนเพาะชำที่ควบคุมไอน้ำ พบว่าว่าต้นพืชมีการเจริญเติบโตที่ดี

Park *et al.* (2021) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยง *K. paviflora* บนอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน BA ความเข้มข้น 8 มก./ล. ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.5 มก./ล. มีการชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ยสูงสุด 12.2 ยอด/ชิ้นส่วนพืช และอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน IBA ความเข้มข้น 2 มก./ล. พบว่ามีจำนวนรากเฉลี่ยสูงสุด 24 ราก/ชิ้นส่วนพืช มีความยาวรากเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 9.80 ซม. และมีความยาวยอดเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 7.80 ซม. และเมื่อนำต้นอ่อนของ *K. paviflora* ย้ายออกปลูกในสภาพธรรมชาติ พบว่ามีอัตราการรอดชีวิตสูงถึง 98 เปอร์เซ็นต์

Rahman *et al.* (2022) ได้นำต้นอ่อนของ *K. angustifolia* มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน BAP, Kinetin และ NAA ความเข้มข้นแตกต่างกัน พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน BAP ความเข้มข้น 5 มก./ล. ร่วมกับ Kinetin 5 มก./ล. และ NAA 0.5 มก./ล. พบว่ามีการชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ยสูงสุด 5.80 ยอด/ชิ้นส่วนพืช เมื่อนำต้นอ่อนของ *K. angustifolia* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน BAP ความเข้มข้น 3 มก./ล. ร่วมกับ NAA 0.5 มก./ล. พบว่ามีการชักนำให้เกิดรากเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 11.80 ราก/ชิ้นส่วนพืช และนำต้นอ่อนไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน BAP 1 มก./ล. ร่วมกับ น้ำตาลซูโคส 40 ก. พบว่ามีความยาวรากเฉลี่ยสูงสุด 7 ถึง 8 ซม. เมื่อนำต้นอ่อนย้ายออกปลูกในวัสดุปลูกที่มีส่วนผสมของดินอินทรีย์ และดินส่วนของหน้าดินตามธรรมชาติ ในเรือนเพาะชำที่มีการควบแสงสว่าง 75 เปอร์เซ็นต์ ด้วยถุงพลาสติก พบว่าอัตราการรอดชีวิตสูงถึง 97 เปอร์เซ็นต์ และหลังจากออกปลูกได้ 32 สัปดาห์ จะสังเกตได้ว่าต้นพืชมีการเกิดเหง้า

Nonthalee *et al*. (2022) เพาะเลี้ยงต้นอ่อนเปราะสยาม (*K. siamensis*) บนอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน BAP, BAP ร่วมกับ NAA และ Kinetin ความเข้มข้นแตกต่างกัน เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน BAP ความเข้มข้น 2 มก./ล. ร่วมกับ NAA 0.1 มก./ล. สามารถชักนำในเกิดยอดเฉลี่ยสูงสุด 7.10 ยอด/ชิ้นส่วนพืช และจำนวนรากเฉลี่ยสูงสุด 24.20 ราก/ชิ้นส่วนพืช และเมื่อนำต้นอ่อนเปราะสยามเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน BAP ความเข้มข้น 2.0 มก./ล. ร่วมกับ NAA 0.1 มก./ล. และ $AgNO_3$ 1.9 มก./ล. เติมน้ำตาลซูโครส 70 ก./ล. หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าสามารถชักนำให้เกิดเหง้าสูงสุด 70 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำต้นอ่อนเปราะสยามที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองย้ายปลูกในเรือนเพาะชำ โดยใช้วัสดุปลูก 2 ชนิด คือ ดิน และดินผสมทราย (อัตราส่วน 1:1) พบว่าต้นพืชมีอัตราการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์

**2.15 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์องค์ประกอบทางพฤกษเคมี**

**1. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และการยับยั้งอนุมูลอิสระ**

Yeap *et al.* (2017) ศึกษาสารสกัดจากเหง้าของ *K. angustifolia* ที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ โดยนำเหง้าที่แห้งแล้วมาสกัดด้วยเฮกเซน คลอโรฟอร์ม เอทิลอะซิเตต และเมทานอล การสกัดในแต่ละตัวทำละลายใช้เวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำสารสกัดที่ได้กรองผ่านกระดาษกรองแล้วนำไปแยกตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยแบบหมุน (rotary vacuum evaporator) จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH โดยการเติมสารสกัดที่ได้ 50 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย DPPH 40 มก. ที่ละลายด้วยเอทานอล 100 มล. จากนั้นบ่มไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยใช้โทรล็อกซ์เป็นสารมาตรฐาน พบว่าสารสกัดจากเหง้าของ *K. angustifolia* ที่สกัดด้วยเอทานอลและคลอโรฟอร์มมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดเท่ากับ 616 มิลลิกรัมสมมูลโทรล็อกซ์ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ รองลงมาคือ เอทิลอะซิเตต และเฮกเซน มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 588 และ 333 มิลลิกรัมสมมูลโทรล็อกซ์ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ และเมื่อนำสารสกัดจากเหง้าที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ต้านอนูมลอิสระด้วยวิธี FRAP สารละลาย FRAP ผสมกับตัวอย่างสารสกัดของเหง้าของ *K. angustifolia* ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้โทรลอกซ์เป็นสารมาตรฐาน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร พบว่าสารสกัดจากเหง้าที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตตมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดเท่ากับ 342 มิลลิกรัมสมมูลโทรลอกซ์ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง รองลงมาคือ คลอโรฟอร์ม และเมทานอล มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 310 และ 224 มิลลิกรัมสมมูลโทรลอกซ์ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ

Ali *et al.* (2018) ศึกษาสารสกัดจากเหง้าของ *K. galanga* ที่เจริญเติบโตในธรรมชาติ โดยนำเหง้าที่แห้งและบดเรียบร้อยแล้วปริมาณ 200 ก. มาสกัดด้วยเมทานอล ปริมาตร 500 มล. ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำสารสกัดที่ได้กรองด้วยกระดาษกรองแล้วนำไปแยกตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบหมุน เมื่อนำสารสกัดจากเหง้า *K. galanga* ที่ได้มาหาปริมาณฟีนอกลิกทั้งหมดและฟลาโวนอยด์ทั้งหมด โดยปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐาน เปรียบเทียบกับสมการ y = 0.117x + 0.051 และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ($r^2$) เท่ากับ 0.998 และการหาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดใช้คาเทชินเป็นสารมาตรฐาน เปรียบเทียบกับสมการ y = 0.005x + 0.047 และมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ($r^2$) เท่ากับ 0.998 พบว่า ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและ

ฟลาโวนอยด์ทั้งหมดที่พบในสารสกัดจากเหง้าของ *K. galanga* เท่ากับ 15.40 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และ 37.72 มิลลิกรัมสมมูลคาเทชินต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ เมื่อนำสารสกัดจากเหง้า *K. galanga* ไปทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ตามวิธีการของ Choi *et al.* (2000) โดยมีการปรับค่าการดูดกลืนแสงเป็น 734 นาโมเมตร โดยใช้คาเทชินเป็นสารมาตรฐาน ที่ความเข้มข้น 2.67, 4.53 และ 3.18 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดจากเหง้ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยมีค่า $IC_{50}$ เท่ากับ 16.58 มิลลิกรัมสมมูลคาเทชินต่อกรัมน้ำหนักแห้ง

Rahman *et al.* (2018) ศึกษาสารสกัดจากเหง้าของ *K. parviflora* ที่ย้ายต้นอ่อนในหลอดทดลองออกปลูกในเรือนเพาะชำ เป็นเวลา 4, 6, 8, 10 และ 12 เดือน โดยการนำเหง้าของ *K. parviflora* มาล้างน้ำให้สะอาด แล้วนำไปอบในเครื่องอบลมร้อน (hot air oven) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างเหง้าที่แห้ง ปริมาณ 2 ก. ไปสกัดด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 50 มล. ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (shaking water bath) ที่อุณหภูมิ 60, 75 และ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 นาที จากนั้นนำสารสกัดที่ได้กรองผ่านกระดาษกรองประเภทไนล่อน แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) เป็นเวลา 15 นาที นำสารสกัดจากเหง้าที่ได้ไปหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ด้วยวิธี Folin–Ciocalteu นำสารสกัดปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติมลงในรีเอเจนต์ 0.2 มล. ที่เจือจางในน้ำกลั่น 5 เท่า ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 3 นาที แล้วเติมโซเดียมคาร์บอเนต ($Na_2CO_3$) ปริมาตร 0.2 มล. ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ แล้วผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้กรดแกลลิก เป็นสารมาตรฐาน จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร พบว่าสารสกัดจากเหง้าของ *K. parviflora* ที่ย้ายปลูกในเรือนเพาะชำเป็นเวลา 8 เดือน มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด 74.30 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งมากกว่าสารสกัดจากเหง้าที่ย้ายปลูกในเรือนเพาะชำเป็นเวลา 4, 6, 10 และ 12 เดือน ที่มีปริมาณฟีนอกลิกทั้งหมดอยู่ระหว่าง 58 ถึง 69 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และเมื่อนำสารสกัดจากเหง้ามาหาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ด้วยวิธี aluminium chloride colorimetric โดยนำสารสกัดจากเหง้าปริมาตร 0.1 มล. ที่ผสมกับอะลูมิเนียมคลอไรด์ปริมาตร 0.1 มล. ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับโพแทสเซียมอะซิเตต ปริมาณ 0.1 มล. แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที และใช้เคอร์ซิติน (quercetin) เป็นสารมาตรฐาน จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร พบว่าสารสกัดจากเหง้าของ *K. parviflora* ที่ย้ายปลูกในเรือนเพาะชำเป็นเวลา 8 เดือน มีปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด 0.85 ไมโครกรัมสมมูลของเคอร์ซิตินต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งมากกว่าสารสกัดจาก

เหง้า *K. parviflora* ที่ย้ายปลูกในเรือนเพาะชำเป็นเวลา 4, 6, 10 และ 12 เดือน ที่มีปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดระหว่าง 0.66 ถึง 0.76 ไมโครกรัมสมมูลของเคอร์ซิตินต่อกรัมน้ำหนักแห้ง

Sani *et al.* (2019) ศึกษาสารสกัดจากเหง้าของ *K. galanga* ที่เจริญเติบโตในธรรมชาติ โดยการนำเหง้าของ *K. galanga* มาตากแห้งแล้วนำไปบดให้ละเอียดจากนั้นนำเหง้าที่บดละเอียดแล้วปริมาณ 130 ก. ไปสกัดด้วยวิธีหมักที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด ปริมาตร 390 มล. ได้แก่ เฮกเซน เอทิลอะซิเตต และเอทานอล เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำสารสกัดที่ได้กรองด้วยกระดาษกรองเพื่อแยกตะกอนของเหง้าออก แล้วนำสารสกัดที่ได้ไปแยกตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบหมุน (rotary evaporator) จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิค DPPH นำตัวอย่างสารสกัด 1 มก./มล. ผสมกับสารละลาย DPPH ปริมาตร 2.40 มก. ที่เจือจางในเมทานอลปริมาตร 100 มล. จากนั้นบ่มไว้ในที่มืดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเตรียมสารละลายตัวอย่างปริมาตร 30 ไมโครลิตร เจือจางกับสารละลายเมทานอล DPPH ปริมาตร 270 ไมโครลิตร นำไปบ่มในที่มืดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายทดสอบที่ได้ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร พบว่าสารสกัดจากเหง้าของ *K. galanga* ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด และมีค่า $IC_{50}$ เท่ากับ 424.44 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือสารสกัดจากเหง้าที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต และเฮกเซน มีค่า $IC_{50}$ เท่ากับ 492.75 และ 831.82 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

Rachkeeree *et al.* (2020) ศึกษาสารสกัดจากเหง้าของ *K.* sp. ที่เจริญเติบโตในธรรมชาติ โดยนำเหง้ามาล้างให้สะอาด แล้วนำไปหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ นำเหง้าที่หั่นแล้วอบด้วยตู้อบลมร้อน (hot air oven) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำเหง้าที่อบแห้งแล้วบดให้ละเอียด จากนั้นนำไปสกัดด้วยวิธีแช่ตัวทำละลายเฮกเซน อัตราส่วน 1:5 W/V เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำสารสกัดที่ได้กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 นำสารสกัดที่กรองแล้วทำการแยกตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยแบบหมุน (rotary evaporator) จากนั้นสารสกัดที่ได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำตะกอนที่ผ่านการกรองมาสกัดซ้ำด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตตและเอทานอล ความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นำสารสกัดที่ได้มาหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu ละลายสารสกัดปริมาณ 1 มก./มล. ด้วยเมทานอล จากนั้นดูดสารสกัดปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงในหลุม 96 well และเติมสารรีเอเจนต์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นบ่มเป็นเวลา 1 นาที แล้วเติมโซเดียมคาร์บอเนต 80 ไมโครลิตร ความเข้มข้น 7.5 เปอร์เซ็นต์ บ่มในที่มืดเป็นระยะเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำสารละลายตัวอย่างที่ได้ไปวัดค่า

การดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร และใช้กรดแกลลิก เป็นสารละลายมาตรฐาน พบว่าสารสกัดจากเหง้าของ *K. rotunda* ที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตตมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 154.28 มิลกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งมีปริมาณมากว่าเหง้าของ *K. rotunda* ที่สกัดด้วยเอทานอลและเฮกเซนซึ่งมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 14.54 และ 4.68 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ

Panyakaew *et al.* (2021) ศึกษาสารสกัดจากเหง้าของ *Kaempferia* 9 ชนิด ได้แก่ *K. angustiflora*, *K. elegans*, *K. galanga*-1, *K. galanga*-2, *K. galanga*-3, *K. marginata*, *K. parviflora*, *K. pulchra* และ *K. rotunda* ที่เจริญเติบโตในธรรมชาติ นำเหง้าของต้นเปราะทั้ง 9 ชนิดที่แห้งและบดละเอียดแล้วมาสกัดด้วยเครื่อง Sonicate โดยใช้เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 นาที เมื่อนำสารสกัดที่ได้มาหาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ด้วยวิธี aluminum chloride colorimetric โดยใช้เคอร์ซิตินเป็นสารมาตรฐาน วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร พบว่าสารสกัดจากต้นเปราะทั้ง 9 ชนิด *K. parviflora* มีปริมาณฟลาโวนอยด์สูงสุด 384.0 มิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซิตินต่อกรัมน้ำหนักแห้ง รองลงมาคือ *K. elegans* มีปริมาณฟลาโวนอยด์ 236.70 มิลลิกรัมสมมูลเคอร์ซิตินต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ในขณะที่สารสกัดจากเหง้าของ *Kaempferia* ชนิดอื่น ๆ มีปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดอยู่ในช่วง 1.69 ถึง 4.24 มิลลิกรัมสมมูลเคอร์ซิตินต่อกรัมน้ำหนักแห้ง เมื่อนำสารสกัดจากเหง้าที่ได้ไปหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP โดยวิธี DPPH นำสารสกัดจากเหง้าของ *Kaempferia* ทั้ง 9 ชนิด ละลายสารสกัดที่ได้ปริมาตร 0.30 มล. กับสารละลาย DPPH 3 มล. จากนั้นบ่มไว้ในที่มืด 30 นาที โดยใช้โทรลอกซ์เป็นสารมาตรฐาน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร พบว่า *K. parviflora* มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดเท่ากับ 91.73 มิลลิกรัมสมมูลโทรลอกซ์ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง รองลงมาคือ *K. rotunda* และ *K. elegans* ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 41.60 และ 30.48 มิลลิกรัมสมมูลโทรลอกซ์ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ เมื่อนำสารสกัดจากเหง้าของ *Kaempferia* ทั้ง 9 ชนิด มาศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP โดยนำตัวอย่างสารสกัดปริมาณ 0.30 มล. ผสมในสารละลาย FRAP ปริมาณ 2.70 มล. นำไปบ่มในที่มืด 10 นาที แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร โดยใช้โทรลอกซ์เป็นสารมาตรฐาน พบว่า *K. parviflora* มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากสุดเท่ากับ 155.41 มิลลิกรัมสมมูลโทรล็อกซ์ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง รองลงมาคือ *K. rotunda* และ *K. elegans* ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 119.60 และ 49.82 มิลลิกรัมสมมูลโทรลอกซ์ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ

Safriani *et al.* (2021) ศึกษาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดเหง้าของ *K. galanga* ที่เจริญเติบโตในธรรมชาติ โดยนำเหง้าที่ถูกทำให้แห้งแล้วปริมาณ 100 ก. นำไปสกัดด้วยเครื่องแยกด้วยการสั่นสะเทือน (ultrasonicator) ในสารละลายเมทานอล ความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปแยกตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสารแบบหมุน อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พบว่าปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดที่พบในเหง้าของ *K. galanga* มีค่าเท่ากับ 0.82 มิลลิกรัมสมมูลเคอร์ซิตินต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดที่พบมีค่าเท่ากับ 1.53 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักแห้ง เมื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay มีค่าเท่ากับ 1.10 มิลลิกรัมสมมูลกรดแอสคอบิกต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ฤทธิ์ต้านอนมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay มีค่า % inhibition เท่ากับ 22.15 เปอร์เซ็นต์

Varghese *et al.* (2021) ศึกษาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากชิ้นส่วนเหง้าของ *K. parviflora* ที่ถูกทำให้แห้งปริมาณ 10 กรัมน้ำหนักแห้ง แล้วนำไปสกัดโดยการต้มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 จากการนำสารสกัดจากเหง้าที่ได้มาหาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดด้วยวิธี aluminum chloride colorimetric โดยใช้เคอร์ซิตินเป็นสารมาตรฐาน มีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด 40.60 มิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซิตินต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และจากการศึกษาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu โดยใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐาน พบว่ามีปริมาณของฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 14.45 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักแห้ง เมื่อนำสารสกัดจากเหง้า*ของ K. parviflora* มาทดสอบฤทธิ์ต้ายอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay โดยการผสมเอทานอล 1 มล. กับสาร DPPH 2.0 มล. ความเข้มข้น 0.1 ไมโครโมล แล้วนำไปไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาวัดค่าการดูกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร พบว่าสารสกัดจากเหง้ามีค่า $IC_{50}$ เท่ากับ 0.438 มก./มล.

Nonglang *et al.* (2022) ศึกษาสารสกัดจากเหง้าของ *K. galanga* ที่เจริญเติบโตในธรรมชาติ โดยการใช้เหง้าที่แห้งและบดแล้ว ปริมาณ 25 ก. มาสกัดด้วยเอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 125 มล. ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24-36 ชั่วโมง นำสารสกัดที่ได้กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 แล้วนำสารสกัดที่ได้ไปทำให้แห้งด้วยการแช่ด้วยวิธีเยือกแข็ง ที่อุณหภูมิ -80 ถึง -120 องศาเซลเซียส แล้วนำสารสกัดที่ได้มาหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ด้วยวิธี Folin–ciocalteu โดยการเติมสารสกัดจากเหง้า *K. galanga* ปริมาณ 1 มล. ความเข้มข้น 0.5 มก./ล. ผสมกับสาร

Folin–ciocalteu เจือจาง 10:1 และโซเดียมคาร์บอเนต 7.5 เปอร์เซ็นต์ และใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐาน จากนั้นนำไปบ่มไว้ในที่มืดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 740 นาโนเมตร พบว่ามีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด เท่ากับ 23.55 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และเมื่อนำสารสกัดจากเหง้าของ *K. galanga* ที่เจริญเติบโตในธรรมชาติ มาหาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ด้วยวิธี aluminium chloride colorimetric โดยการเติมสารสกัดที่ได้ 1 มล. ผสมกับอะลูมิเนียมคลอไรด์ 2% 1 มล. และรูทิน ความเข้มข้น 0.25–1.00 มก./มล. เป็นสารมาตรฐาน จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร พบว่ามีปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด 100.00 มิลลิกรัมสมมูลรูทินต่อกรัมน้ำหนักแห้ง เมื่อนำสารสกัดที่ได้มาศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH โดยการละลายสารสกัดปริมาตร 1 มล. ในเอทานอล 1 มล. ความเข้มข้น 0.004 เปอร์เซ็นต์ และสารละลาย DPPH ปริมาตร 2 มล. จากนั้นบ่มไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที โดยใช้กรดแอสคอร์บิค ความเข้มข้น 0.02 - 0.1 มก./มล. เป็นสารมาตรฐาน จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร พบว่ามี % inhibition เท่ากับ 28.05 เปอร์เซ็นต์ และมีค่า $IC_{50}$ เท่ากับ 0.013 มิลลิกรัมสมมูลกรดแอสคอร์บิคต่อกรัมน้ำหนักแห้ง

Nonthalee *et al.* (2023) นำใบและเหง้าของ *K. grandifolia* และ *K. siamensis* ที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง และพืชในหลอดทดลองที่ย้ายออกปลูกในเรือนเพาะชำ และต้นพืชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ นำใบและเหง้าของ *K. grandifolia* และ *K. siamensis* ที่ได้จาก 3 แหล่ง ไปสกัดด้วยเครื่อง Soxhlet ใช้เอทานอลความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์เป็นตัวทำละลาย นำสารสกัดที่ได้ไปหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี folin-ciocalteu colorimetric method โดยใช้กรดแกลลิก พบว่าสารสกัดจากชิ้นส่วนของ *K. grandifolia* มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดระหว่าง 70.42 - 177.65 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่ได้จากชิ้นส่วนพืชในสภาพธรรมชาติ ที่ย้ายออกปลูกในเรือนเพาะชำ และในหลอดทดลอง มีค่าตั้งแต่ 164.38 - 170.24, 169.84 - 177.65 และ 70.42 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่พบในสารสกัดที่ได้จากชิ้นส่วนของ *K. siamensis* อยู่ระหว่าง 100.42 - 233.51 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่พบในชิ้นส่วนที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ การย้ายออกปลูกในเรือนเพาะชำ และการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง อยู่ในช่วง 183.00–233.51, 180.07–187.59 และ 100.42 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ และพบว่าชิ้นส่วนใบที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ พบสารประกอบ

ฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุดเท่ากับ 233.51 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และผลวิจัยยังพบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่พบในชิ้นส่วนพืชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติมีมากกว่าชิ้นส่วนพืชที่ย้ายปลูกในเรือนเพาะชำ เมื่อนำตัวอย่างสารสกัดที่ได้ไปหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด พบว่า *K. grandifolia* ที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกอยู่ระหว่าง 70.42 - 177.65 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ต้นพืชที่ย้ายออกปลูกในเรือนเพาะชำ และพืชที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองมีปริมาณสารฟีนอลิกตั้งแต่ 164.38 - 170.24, 177.65 และ 70.42 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ และ *K. siamensis* ที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด 100.42 - 233.51 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักแห้ง *K. siamensis* ที่ย้ายปลูกในเรือนเพาะชำ และต้นพืชที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง พบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกตั้งแต่ 183.00 - 233.51, 180.07 - 187.59 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ จากการวิเคราะห์สารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด พบว่าชิ้นส่วนของ *K. grandifolia* มีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ตั้งแต่ 22.91 - 70.24 มิลลิกรัมสมมูลเคอร์ซิตินต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ชิ้นส่วนพืชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ ต้นพืชย้ายออกปลูกในเรือนเพาะชำ และพืชที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง มีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ 22.91 - 70.24, 24.88 - 61.73 และ 55.66 มิลลิกรัมสมมูลเคอร์ซิตินต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดที่พบใน *K. siamensis* มีค่าตั้งแต่ 41.28 - 137.35 มิลลิกรัมสมมูลเคอร์ซิตินต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ชิ้นส่วน *K. siamensis* ที่เจริญในสภาพธรรมชาติ ที่ย้ายออกปลูกในเรือนเพาะชำ และชิ้นส่วนพืชที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง มีประมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ตั้งแต่ 41.28 - 137.35, 73.20 - 109.22 และ 65.52 มิลลิกรัมสมมูลเคอร์ซิตินต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ และพบว่าชิ้นส่วนใบที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติมีปริมาณมากที่สุด 137.35 มิลลิกรัมสมมูลต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งมากกว่าชิ้นส่วนพืชที่เพาะเลี้ยงนในหลอดทดลอง และย้ายออกปลูกในเรือนเพาะชำ

**2. งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์สารสำคัญของพืชวงศ์ขิงด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)**

Sripanidkulchai *et al.* (2019) ศึกษาสารสกัดในเหง้าของ *K. parviflora* โดยสกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยการหมัก จากนั้นนำสารสกัดที่แยกตัวทำละลายออกแล้วมาบรรจุลงในแคปซูล ขนาด 90 มก. เปรียบเทียบกับสารสกัดชนิดอื่น ๆ และแคปซูลที่ไม่ได้บรรจุสารสกัด แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) เพื่อตรวจสอบความถูกต้อง

และตรวจสอบคุณภาพของสารสกัด เทียบกับสารมาตรฐาน 2 ชนิดคือ PMF (3,5,7,30,40-pentamethoxyflavone) และ TMF (5,7,40-trimethoxyflavone) พบว่าแคปซูลที่มีสารสกัดจากเหง้าของ *K. parviflora* มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ($r^2$) PMF และ TMF เท่ากับ 0.98 และมีค่า limit of detection (LOD) และ limit of quantitation (LOQ) ของ TMF เท่ากับ 0.002 และ 0.005 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และค่า Limit of detection (LOD) และ limit of quantitation (LOQ) ของ PMF เท่ากับ 0.003 และ 0.007 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ และมีค่า relative standard deviations (%RSD) ระหว่าง 0.1-1.6 เปอร์เซ็นต์ การทดสอบ fortified sample ของ PMF และ TMF ในแคปซูลสารสกัด ที่ระดับความเข้มข้น 13.43 และ 10.41 มิลลิกรัมต่อแคปซูล ตามลำดับ พบว่ามีค่า recovery อยู่ในช่วง 95.6-98.3 เปอร์เซ็นต์ และ 96.5-100.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Suradej *et al*. (2019) ศึกษาสารสกัดจากใบและเหง้าของ *K. parviflora* ที่เจริญเติบโตในธรรมชาติ มาหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วสับละเอียด จากนั้นนำไปสกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 76 ชั่วโมง จากนั้นกรองเอทานอลออก แล้วนำไประเหยด้วยเครื่องระเหยแบบหมุน แล้วนำสารสกัดที่ได้ ผสมในเอทานอล 1 มล. นำไปละลายในสารละลาย DMSO 100 เปอร์เซ็นต์ เพื่อทำเป็นสต็อคสารละลายปริมาตร 1 ก/มล. เมื่อนำสารสกัดที่ได้มาวิเคราะห์สารพฤกษเคมีด้วยเทคนิค HPLC โดยการเปรียบเทียบกับสารประกอบมาตรฐานทั้งหมด 9 ชนิด ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดจากใบและเหง้าของ *K. parviflora* มี methoxyflavones เป็นสารประกอบหลัก ได้แก่ 3,5,7,30,40-pentamethoxyflavone,5,7,40-trimethoxyflavone, 3,5,7 trimethoxyflavone, 3,5,7,40 tetramethoxyflavone, 5-hydroxy3,7,30,40-tetramethoxyflavone, 5-hydroxy-7-methoxyflavone, 5-hydroxy-7,40-dimethoxyflavone, 5-hydroxy-3,7-dimethoxyflavone และ 5-hydroxy-3,7,40-trimethoxyflavone

Mekjaruskul *et al.* (2020) ศึกษาสารสกัดจากเหง้าของ *K. parviflora* ที่เจริญเติบโตในธรรมชาติ โดยนำเหง้าของ *K. parviflora* มาอบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ด้วยตู้อบลมร้อน (hot air oven) นำเหง้าที่แห้งแล้วมาบดให้ละเอียด แล้วนำไปแช่ในเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 วัน แล้วนำสารสกัดที่ได้ไปกรอง แล้วนำไปแยกตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบหมุน จากนั้นนำไปทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง มีร้อยละผลผลิต (%yield) เท่ากับ 57 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำสารสกัดจากเหง้าที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานคือvmethoxyflavones

3 ชนิด คือ DMF (5,7-dimethoxyflavone), TMF (5,7,4′trimethoxyflavone) และ PMF (3,5,7,3′,4 pentamethoxyflavone) พบว่า PMF, DMF และ TMF ที่ค่า RT ของสารสกัดจากเหง้า *K. parviflora* อยู่ที่ 32.40, 35.50 และ 37.00 นาที ตามลำดับ และมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของสาร methoxyflavones เท่ากับ 0.996 ซึ่งสามารถคำนวนปริมาณของสารสกัดจากเหง้าของ *K. parviflora* เท่ากับ 46.90, 48.00 และ 9.80 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ของ PMF, TMF และ DMF ตามลำดับ

**3. การวิเคราะห์สารสำคัญของพืชสกุลเปราะด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี - แมสสเปกโทรเมทรี**

Sereena *et al.* (2011) ศึกษาปริมาณน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าสดในธรรมชาติของ *Kaempferia rotunda* ด้วยเทคนิค GC-MS พบสารประกอบทั้งหมด 13 ชนิด โดยพบ bornyl acetate มากที่สุด 30.12 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือสาร benzyl benzoate พบ 16.60 เปอร์เซ็นต์

Sahoo *et al.* (2014) ศึกษาน้ำมันหอมระเหยจากเหง้า *K. galanga* ที่ปลูกในสภาพธรรมชาติและที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองที่ย้ายออกปลูกในเรือนเพาะชำเป็นเวลา 16 สัปดาห์ ด้วยเทคนิค GC-MS พบสารประกอบหลัก ethyl p-methoxy cinnamate มีเปอร์เซ็นต์พื้นที่ใต้กราฟเท่ากับ 82.01 และ 71.77 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ พบสารประกอบทั้งหมด 6 ชนิด โดยสารประกอบที่พบในเหง้าจากสภาพธรรมชาติมีปริมาณสารมากกว่าในหลอดทดลองที่ย้ายออกปลูก มี 2 ชนิด คือ 3-carene และ ethyl p-methoxy cinnamate และพบสาร 4 ชนิด คือ eucalyptol, ethyl cinnamate, borneol และ pentadecane จากเหง้าในหลอดทดลองที่ย้ายออกปลูกพบมากกว่าที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าน้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากเหง้า *K. galanga* ที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติมีปริมาณมากกว่าในหลอดทดลองที่ย้ายออกปลูกอย่างมีนัยสำคัญ แต่อย่างไรก็ตามสารประกอบน้ำมันหอมระเหยที่พบในเหง้าจากสภาพธรรมชาติและในหลอดทดลองที่ย้ายออกปลูกมีความคล้ายคลึงกัน และผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าการเพาะเลี้ยง *K. galanga* ในหลอดทดลองสามารถช่วยในการเพิ่มผลผลิตน้ำมันหอมระเหยได้อย่างมีประสิทธิภาพและลดปริมาณการใช้พืชในธรรมชาติจำนวนมาก

Senarath *et al.* (2017) วิเคราะห์องค์ประกอบทางพฤกษเคมีด้วยเทคนิค GC-MS จากชิ้นส่วนเหง้าของ *K. galanga* เปรียบเทียบระหว่างในธรรมชาติกับในหลอดทดลอง พบสารประกอบทั้งหมด 9 ชนิด และปริมาณที่พบมีความใกล้เคียงกันยกเว้น borneol ที่มีความแตกต่างกันโดยในธรรมชาติมีปริมาณ 95 เปอร์เซ็นต์ และในหลอดทดลองมีปริมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ สารประกอบที่พบ

ในชิ้นส่วนเหง้าของ *K. galanga* จากสภาพธรรมชาติ มี 3 ชนิด คือ 3-carene, borneol และ heptadecenal และสารประกอบที่พบมากจากชิ้นส่วนเหง้าของ *K. galanga* ที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง มี 1 ชนิด คือ eucalyptol เนื่องจากองค์ประกอบทางพฤกษเคมีที่พบใน *K. galanga* ที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองมีความคล้ายกันกับในสภาพธรรมชาติ และองค์ประกอบทางพฤกษเคมีบางชนิดใน *K. galanga* ที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองพบมีปริมาณมากกว่าในสภาพธรรมชาติ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณขององค์ประกอบทางพฤกษเคมีได้เป็นอย่างดี

Suphrom *et al.* (2017) วิเคราะห์องค์ประกอบน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าของ *K. rotunda* โดยใช้เฮกเซน เมทิลีนคลอไรด์ และเอทานอล ด้วยเทคนิค GC-MS พบว่ามีน้ำมันหอมระเหยทั้งหมด 31 ชนิด โดยกลุ่มสารระเหยที่พบคือ monoterpenes, sesquiterpenes, diterpenes, hydrocarbons, ester of fatty acids, benzyl derivatives และ cyclohexane ส่วนใหญ่จะพบในสารที่สกัดด้วยเฮกเซนมากกว่าในตัวละลายอื่น ๆ

Ali *et al.* (2018) ศึกษาสารสกัดจากเหง้าของ *K. galanga* ที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติโดยเมทานอล วิเคราะห์สารสกัดด้วยเทคนิค GC-MS พบสารประกอบทั้งหมด 8 ชนิด ดังนี้ palmitic acid 35.17 เปอร์เซ็นต์, oleic acid 22.15 เปอร์เซ็นต์, 2-propenoic acid 10.18 เปอร์เซ็นต์, octadecanoic acid 10.10 เปอร์เซ็นต์, sandaracopimaradiene 8.20 เปอร์เซ็นต์, glycidyl stearate 7.27 เปอร์เซ็นต์, 2-[2-(4-nonylphenoxy) ethoxyethanol 3.57 เปอร์เซ็นต์ และ phthalic acid 3.37 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Srivastava *et al.* (2019) ศึกษาสารสกัดจากเหง้าของ *K. galanga* ที่เจริญเติบโตในธรรมชาติ โดยการนำเหง้ามาล้างด้วยน้ำสะอาดและตากแห้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำเหง้าที่แห้งแล้วไปสกัดด้วยเครื่องกลั่นน้ำมันหอมระเหยด้วยน้ำ ที่อุณหภูมิ 100 ถึง 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นสารสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS พบสารประกอบทั้งหมด 54 ชนิด รวมทั้งหมด 92.77 เปอร์เซ็นต์ โดยสารประกอบที่พบมากที่สุดคือ *trans* ethyl-p-methoxycinnamate 52.54 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ *trans*-ethyl cinnamate 24.98 เปอร์เซ็นต์ 1,8-cineole 4.14 เปอร์เซ็นต์ 3-carene 3.94 เปอร์เซ็นต์ dihydroterpineol 1.84 เปอร์เซ็นต์ α-terpineol 1.64 เปอร์เซ็นต์ และ camphene 1.02 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Devi *et al.* (2019) ศึกษาสารสกัดเหง้าของ *K. galanga* ในสภาพธรรมชาติ ที่ปลูกเป็นเวลา 32 สัปดาห์ ด้วยเทคนิค GC-MS พบว่า มีสารประกอบทั้งหมด 27 ชนิด โดยสารประกอบที่พบมากที่สุดคือ eucalyptol 20.94 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ ethyl p-methoxycinnamate 16.44

เปอร์เซ็นต์ pentadecane 15.63 เปอร์เซ็นต์ à-pinene 12.76 เปอร์เซ็นต์ และ camphene 10.82 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Tuan *et al.* (2019) ศึกษาสารสกัดจากเหง้า *K. daklakensis* ที่เจริญเติบโตในธรรมชาติ ด้วยเทคนิค GC-MS พบว่ามีสารประกอบทั้งหมด 45 ชนิด โดยสารประกอบที่พบมากที่สุดคือ Camphene 23.63 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ Isoborneol 5.77 เปอร์เซ็นต์ และ Borneol 4.80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Begum *et al.* (2022) ศึกษาสารสกัดจากเหง้าของ *K. parviflora* ที่ปลูกในร่ม เปรียบเทียบกับต้นพืชที่ปลูกในแสงแดด เป็นเวลา 1 ปี ด้วยเทคนิค GC-MS พบว่าต้นพืชที่ปลูกในที่มีแสงพบสารประกอบทั้งหมด 31 ชนิด โดยสารประกอบที่พบมากที่สุดคือ Linalool พบ 26.89 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ endo-Borneol 19.60 เปอร์เซ็นต์ และ camphene 16.13 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งมากกว่า *K. parviflora* ที่ปลูกภายในร่ม ที่พบสารประกอบทั้งหมด 30 ชนิด โดยสารประกอบที่พบมากที่สุดคือ linalool 43.35 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ endo-Borneol 22.73 เปอร์เซ็นต์ และ lamphene 13.43 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Nonglang *et al.* (2022) ศึกษาสารสกัดจากเหง้าของ *K. galanga* ที่เจริญเติบโตในธรรมชาติ โดยใช้เหง้าที่แห้งและบดแล้ว ปริมาณ 25 ก. มาสกัดด้วยเอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 125 มล. ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24-36 ชั่วโมง นำสารสกัดที่ได้กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 แล้วนำสารสกัดที่ได้ไปทำให้แห้งด้วยการแช่ด้วยวิธีเยือกแข็ง ที่อุณหภูมิ -80 ถึง -120 องศาเซลเซียส และนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS พบว่ามีสารประกอบทั้งหมด 8 ชนิด โดยสารประกอบที่พบมากที่สุดคือ ethyl p-methoxycinnamate พบ 94.87 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ 3-methyl-2-(2-oxopropyl) furan พบ 3.34 เปอร์เซ็นต์ และ dodecane พบ 0.92 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Singh *et al.* (2022) ศึกษาสารสกัดจากเหง้าของ *K. galanga* ที่เจริญเติบโตในธรรมชาติที่แตกต่างกัน 3 จังหวัดในประเทศอินเดีย รวมทั้งหมด 36 ตัวอย่าง (*K. galanga* ตัวอย่างที่ 1-36) ตัวอย่างเหง้า โดยนำเหง้าที่ตากแห้งแล้วปริมาณ 100 ก. มาสกัดน้ำมันหอมระเหยด้วยน้ำ เป็นเวลา 3 - 4 ชั่วโมง และขจัดน้ำออกจากน้ำมันหอมระเหยโดยใช้แอนไฮดรัสโซเดียมซัลเฟตจากนั้นนำน้ำมันหอมระเหยที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS พบสารประกอบทั้งหมด 65 ชนิด คิดเป็น 76.16 - 97.3 เปอร์เซ็นต์ สารประกอบหลักที่พบมากที่สุดคือ ethyl-p-methoxy cinnamate 41.13 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ ethyl cinnamate 29.70 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวอย่างพืชที่เก็บมาจากจังหวัด Odisha

Song *et al.* (2021) ศึกษาสารสกัดจากเหง้าของ *K. galanga* ที่สกัดด้วยเอทานอล และนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS พบว่ามีสารประกอบทั้งหมด 9 ชนิด โดยสารประกอบที่พบมาก

ที่สุดคือ acetic acid 28.97 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ benzoic acid, 4-(dimethoxymethyl) -, methyl ester พบ 24.86 เปอร์เซ็นต์ และ 1,3,5-Trioxane พบ 20.75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Nonthalee *et al*. (2023) นำใบและเหง้าของ *K. grandifolia* และ *K. siamensis* ที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง และพืชในหลอดทดลองที่ย้ายออกปลูกในเรือนเพาะชำ และต้นพืชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ ใบและเหง้าของ *K. grandifolia* และ *K. siamensis* ที่ได้จากการ 3 แหล่ง นำไปอบแห้งด้วยตู้อบความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำชิ้นส่วนพืชที่อบแห้งแล้วบดให้ละเอียด นำชิ้นส่วนพืชที่บดละเอียดแล้วปริมาณ 5 ก. ไปสกัดด้วยเครื่อง Soxhlet ใช้เอทานอลความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์เป็นตัวทำละลาย เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง นำสารสกัดที่ได้มาทำการระเหยตัวทำละลาย แล้วนำไปเก็บไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เมื่อนำสารสกัดไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS สารสกัดจากใบที่สกัดด้วยเอทานอลของ *K. grandifolia* สามารถระบุสารประกอบได้ทั้งหมด 38 ชนิด ชิ้นส่วนใบที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ พบสารประกอบทั้งหมด 12 ชนิด ชิ้นส่วนใบที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองพบสารประกอบทั้งหมด 7 ชนิด และชิ้นส่วนใบที่ย้ายออกปลูกในเรือนเพาะชำพบสารประกอบทั้งหมด 5 ชนิด สารสกัดจากชิ้นส่วนเหง้าที่สกัดด้วยเอทานอลของ *K. siamensis* สามารถระบุสารประกอบได้ทั้งหมด 19 ชนิด ชิ้นส่วนใบของ *K. siamensis* ที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ พบสารประกอบ 5 ชนิด ชิ้นส่วนใบที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองพบสาร 5 ชนิด และชิ้นส่วนใบที่ย้ายออกปลูกในเรือนเพาะชำพบสาร 5 ชนิด และชิ้นส่วนเหง้าของ *K. siamensis* ที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ และชิ้นส่วนเหง้าที่ย้ายออกปลูกในเรือนเพาะชำพบสารประกอบทั้งหมด 10 ชนิด เท่ากัน

พหุน ปณฺฑิโต ชีเว

# บทที่ 3
# อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

## 3.1 พืชที่ใช้ทำการทดลอง

เก็บตัวอย่างต้นเปราะโคราชในป่าธรรมชาติ เดือนมิถุนายน พ.ศ. 2560 ที่อำเภอวังน้ำเขียว จังหวัดนครราชสีมา (ภาพ 2)

**ภาพที่ 2** ต้นเปราะโคราช (*K. koratensis*)

## 3.2 วัสดุและอุปกรณ์

1. เครื่องแก้ว ได้แก่ บีกเกอร์ (beaker) ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาด 4 ออนซ์ ขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask) ปิเปต (pipet) กระบอกตวง (cylender) จานเพาะเชื้อ (petridish)
2. ปากคีบ (forceps)
3. มีดผ่าตัด (surgcon knife)
4. ตะแกรงโลหะ (metal sceen)
5. เครื่องชั่ง (balance)
6. ช้อนตักสารเคมี (spatula)
7. เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter)
8. เตาอบความร้อน (hot air over)
9. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave)
10. เตาอุ่นความร้อนและเครื่องคน (hot plate and magnetic stirrer)
11. ตู้ปลอดเชื้อ (laminar airflow cabinet)
12. ตู้เย็น (refrigerator)
13. อลูมิเนียมฟลอยล์ (aluminium foil)

14. แท่งแม่เหล็ก (magnet)

15. ไม้ขีดไฟ (matches)

16. ผ้าสะอาด (cloth sterilized)

17. ตะเกียงแอลกอฮอล์ (turnel)

18. กระดาษที่นึ่งฆ่าเชื้อ (paper sterilized)

19. ชั้นวางเนื้อเยื่อ

20. เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมทรี (Gas Chromatography-Mass Spectrometry, GC-MS)

21. หลอดยูวี (UV lamp)

22. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-vis spectrophotometer)

23. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (shaking incubator)

24. เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) ยี่ห้อ GL, Sciences Inc., Tokyo, Japan

25. เครื่องไมโครเพลท รีดเดอร์ (microplate reader)

26. เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (centrifuge)

27. เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (rotary evaporator)

28. หลอดฉีดยา (syringe)

29. เยื่อกรองสารละลายสำหรับหลอดฉีดยา (syringe filter) ขนาด 0.45 ไมโครเมตร

30. ชุดกรองสุญญากาศ (filtration assembly)

31. กระดาษกรอง (filter papers) whatman เบอร์ 4

32. ขวดแก้วใส่สารตัวอย่างบรรจุสารสำหรับเครื่อง HPLC

33. ขวดวัดปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 5 และ 1,000 มิลลิลิตร

34. ไมโครปิเปตทิป (micropipette tip)

35. หลอดไมโครเซนตริฟิวก์ (microcentrifuge tube)

36. เครื่องเขย่าสาร (vortex mixer)

37. เยื่อกรองสารละลายชนิดเมมเบรนไนลอน (nylon membrane filter) ขนาด 0.2 ไมโครเมตร

38. ขวดระเหยสาร (evapparating flask)

39. ขวดวัดปริมาตร (volumetic flask)

40. คิวเวทท์ (cuvette)

41. เครื่องล้างอุลตร้าโซนิค (sonicator bath)

42. แท่งแก้ว (stirring rod)

43. เครื่องปั่นไฟฟ้า (electric blender)

44. พาราฟิล์ม (parafilm)

45. โกร่งบดสาร (mortar and pestle)

46. ขวดดูแรน (duran bottle) ขนาด 1,000 มิลลิลิตร

47. ถุงดำสำหรับปลูกต้นไม้

48. พลาสติกใส

**สารเคมี (chemicals)**

1. อาหารสังเคราะห์สูตร MS (ภาคผนวก)

2. แอลกอฮอล์ (alcohol) 70%

3. 1 N NaOH

4. 1 N HCl

5. Naphthaleneacetic acid (NAA)

6. Benzyladenine (BA)

7. 6-Furfurylamino purine (Kinetin)

8. Thidiazuron (TDZ)

9. โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (sodium hypochlorite, clorox)

10. น้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ (sterilize distilled water)

11. สารลดแรงตึงผิว (Tween 20)

12. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide, NaOH) ความเข้มข้น 1 นอร์มอล

13. สารละลายกรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid, HCl) ความเข้มข้น 1 นอร์มอล

14. สารละลาย FRAP reagent

15. สารละลายกรดแกลลิก (gallic acid)

16. สารละลาย 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH)

17. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 1 โมล.าร์

18. สารละลายโซเดียมไนไตรท์ (sodium nitrite, $NaNO_2$) ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์

19. สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate, $Na_2CO_3$) ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์

20. สารละลาย Folin-Ciocalteu’s reagent

21. สารละลายโทรลอกซ์ (trolox)

22. สารละลายอะซิโตไนไตรล์ (acetonitrile) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์
23. สารละลายกรดแอซิติก (acetic acid) ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์
24. สารละลายมาตรฐานรูทิน (rutin)
25. สารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสซัลเฟต (ferrous sulphate, $FeSO_4$)
26. น้ำ DI (deionized water, DI water)
27. วุ้น (agar)
28. กรดวานิลลิก (vanillic acid)
29. กรดคาเฟอิก (caffeic acid)
30. กรดคูมาริก (p-coumaric acid)
31. กรดเฟอรูลิก (ferulic acid)
32. กรดไซรินจิก (syringic acid)
33. กรดซินนามิก (cinnamic acid)
34. เคอร์ซิติน (quercetin)
35. แคมพ์เฟอรอล (kaempferol)
36. คาเทชิน (catecin)

**3.3 วิธีดำเนินการวิจัย**

**3.3.1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเปราะโคราช**

อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเปราะโคราชคือ อาหารสูตร Murashige and Skoog (MS) ซึ่งประกอบไปด้วยธาตุอาหารหลัก ธาตุอาหารรอง เหล็ก และวิตามิน ที่เติมฮอร์โมนในกลุ่มออกซินและไซโทไคนิน ที่ระดับความแตกต่างกัน เติมน้ำตาลซูโครส 30 ก./ล. ปรับปริมาตร นำไปปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.7-5.8 ด้วย NaOH 1 N หรือ HCl 1 N จากนั้นเติมวุ้น 7 ก./ล. ต้มวุ้นให้ละลาย เทใส่ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้วุ้นแข็งตัวแล้วนำไปทำการทดลอง

**3.3.2 การเตรียมตัวอย่างพืชเพื่อทำการทดลอง**

**3.3.2.1 การฟอกฆ่าเชื้อและการเพิ่มจำนวนพืช**

นำผลของเปราะโคราชที่เจริญเติบโตเต็มที่ขนาด 2 ซม. มาทำการฟอกฆ่าเชื้อ โดยนำผลมาล้างด้วยน้ำประปาให้สะอาด นำมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยด้วย 5% sodium hypochlorite ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ (aseptic technique) ภายในตู้ปลอดเชื้อ เป็นเวลา 15 นาที และ 10 นาที ตามลำดับ แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ใช้มีดผ่าตัดผ่าผนังผลตามแนวยาว นำเมล็ดที่อยู่ภายในผลมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน BA ความเข้มข้น 2 มก./ล. ร่วมกับ NAA

ความเข้มข้น 0.5 มก./ล. เพื่อชักนำให้เกิดยอดและราก เมื่อพืชเจริญเติบโตเต็มที่ความสูงประมาณ 5 ซม. ย้ายต้นพืชไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมเพื่อเพิ่มจำนวนต้นเปราะโคราช เมื่อได้ต้นพืชจำนวนมากจึงย้ายต้นเปราะโคราชไปในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมนเพื่อทำการปรับสภาพเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ จึงนำไปทำการทดลอง

**3.3.3 ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเปราะโคราช**

**การทดลองที่ 1 ศึกษาผลของฮอร์โมน BA, BA ร่วมกับ NAA และ BA ร่วมกับ TDZ ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดและรากเปราะโคราชเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง**

นำชิ้นส่วนยอดขนาดประมาณ 1 ซม. ที่ปลอดเชื้อในหลอดทดลองมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติมฮอร์โมน BA ที่ระดับความเข้มข้น 1, 2 และ 4 มก./ล. เพียงชนิดเดียว หรือฮอร์โมน BA ร่วมกับ NAA หรือ TDZ ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน ทำการทดลอง 10 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ขวด โดย 1 ขวด เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอด 1 ชิ้น เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ภายในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชม./วัน ด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ บันทึกการเจริญเติบโต จำนวนยอดเฉลี่ย ความยาวยอดเฉลี่ย จำนวนรากเฉลี่ย และความยาวรากเฉลี่ย

**การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของฮอร์โมน BA ร่วมกับ Kinetin และ NAA ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดและรากเปราะโคราชเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง**

นำชิ้นส่วนยอดขนาดประมาณ 1 ซม. ที่ปลอดเชื้อในหลอดทดลองมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติมฮอร์โมน BA ที่ระดับความเข้มข้น 1, 2, 3 และ 4 มก./ล. ร่วมกับ Kinetin 2 และ 4 มก./ล. และ NAA 0.1 และ 0.2 มก./ล. ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน ทำการทดลอง 10 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ขวด โดย 1 ขวด เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอด 1 ชิ้น เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ สภาวะเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 บันทึกการเจริญเติบโต จำนวนยอดเฉลี่ย ความยาวยอดเฉลี่ย จำนวนรากเฉลี่ย และความยาวรากเฉลี่ย

**การทดลองที่ 3 ศึกษาผลร่วมระหว่างออกซินและไซโทไคนิน ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดเปราะโคราชเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว**

นำชิ้นส่วนยอดขนาดประมาณ 1 ซม. มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติมฮอร์โมน BA ร่วมกับ NAA หรือ TDZ, Kinetin ร่วมกับ NAA หรือ TDZ ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน เนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว เพาะเลี้ยงโดยใช้ขวดรูปชมพู่ โดย 1 ขวดเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอด 3 ชิ้น เพาะเลี้ยง 5 ซ้ำ นำเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวไปวางบนเครื่องเขย่า (shaker) เขย่าด้วยความเร็ว 120 รอบต่อนาที เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ บันทึกการเจริญเติบโต จำนวนยอดเฉลี่ย คามยาวยอดเฉลี่ย จำนวนรากเฉลี่ย และความยาวรากเฉลี่ย

**การทดลองที่ 4 การย้ายเปราะโคราชออกปลูกในเรือนเพาะชำ**

นำต้นเปราะโคราชที่เจริญเต็มที่ในหลอดทดลองขนาดประมาณ 7 ซม. ที่มีต้นใบและรากสมบูรณ์แข็งแรงทำการย้ายไปเพาะเลี้ยงในอาหารใหม่สูตร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมนเพื่อปรับสภาพพืชเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จากนั้นนำต้นพืชที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองมาปรับสภาพภายนอกห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ไม่มีการควบคุมปัจจัยภายนอกเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ นำพืชที่ปรับสภาพแล้วย้ายออกปลูกในเรือนเพาะชำโดยพืชหนึ่งต้นปลูกในกระถางดำที่มีวัสดุปลูกเพียง 1 ต้น โดยมีการควบคุมความชื้นและแสงให้กับต้นพืช ปลูกเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ในวัสดุปลูก ได้แก่ ดินร่วน ดินทราย และดินร่วนผสมดินทราย (อัตราส่วน 1:1) รดน้ำวันละ 1 ครั้ง ครั้งละ 100 มล. เวลาเช้า (9.00-10.00 น.) บันทึกการเจริญเติบโต ร้อยละของการรอดชีวิต จำนวนยอดเฉลี่ย ความยาวยอดเฉลี่ย จำนวนใบเฉลี่ย ความกว้างใบเฉลี่ย ความยาวใบเฉลี่ย จำนวนรากเฉลี่ย ความยาวรากเฉลี่ย จำนวนรากสะสมอาหารเฉลี่ย และความยาวรากสะสมอาหารเฉลี่ย

**การทดลองที่ 5 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ**

5.1 การเตรียมตัวอย่างพืช

5.1.1 ตัวอย่างพืชในหลอดทดลอง

นำใบเปราะโคราช อายุ 8 สัปดาห์ ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ไม่เติมฮอร์โมน นำใบและเหง้าของเปราะโคราชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ นำมาล้างน้ำให้สะอาด จากนั้นทำไปผึ่งแดดให้แห้ง เมื่อตัวอย่างพืชแห้งแล้วนำไปอบในตู้อบความร้อน (hot air oven) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อตัวอย่างพืชแห้งสนิทแล้ว นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นให้ละเอียด บรรจุตัวอย่างพืชที่ปั่นละเอียดแล้วใส่ถุงซิปล็อค แล้วนำไปเก็บรักษาในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปทำการทดลอง

5.2 ขั้นตอนการสกัด

1) นำใบเปราะโคราช ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ไม่เติมฮอร์โมน ใบและเหง้าของเปราะโคราชที่เจริญเติบโตในธรรมชาติ ที่บดละเอียดเป็นผง นำไปชั่งด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง ตัวอย่างละ 0.20 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ เติมเมทานอล ความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร

2) นำไปบ่มด้วยเครื่องเขย่าสารแบบควบคุมอุณหภูมิ (shaking incubator) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 ชั่วโมง

3) นำตัวอย่างออกจากเครื่องเขย่าสารแบบควบคุมอุณหภูมิ จากนั้นนำไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 มิลลิลิตร

4) นำสารสกัดที่กรองแล้วเทใส่ขวดสีชา ปิดฝาให้สนิทแล้วนำขวดสารสกัดไปเก็บไว้ที่ตู้อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เพื่อทำการทดลอง

5.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content, TPC)

1) ปิเปตสารสกัดจากเปราะโคราชที่เจริญเติบโตในธรรมชาติ และในหลอดทดลอง ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และเติม Folin-Ciocalteus reagent ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงใน 96-well plates

2) นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที และตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 4 นาที

3) เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ($Na_2CO_3$) ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 75 ไมโครลิตร

4) เขย่าด้วยเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที

5) ห่อด้วยอลูมิเนียมฟลอยล์ และบ่มในที่มืดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

6) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยใช้น้ำ DI เป็นแบลงค์ และใช้กรดแกลลิก (gallic acid) เป็นสารมาตรฐาน ที่ความเข้มข้น 1.95, 3.90, 7.81, 15.62, 31.62, 62.20, 125, 500 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามวิธีของ Kubola & Siriamornpun (2011)

5.4 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (Total flavonoids content, TFC)

1) ปิเปตน้ำ DI 100 ไมโครลิตร และสารละลายโซเดียมไนไตร์ท ($NaNO_2$) ความเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และสารสกัดจากเปราะโคราชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ และหลอดทดลอง ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงใน 96-well plates

2) นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 นาที

3) เติมสารละลายอะลูมิเนียมคลอไรด์ ($AlCl_36H_2O$) ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 15 ไมโครลิตร

4) นำไปเขย่าโดยใช้เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 นาที

5) เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และน้ำ DI ปริมาตร 50 ไมโครลิตร

6) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยใช้น้ำ DI เป็นแบลงค์ และใช้รูทิน (rutin) เป็นสารมาตรฐาน ที่ความเข้มข้น 1.95, 3.90, 7.81, 15.62, 31.62, 62.20, 125, 500 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามวิธีของ Jia *et al*. (1999)

5.5 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

5.5.1 วิธี DPPH assay

1) ปิเปตสารสกัดจากเปราะโคราชที่เจริญเติบโตในธรรมชาติ และในหลอดทดลอง ปริมาตร 20 ไมโครลิตร

2) เติมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.15 ปริมาตร 180 ไมโครลิตร ลงใน 96-well plates

3) เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที

4) ห่อด้วยอะลูมิเนียมฟลอยล์ แล้วบ่มไว้ในที่มืดอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที

5) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยใช้เมทานอลเป็นแบลงค์ และใช้โทรลอกซ์ (trolox) เป็นสารมาตรฐาน ความเข้มข้น 1.95, 3.90, 7.81, 15.62, 31.62, 62.20, 125, 500 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามวิธีของ Kubola & Siriamornpun (2011)

5.5.2 วิธี FRAP assay

1) ปิเปตสารละลาย FRAP reagent 180 ไมโครลิตร และปิเปตสารสกัดจากเปราะโคราชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ และในหลอดทดลอง ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงบน 96-well plates

2) เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ เป็นเวลา 60 วินาที

3) ห่อด้วยอลูมิเนียมฟลอยล์ และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4) นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องไมโครเพลท รีดเดอร์ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยใช้น้ำ DI เป็นแบลงค์ และใช้ฟอร์รัสซัลเฟตเป็นสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 1.95, 3.90, 7.81, 15.62, 31.62, 62.20, 125, 500 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามวิธีของ Kubola & Siriamornpun (2011)

5.6 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของสารประกอบฟีนอกลิกและสารประกอบฟลาโวนอยด์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

5.6.1 ขั้นตอนการเตรียมสารสกัด และการสกัด

1) นำใบของเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ไม่เติมฮอร์โมน และชิ้นส่วนพืชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ ได้แก่ ใบ และเหง้า ที่บดเป็นผงละเอียดนำมาชั่งน้ำหนักตัวอย่างละ 0.2 กรัม ลงขวดรูปชมพู่

2) เติมกรดไฮโดรคลอริกร้อยละ 1 ในเมทานอล ปริมาตร 10 มล. ลงในขวดรูปชมพู่ นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าสารแบบควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 ชั่วโมง

3) นำตัวอย่างออกจากเครื่องเขย่าสารแบบความคุมอุณหภูมิ จากนั้นนำตัวอย่างไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4

4) นำสารสกัดที่กรองด้วยเยื่อกรองสารสะลาย (syringe filter) ขนาด 0.2 ไมโครเมตร บรรจุสารสกัดตัวอย่างลงขวดไวแอลเพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและสารประกอบฟลาโวนอยด์ด้วยเครื่อง HPLC ปริมาตร 1.5 ลิตร เทคนิค HPLC ใช้คอลัมน์ชนิด C-18 ขนาด 250x4.6 มิลลิเมตร ยี่ห้อ LUNA (ขนาดอนุภาค 5 ไมโครลิตร) อัตราการไหล 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรในการฉีดสาร 20 ไมโครลิตร อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส การทดลองนี้ใช้ความยาวคลื่น 200-600 นาโนเมตร การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและสารประกอบฟลาโวนอยด์ใช้ช่วงความยาวคลื่นที่ 280, 320 และ 370 นาโนเมตร เพื่อนำมาวิเคราะห์สารประกอบเบื้องต้น โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ในระบบแกรเดียนต์ (Chumroenphat *et al*., 2021)

5.6.2 ขั้นตอนการเตรียมเฟสเคลื่อนที่

1) การเตรียมเฟสเคลื่อนที่จะใช้สารละลาย 2 ชนิด คือ สารละลายอะซิโตไนไตรล์และเตรียมสารละลายกรดแอซิติก (acetic acid) ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ทำภายในตู้ดูดควัน

โดยเทสารละลายกรดแอซิติก ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำ DI ปริมาตร 990 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร

2) นำไปกรองด้วยชุดกรองสุญญากาศโดยใช้เยื่อกรองสารละลายชนิดเมมเบรนไนลอน (nylon membrane filter) ขนาด 0.2 ไมโครเมตร จากนั้นนำสารบรรจุลงในขวดดูแรนขนาด 1,000 มิลลิลิตร (Kubola & Siriamornpun, 2011)

5.7 ขั้นตอนการวิเคราะห์สารพฤกษเคมีด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี–แมสสเปกโทรเมทรี (Gas Chromatography Mass Spectrometry, GC-MS)

1) นำใบของเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ไม่เติมฮอร์โมน และชิ้นส่วนพืชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ ได้แก่ ใบ และเหง้า ที่เป็นตัวอย่างสด มาล้างด้วยน้ำสะอาด

2) หั่นตัวอย่างพืชให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วนำไปชั่งด้วยเครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง ให้ได้ปริมาณ 0.2 กรัม

3) นำตัวอย่างพืชที่ชั่งแล้ว บรรจุลงในขวดไวแอล ขนาด 2 มล. ปิดฝาให้สนิท

4) วิเคราะห์ตัวอย่างพืชด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมทรี ยี่ห้อ Shimadzu (Tokyo, Japan) รุ่น QP2010 อุณหภูมิส่วนที่ฉีดสาร 280 องศาเซลเซียส ใช้คอลัมน์ชนิด silica capillary column (Rtx-5MS; Restek Co., Bellefonte, PA, USA) ขนาด 30 m x 0.25 มม. คอลัมน์จะตั้งโปรแกรมโดยใช้อุณหภูมิเริ่มต้นที่ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิด้วยอัตราเร็ว 50 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึงอุณหภูมิ 280 องศาเซลเซียส ส่วนของแมสสเปคโทรมิเตอร์เป็นแบบ Quadrupole และอุณหภูมิของ Ion Source เป็น 280 องศาเซลเซียส ในระบบ Electron Impact Ionization (EI) ที่ 70 eV โดยสแกนมวล (m/z) ช่วง 40 ถึง 550 amu พีคถูกระบุโดยการเปรียบเทียบรูปแบบการกระจายตัวของมวลกับข้อมูลที่มีอยู่ในสเปกตรัมด้วย NIST14 libraries (NIST) สารละลายมาตรฐานของ n-alkanes (C7-C23, Sigma-Aldrich) วิเคราะห์โดยใช้ค่า retention index (RI) ปริมาณสัมพัทธ์ของสารประกอบแต่ละชนิด แสดงผลเป็นเปอร์เซ็นต์พื้นที่ใต้พีค (Chumroenphat *et al*., 2021)

**3.3 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ**

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) วิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยตาราง ANOVA และวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี Duncan’s Multiple Rang Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรม SPSS เวอร์ชั่น 16

# บทที่ 4
# ผลการทดลอง

## 4.1 การชักนำให้เกิดยอดปลอดเชื้อ และการเพิ่มปริมาณพืชทดลอง

เมื่อเพาะเลี้ยงเมล็ดเปราะโคราชในอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน BA ความเข้มข้น 2 มก./ล. ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 มก./ล. พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยง 1 สัปดาห์ เริ่มเกิดยอดเกิดขึ้น มีอัตราการเกิดยอดที่สูง มีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ไม่เกิน 5 เปอร์เซ็นต์ ของเมล็ดที่เพาะเลี้ยงทั้งหมด เมื่อเพาะเลี้ยงผ่านไป 4 สัปดาห์ได้ต้นอ่อนที่มีลักษณะที่แข็งแรง ยอดมีขนาดใหญ่ สีเขียวเข้ม ใบมีขนาดใหญ่ บางเมล็ดมี 2 ยอด รากมีขนาดใหญ่ สีขาว แข็งแรง มีจำนวนมาก เนื่องจากเมล็ดเปราะโคราชที่นำมาเพาะเลี้ยงมีจำนวนน้อย จึงนำยอดเปราะโคราชมาเพิ่มจำนวนโดยนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมย้ายเนื้อเยื่อทุก 4 สัปดาห์ ทำ 3 รอบ จนได้ต้นพืชจำนวนมากแล้วนำต้นอ่อนเปราะโคราชย้ายมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เพื่อล้างอิทธิพลของฮอร์โมน BA และ NAA ก่อนนำพืชไปทำการทดลอง

## 4.2 ศึกษาผลของฮอร์โมน BA, BA ร่วมกับ NAA และ BA ร่วมกับ TDZ และ NAA ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดและรากในเปราะโคราช

จากการนำต้นอ่อนเปราะโคราชขนาดประมาณ 1 ซม. มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน BA ที่ระดับความเข้มข้น 0, 1, 2 และ 4 มก./ล. ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.1 มก./ล. และ 0.2 มก./ล. หรือ TDZ ความเข้มข้น 1 มก./ล. และ 3 มก./ล. เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าต้นอ่อนเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมฮอร์โมนไม่ค่อยเพิ่มจำนวนยอด มีจำนวนยอดเฉลี่ย 1.30 ยอด/ชิ้นส่วนพืช เพิ่มจำนวนยอดน้อยได้น้อยที่สุดจากการเพาะเลี้ยงทั้งหมด 16 หน่วยทดลอง ต้นโต สูง มีความยาวยอดเฉลี่ยสูงสุด 4.82 ซม. จำนวนราก 4.50 ราก/ชิ้นส่วนพืช และความยาวราก 2.69 ซม. ต้นอ่อนเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน BA ความเข้มข้น 2 มก./ล. ร่วมกับ NAA 0.2 มก./ล. และ TDZ 3 มก./ล. มีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 4.60 ยอด/ชิ้นส่วนพืช ความยาวยอดเฉลี่ย 1.84 ซม. และมีจำนวนรากเฉลี่ย 7.50 ราก/ชิ้นส่วนพืช ความยาวรากเฉลี่ย 1.85 ซม. (ตาราง 1 และภาพ 3 และ 4) ลักษณะของลำต้นและใบมีขนาดเล็ก สีเขียวสดใบแผ่ออก รากมีสีเขียวขนาดเล็ก มีจำนวนมาก ต้นอ่อนเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน BA ความเข้มข้น 4 มก./ล. ร่วมกับ NAA 0.2 มก./ล. มีจำนวนรากเฉลี่ยสูงสุด 8.60 ราก/ชิ้นส่วนพืช ต้นอ่อนเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน BA ความเข้มข้น

1 มก./ล. มีความยาวรากเฉลี่ยสูงสุด 3.48 ซม. เมื่อเพาะเลี้ยงต้นอ่อนเปราะโคราชในอาหารที่เติมฮอร์โมน BA ที่ระดับความเข้มข้น 1-4 มก./ล. ร่วมกับ TDZ 1 มก./ล. และ NAA 0.2 มก./ล. พบว่าต้นอ่อนที่เกิดขึ้นใหม่ในหลอดทดลองค่อนข้างมีความยาวยอดสั้น เกิดรากน้อยมาก (2.30-2.90 ราก) และรากมีขนาดสั้น (2.10-2.60 ซม.) เมื่อเปรียบเทียบกับหน่วยทดลองอื่น ๆ เมื่อนำมาวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี DMRT พบว่าจำนวนยอดเฉลี่ย ความยาวยอดเฉลี่ย จำนวนรากเฉลี่ยและความยาวรากเฉลี่ย มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

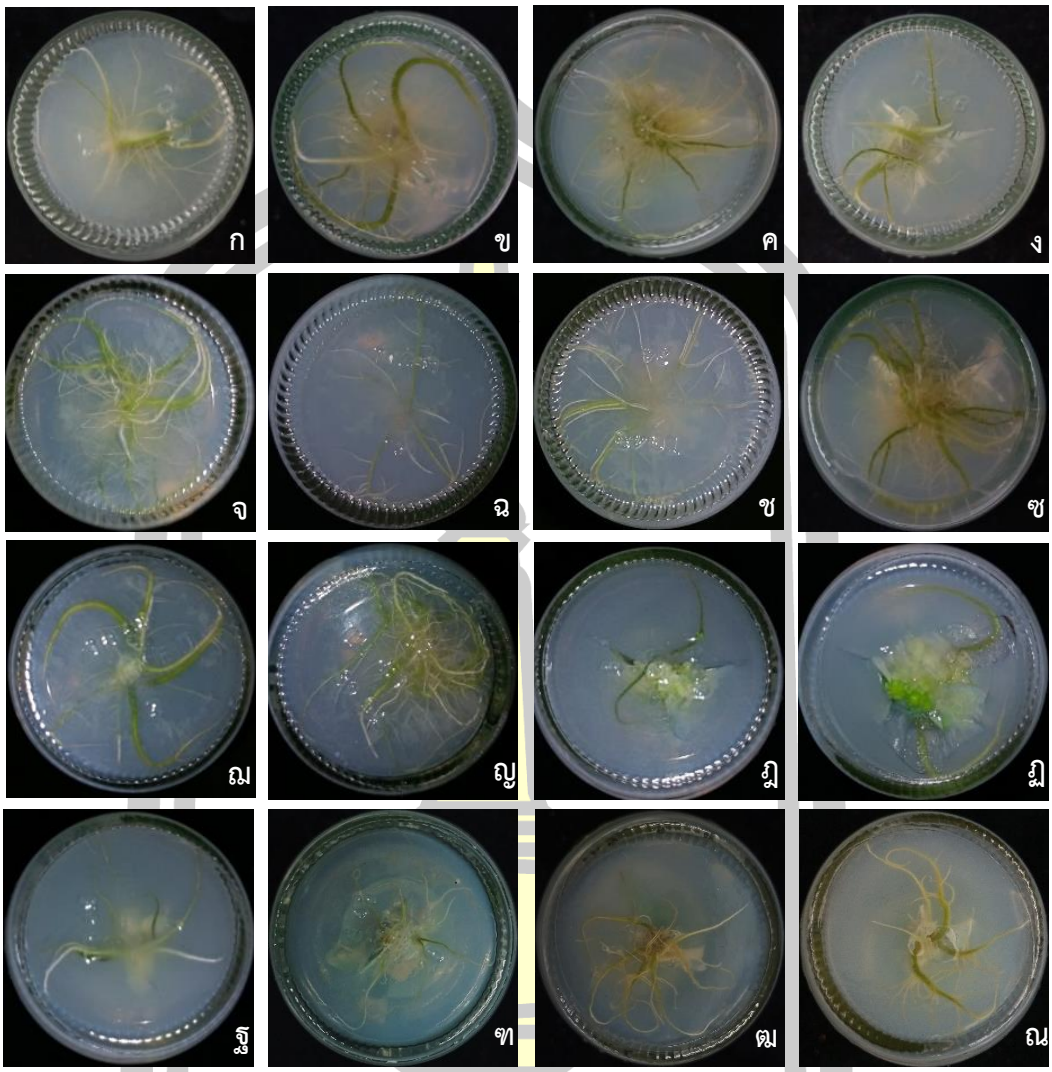
พหูน ปณ ฑิโต ชีเว

**ตาราง 1** ผลของฮอร์โมน BA, BA ร่วมกับ NAA และ BA ร่วมกับ TDZ และ NAA ความเข้มข้นแตกต่างกันต่อการชักนำให้เกิดยอดและรากในเปราะโคราช เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์

| ฮอร์โมนพืช (มก./ล.) | จำนวนยอด (ยอด/ชิ้นส่วนพืช) | ความยาวยอด (ซม.) | จำนวนราก (ราก/ชิ้นส่วนพืช) | ความยาวราก (ซม.) |
|---|---|---|---|---|
| MS (control) | 1.30±0.15$^{e}$ | 4.82±0.27$^{a}$ | 4.50±0.90$^{def}$ | 2.69±0.14$^{ab}$ |
| BA | | | | |
| 1 | 3.10±0.23$^{bcd}$ | 4.35±0.42$^{ab}$ | 6.30±1.26$^{abcd}$ | 3.48±0.27$^{a}$ |
| 2 | 3.00±0.33$^{bcd}$ | 3.78±0.13$^{bcd}$ | 5.30±1.06$^{bcde}$ | 2.71±0.17$^{bc}$ |
| 4 | 2.90±0.17$^{bcd}$ | 3.87±0.25$^{bc}$ | 4.00±0.47$^{def}$ | 2.63±0.18$^{bc}$ |
| BA+NAA | | | | |
| 1+0.1 | 2.70±0.26$^{cd}$ | 3.99±0.26$^{b}$ | 5.35±0.38$^{bcde}$ | 3.02±0.19$^{ab}$ |
| 2+0.1 | 3.20±0.36$^{bcd}$ | 4.20±0.20$^{ab}$ | 4.80±0.65$^{cdef}$ | 3.01±0.14$^{ab}$ |
| 4+0.1 | 3.30±0.26$^{bcd}$ | 4.02±0.17$^{ab}$ | 6.10±0.85$^{abcd}$ | 2.00±0.14$^{def}$ |
| 1+0.2 | 3.20±0.63$^{bcd}$ | 4.11±0.30$^{ab}$ | 7.70±0.97$^{ab}$ | 2.78±0.24$^{bc}$ |
| 2+0.2 | 3.30±0.40$^{bcd}$ | 3.20±0.24$^{cde}$ | 5.70±0.73$^{bcd}$ | 2.23±0.17$^{cde}$ |
| 4+0.2 | 4.00±0.70$^{ab}$ | 3.79±0.33$^{bcd}$ | 8.60±1.44$^{a}$ | 2.52±0.11$^{bcd}$ |
| BA+TDZ+NAA | | | | |
| 1+1+0.2 | 2.50±0.37$^{cd}$ | 2.31±0.11$^{fg}$ | 2.10±0.31$^{f}$ | 1.52±0.16$^{f}$ |
| 2+1+0.2 | 2.30±0.33$^{de}$ | 3.11±0.32$^{de}$ | 2.10±0.43$^{f}$ | 1.54±0.30$^{f}$ |
| 4+1+0.2 | 2.90±0.27$^{bcd}$ | 2.83±0.24$^{ef}$ | 2.60±0.67$^{f}$ | 1.62±0.30$^{f}$ |
| 1+3+0.2 | 3.60±0.34$^{abc}$ | 2.00±0.18$^{g}$ | 6.10±0.80$^{abcd}$ | 1.70±0.91$^{ef}$ |
| 2+3+0.2 | 4.60±0.31$^{a}$ | 1.84±0.10$^{g}$ | 7.50±1.12$^{abc}$ | 1.85±0.14$^{ef}$ |
| 4+3+0.2 | 3.20±0.44$^{bcd}$ | 1.84±0.09$^{g}$ | 5.00±1.01$^{bcde}$ | 1.84±0.25$^{ef}$ |

หมายเหตุ: - ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±SE) อักษรที่แตกต่างกันทางแนวตั้งมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ DMRT

**ภาพที่ 3** การเจริญของยอดเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน BA, BA ร่วมกับ NAA หรือ TDZ ความเข้มข้นแตกต่างกัน เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์
(ก) ไม่เติมฮอร์โมน (ข) BA 1 มก./ล. (ค) BA 2 มก./ล. (ง) BA 4 มก./ล. (จ) BA 1 มก./ล. ร่วมกับ NAA 0.1 มก./ล. (ฉ) BA 2 มก./ล. ร่วมกับ NAA 0.1 มก./ล. (ช) BA 4 มก./ล. ร่วมกับ NAA 0.1 มก./ล. (ซ) BA 1 มก./ล. ร่วมกับ NAA 0.2 มก./ล. (ฌ) BA 2 มก./ล. ร่วมกับ NAA 0.2 มก./ล. (ญ) BA 4 มก./ล. ร่วมกับ NAA 0.2 มก./ล. (ฎ) BA 1 มก./ล. ร่วมกับ TDZ 1 มก./ล. และ NAA 0.2 มก./ล. (ฏ) BA 2 มก./ล. ร่วมกับ TDZ 1 มก./ล. และ NAA 0.2 มก./ล. และ (ฐ) BA 4 มก./ล. ร่วมกับ TDZ 1 มก./ล. และ NAA 0.2 มก./ล. (ฑ) BA 1 มก./ล. ร่วมกับ TDZ 3 มก./ล. และ NAA 0.2 มก./ล. (ฒ) BA 2 มก./ล. ร่วมกับ TDZ 3 มก./ล. และ NAA 0.2 มก./ล. (ณ) BA 4 มก./ล. ร่วมกับ TDZ 3 มก./ล. และ NAA 0.2 มก./ล.




**ภาพที่ 4** การเจริญของรากเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน BA, BA ร่วมกับ NAA หรือ TDZ ความเข้มข้นแตกต่างกัน เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์

(ก) ไม่เติมฮอร์โมน (ข) BA 1 มก./ล. (ค) BA 2 มก./ล. (ง) BA 4 มก./ล. (จ) BA 1 มก./ล. ร่วมกับ NAA 0.1 มก./ล. (ฉ) BA 2 มก./ล. ร่วมกับ NAA 0.1 มก./ล. (ช) BA 4 มก./ล. ร่วมกับ NAA 0.1 มก./ล. (ซ) BA 1 มก./ล. ร่วมกับ NAA 0.2 มก./ล. (ฌ) BA 2 มก./ล. ร่วมกับ NAA 0.2 มก./ล. (ญ) BA 4 มก./ล. ร่วมกับ NAA 0.2 มก./ล. (ฎ) BA 1 มก./ล. ร่วมกับ TDZ 1 มก./ล. และ NAA 0.2 มก./ล. (ฏ) BA 2 มก./ล. ร่วมกับ TDZ 1 มก./ล. และ NAA 0.2 มก./ล. และ (ฐ) BA 4 มก./ล. ร่วมกับ TDZ 1 มก./ล. และ NAA 0.2 มก./ล. (ฑ) BA 1 มก./ล. ร่วมกับ TDZ 3 มก./ล. และ NAA 0.2 มก./ล. (ฒ) BA 2 มก./ล. ร่วมกับ TDZ 3 มก./ล. และ NAA 0.2 มก./ล. (ณ) BA 4 มก./ล. ร่วมกับ TDZ 3 มก./ล. และ NAA 0.2 มก./ล.

**4.3 ศึกษาผลของฮอร์โมน BA ร่วมกับ Kinetin และ NAA ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดและรากเปราะโคราชเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง**

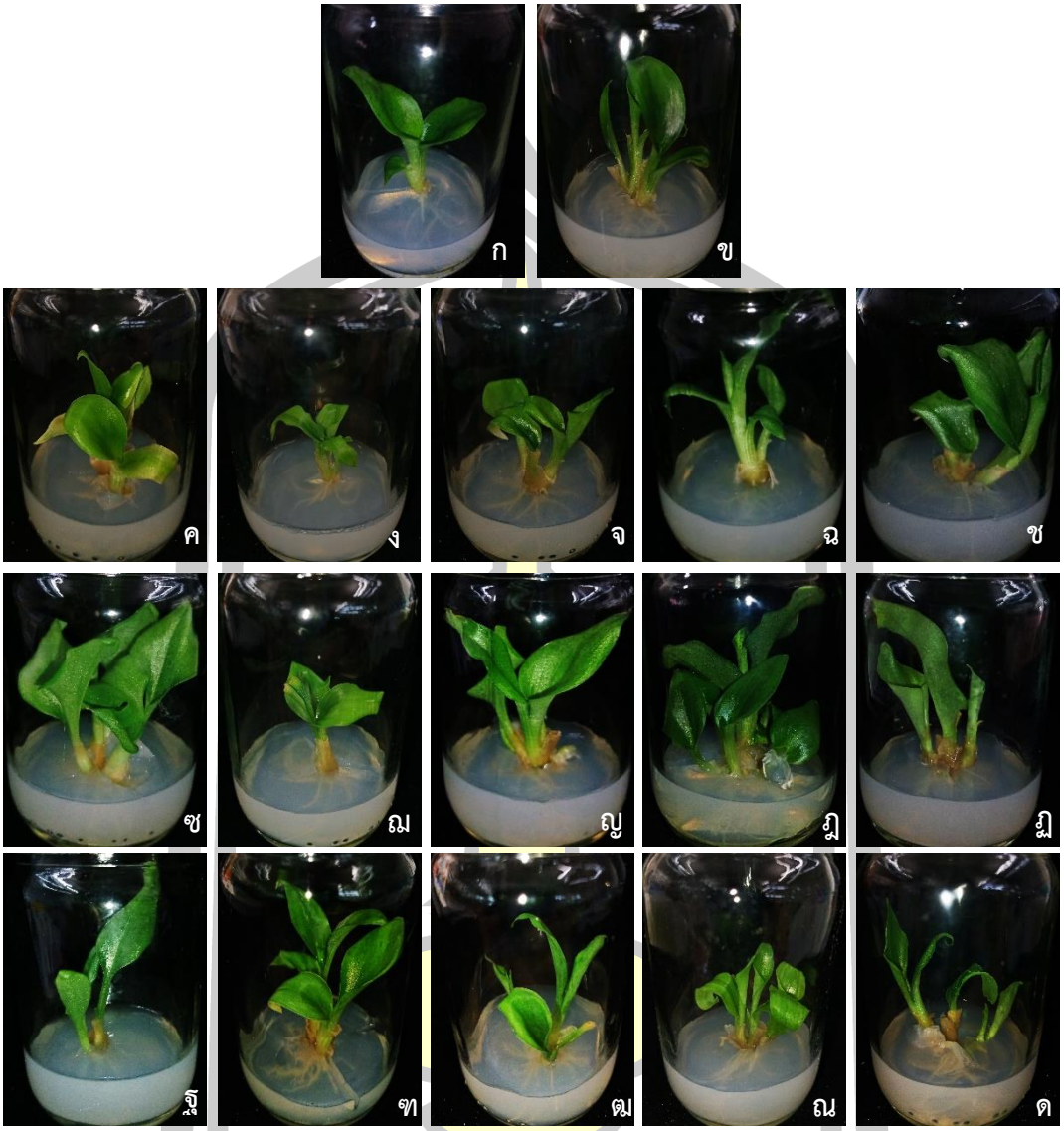
จากการนำต้นอ่อนเปราะโคราชขนาดประมาณ 1 ซม. มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน BA ที่ระดับความเข้มข้น 0, 1, 2, 3 และ 4 มก./ล. ร่วมกับ Kinetin ความเข้มข้น 2 และ 4 มก./ล. และ NAA ความเข้มข้น 0.1 มก./ล. และ 0.2 มก./ล. เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าต้นอ่อนเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมฮอร์โมนไม่ค่อยเพิ่มจำนวนยอด มีจำนวนยอดเฉลี่ย 1.40 ยอด/ชิ้นส่วนพืช เพิ่มจำนวนยอดน้อยได้น้อยที่สุดจากการเพาะเลี้ยงทั้งหมด 17 หน่วยทดลอง ต้นโต สูง มีความยาวยอดเฉลี่ย 2.52 ซม. จำนวนราก 6.40 ราก/ชิ้นส่วนพืช และความยาวราก 1.78 ซม. ต้นอ่อนเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน BA ความเข้มข้น 4 มก./ล. ร่วมกับ Kinetin 4 มก./ล. และ NAA 0.2 มก./ล. มีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 3.40 ยอด/ชิ้นส่วนพืช ความยาวยอดเฉลี่ย 3.02 ซม. จำนวนรากเฉลี่ย 3.50 ราก/ชิ้นส่วนพืช และความยาวราก 1.85 ซม. ลักษณะของลำต้นและใบมีขนาดเล็ก สีเขียวสดใบแผ่ออก รากมีสีเขียวขนาดเล็ก มีจำนวนน้อย (ตาราง 2 และภาพ 5 และ 6) ต้นอ่อนเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน BA ความเข้มข้น 2 มก./ล. ร่วมกับ Kinetin 2 มก./ล. และ NAA 0.2 มก./ล. มีความยาวยอดเฉลี่ยสูงสุด 3.96 ต้นอ่อนเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน BA ความเข้มข้น 2 มก./ล. ร่วมกับ Kinetin 2 มก./ล. และ NAA 0.1 มก./ล. มีจำนวนรากเฉลี่ยสูงสุด 7.70 ราก/ชิ้นส่วนพืช เมื่อเพาะเลี้ยงต้นอ่อนเปราะโคราชในอาหารที่เติมฮอร์โมน BA ที่ระดับความเข้มข้น 3 มก./ล. ร่วมกับ Kinetin 2 มก./ล. และ NAA 0.2 มก./ล. พบว่ามีความยาวรากสูงสุด 2.03 ซม. เมื่อนำมาวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี DMRT พบว่าจำนวนยอดเฉลี่ย ความยาวยอดเฉลี่ย จำนวนรากเฉลี่ยและความยาวรากเฉลี่ย มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

พหุน ปณฺฑิโต ชีเว

**ตาราง 2** ผลของฮอร์โมน BA ร่วมกับ Kinetin และ NAA ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดและรากเปราะโคราช เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์

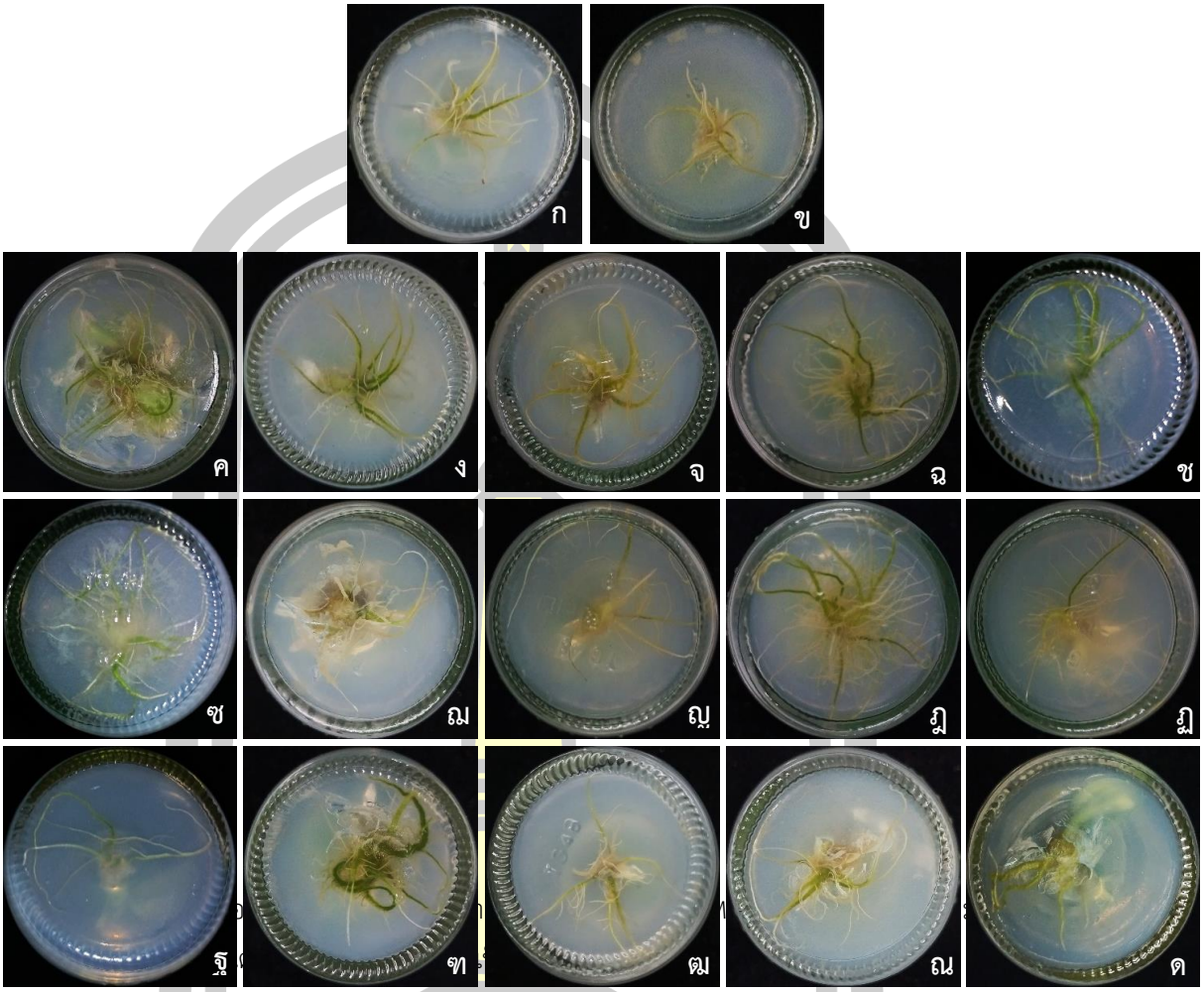
| ฮอร์โมนพืช (มก./ล.) | จำนวนยอด (ยอด/ชิ้นส่วนพืช) | ความยาวยอด (ซม.) | จำนวนราก (ราก/ชิ้นส่วนพืช) | ความยาวราก (ซม.) |
|---|---|---|---|---|
| MS (control) | 1.40±0.22$^{d}$ | 2.52±0.28$^{bc}$ | 6.40±0.90$^{ab}$ | 1.78±0.19$^{ab}$ |
| BA+Kinetin+NAA | | | | |
| 1+2+0.1 | 2.50±0.22$^{bc}$ | 2.57±0.11$^{bc}$ | 5.50±0.65$^{abcde}$ | 1.58±0.15$^{ab}$ |
| 2+2+0.1 | 2.80±0.39$^{ab}$ | 2.63±0.17$^{bc}$ | 7.70±0.97$^{a}$ | 1.97±0.14$^{ab}$ |
| 3+2+0.1 | 2.60±0.22$^{abc}$ | 2.62±0.36$^{bc}$ | 6.30±0.47$^{ab}$ | 1.75±0.10$^{ab}$ |
| 4+2+0.1 | 2.70±0.21$^{abc}$ | 2.32±0.17$^{c}$ | 5.90±0.60$^{abc}$ | 1.78±0.14$^{ab}$ |
| 1+4+0.1 | 2.20±0.25$^{bcd}$ | 3.52±0.32$^{ab}$ | 5.50±0.98$^{abcde}$ | 1.93±0.18$^{ab}$ |
| 2+4+0.1 | 1.90±0.23$^{cd}$ | 3.22±0.36$^{abc}$ | 4.40±0.45$^{bcdefg}$ | 2.00±0.10$^{a}$ |
| 3+4+0.1 | 2.30±0.30$^{bc}$ | 3.56±0.42$^{ab}$ | 5.00±0.42$^{bcdef}$ | 1.97±0.13$^{ab}$ |
| 4+4+0.1 | 2.20±0.33$^{bcd}$ | 3.03±0.29$^{abc}$ | 2.60±0.56$^{g}$ | 1.53±0.20$^{ab}$ |
| 1+2+0.2 | 2.00±0.21$^{bcd}$ | 3.56±0.51$^{ab}$ | 5.00±0.97$^{bcdef}$ | 2.02±0.19$^{a}$ |
| 2+2+0.2 | 2.70±0.30$^{abc}$ | 3.96±0.41$^{a}$ | 5.80±0.89$^{abcd}$ | 1.93±0.13$^{ab}$ |
| 3+2+0.2 | 2.60±0.22$^{abc}$ | 3.11±0.17$^{abc}$ | 3.20±0.57$^{fg}$ | 2.03±0.19$^{a}$ |
| 4+2+0.2 | 2.50±0.22$^{bc}$ | 3.02±0.61$^{abc}$ | 3.60±0.67$^{defg}$ | 1.43±0.26$^{b}$ |
| 1+4+0.2 | 2.20±0.20$^{bcd}$ | 3.20±0.51$^{abc}$ | 5.00±0.54$^{bcdef}$ | 1.63±0.19$^{ab}$ |
| 2+4+0.2 | 2.30±0.37$^{bc}$ | 2.74±0.30$^{bc}$ | 5.30±0.75$^{bcdef}$ | 1.86±0.11$^{ab}$ |
| 3+4+0.2 | 2.80±0.20$^{ab}$ | 2.64±0.13$^{bc}$ | 3.70±0.42$^{cdefg}$ | 1.97±0.11$^{ab}$ |
| 4+4+0.2 | 3.40±0.16$^{a}$ | 3.02±0.34$^{abc}$ | 3.50±0.27$^{efg}$ | 1.85±0.12$^{ab}$ |

หมายเหตุ: - ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±SE) อักษรที่แตกต่างกันทางแนวตั้งมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ DMRT




**ภาพที่ 5** การเจริญของยอดเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน BA ร่วมกับ NAA และ Kinetin ความเข้มข้นแตกต่างกัน เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์

(ก) ไม่เติมฮอร์โมน (ข) BA 1 มก./ล. ร่วมกับ Kinetin 2 มก./ล. และ NAA 0.1 มก./ล. (ค) BA 2 มก./ล. ร่วมกับ Kinetin 2 มก./ล. และ NAA 0.1 มก./ล. (ง) BA 3 มก./ล. ร่วมกับ Kinetin 2 มก./ล. และ NAA 0.1 มก./ล. (จ) BA 4 มก./ล. ร่วมกับ Kinetin 2 มก./ล. และ NAA 0.1 มก./ล. (ฉ) BA 1 มก./ล. ร่วมกับ Kinetin 4 มก./ล. และ NAA 0.1 มก./ล. (ช) BA 2 มก./ล. ร่วมกับ Kinetin 4 มก./ล. และ NAA 0.1 มก./ล. (ซ) BA 3 มก./ล. ร่วมกับ Kinetin 4 มก./ล. และ NAA 0.1 มก./ล. (ฌ) BA 4 มก./ล. ร่วมกับ Kinetin 4 มก./ล. และ NAA 0.1 มก./ล. (ญ) BA 1 มก./ล. ร่วมกับ Kinetin 2 มก./ล. และ NAA 0.2 มก./ล. (ฎ) BA 2 มก./ล. ร่วมกับ Kinetin 2 มก./ล. และ NAA 0.2 มก./ล. (ฏ) BA 3 มก./ล. ร่วมกับ Kinetin 2 มก./ล. และ NAA 0.2 มก./ล. (ฐ) BA 4 มก./ล. ร่วมกับ Kinetin 2 มก./ล. และ NAA 0.2 มก./ล. (ฑ) BA 1 มก./ล. ร่วมกับ Kinetin 4 มก./ล. และ NAA 0.2 มก./ล. (ฒ) BA 2 ร่วมกับ Kinetin 4 มก./ล. และ NAA 0.2 มก./ล. (ณ) BA 3 มก./ล. ร่วมกับ Kinetin 4 มก./ล. และ NAA 0.2 มก./ล.




(ก) ไม่เติมฮอร์โมน (ข) BA 1 มก./ล. ร่วมกับ Kinetin 2 มก./ล. และ NAA 0.1 มก./ล. (ค) BA 2 มก./ล. ร่วมกับ Kinetin 2 มก./ล. และ NAA 0.1 มก./ล. (ง) BA 3 มก./ล. ร่วมกับ Kinetin 2 มก./ล. และ NAA 0.1 มก./ล. (จ) BA 4 มก./ล. ร่วมกับ Kinetin 2 มก./ล. และ NAA 0.1 มก./ล. (ฉ) BA 1 มก./ล. ร่วมกับ Kinetin 4 มก./ล. และ NAA 0.1 มก./ล. (ช) BA 2 มก./ล. ร่วมกับ Kinetin 4 มก./ล. และ NAA 0.1 มก./ล. (ซ) BA 3 มก./ล. ร่วมกับ Kinetin 4 มก./ล. และ NAA 0.1 มก./ล. (ฌ) BA 4 มก./ล. ร่วมกับ Kinetin 4 มก./ล. และ NAA 0.1 มก./ล. (ญ) BA 1 มก./ล. ร่วมกับ Kinetin 2 มก./ล. และ NAA 0.2 มก./ล. (ฎ) BA 2 มก./ล. ร่วมกับ Kinetin 2 มก./ล. และ NAA 0.2 มก./ล. (ฏ) BA 3 มก./ล. ร่วมกับ Kinetin 2 มก./ล. และ NAA 0.2 มก./ล. (ฐ) BA 4 มก./ล. ร่วมกับ Kinetin 2 มก./ล. และ NAA 0.2 มก./ล. (ฑ) BA 1 มก./ล. ร่วมกับ Kinetin 4 มก./ล. และ NAA 0.2 มก./ล. (ฒ) BA 2 ร่วมกับ Kinetin 4 มก./ล. และ NAA 0.2 มก./ล. (ณ) BA 3 มก./ล. ร่วมกับ Kinetin 4 มก./ล. และ NAA 0.2 มก./ล.

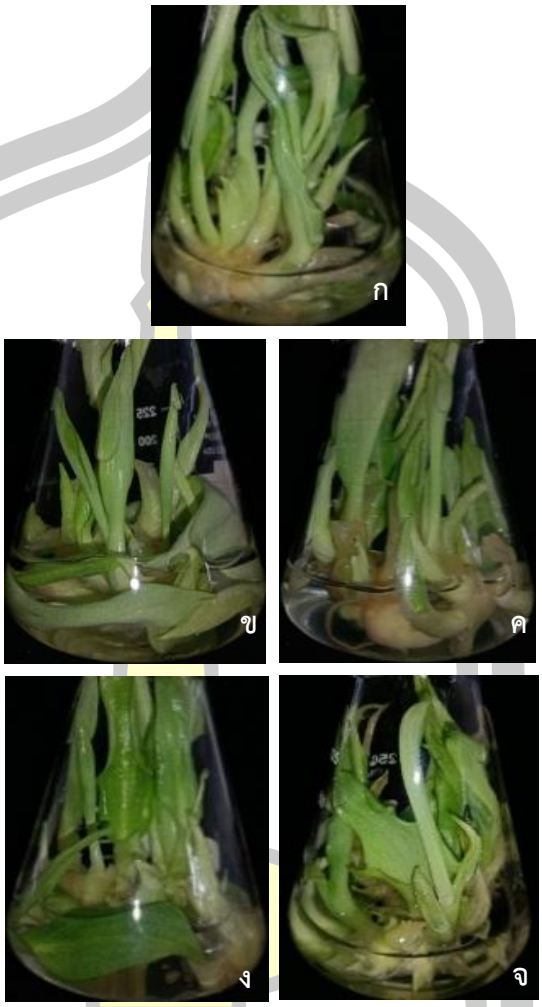
**4.4 ศึกษาผลร่วมระหว่างฮอร์โมนออกซินและไซโทไคนินที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดและรากเปราะโคราชเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว**

จากการนำต้นอ่อนเปราะโคราชขนาดประมาณ 1 ซม. มาเพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. ในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน BA และ Kinetin ที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 2 มก./ล. ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 2 มก./ล. และ NAA ความเข้มข้น 0.2 มก./ล. เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าต้นอ่อนเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมนมีจำนวนยอดเฉลี่ย 4.10 ยอด/ชิ้นส่วนพืช ใบสีเขียวเข้มสด แข็งแรง ใบผอมยาวขนานกับความสูงของขวดรูปชมพู่ มีความยาวยอดเฉลี่ยสูงสุด 9.08 ซม. จำนวนราก 6.87 ราก/ชิ้นส่วนพืช และความยาวราก 2.72 ซม. ในขณะที่ต้นอ่อนเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน Kinetin ความเข้มข้น 1 มก./ล. ร่วมกับ TDZ 2 มก./ล. และ NAA ความเข้มข้น 0.2 มก./ล. พบว่ามีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 6.00 ยอด/ชิ้นส่วนพืช ความยาวยอด 5.27 ซม. จำนวนราก 2.87 ราก/ชิ้นส่วนพืช ความยาวราก 3.48 ซม. ลักษณะของลำต้นและใบมีขนาดค่อนข้างใหญ่ มียอดขนาดเล็กจำนวนมาก ลำต้นเทียมมีขนาดใหญ่ สีเขียวสด ต้นอ่อนที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน BA ความเข้มข้น 1 มก./ล. ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 2 มก./ล. และ NAA ความเข้มข้น 0.2 มก./ล. มีจำนวนรากเฉลี่ยสูงสุด 7.40 ราก/ชิ้นส่วนพืช ความยาวราก 2.85 ซม. ลักษณะของรากมีสีเขียวเข้ม มีขนาดใหญ่ ต้นอ่อนเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน BA ความเข้มข้น 2 มก./ล. ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 2 มก./ล. และ NAA ความเข้มข้น 0.2 มก./ล. มีความยาวรากเฉลี่ยสูงสุด 3.80 ซม. (ตาราง 3 และ ภาพ 7) เมื่อนำมาวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี DMRT พบว่าจำนวนยอดเฉลี่ย ความยาวยอดเฉลี่ย จำนวนรากเฉลี่ย และความยาวรากเฉลี่ย มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

**ตาราง 3** ผลของฮอร์โมน BA ร่วมกับ TDZ และ Kinetin ความเข้มข้นแตกต่างกันต่อการชักนำให้เกิดยอดและรากของเปราะโคราชเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเป็นเวลา 8 สัปดาห์

| ฮอร์โมนพืช (มก./ล.) | จำนวนยอด (ยอด/ชิ้นส่วนพืช) | ความยาวยอด (ซม.) | จำนวนราก (ราก/ชิ้นส่วนพืช) | ความยาวราก (ซม.) |
|---|---|---|---|---|
| MS (control) | 4.10±0.57$^{b}$ | 9.08±0.71$^{a}$ | 6.87±1.18$^{a}$ | 2.72±0.26$^{b}$ |
| BA 1+TDZ 2+NAA 0.2 | 5.27±0.34$^{a}$ | 6.60±0.42$^{b}$ | 7.40±0.93$^{a}$ | 2.85±0.37$^{b}$ |
| BA 2+TDZ 2+NAA 0.2 | 5.20±0.67$^{a}$ | 5.67±0.32$^{b}$ | 4.60±0.51$^{b}$ | 3.80±0.40$^{a}$ |
| Kinetin 1+TDZ 2+NAA 0.2 | 6.00±0.72$^{a}$ | 5.27±0.40$^{b}$ | 2.87±0.38$^{bc}$ | 3.46±0.21$^{ab}$ |
| Kinetin 2+TDZ 2+NAA 0.2 | 5.33±0.45$^{a}$ | 6.17±0.33$^{b}$ | 2.33±0.45$^{c}$ | 2.54±0.32$^{b}$ |

หมายเหตุ: - ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±SE) อักษรที่แตกต่างกันทางแนวตั้งมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ DMRT




**ภาพที่ 7** ยอดเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่เติม BA และ Kinetin ร่วมกับ TDZ และ NAA เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์

(ก) ไม่เติมฮอร์โมน (ข) BA 1 มก./ล. ร่วมกับ TDZ 2 มก./ล. และ NAA 0.2 มก./ล. (ค) BA 2 มก./ล. ร่วมกับ TDZ 2 มก./ล. และ NAA 0.2 มก./ล. (ง) Kinetin 1 มก./ล. ร่วมกับ TDZ 2 มก./ล. และ NAA 0.2 มก./ล. และ (จ) Kinetin 2 มก./ล. ร่วมกับ TDZ 2 มก./ล. และ NAA 0.2 มก./ล.

พหุน ปณ ฑิโต ชีเว

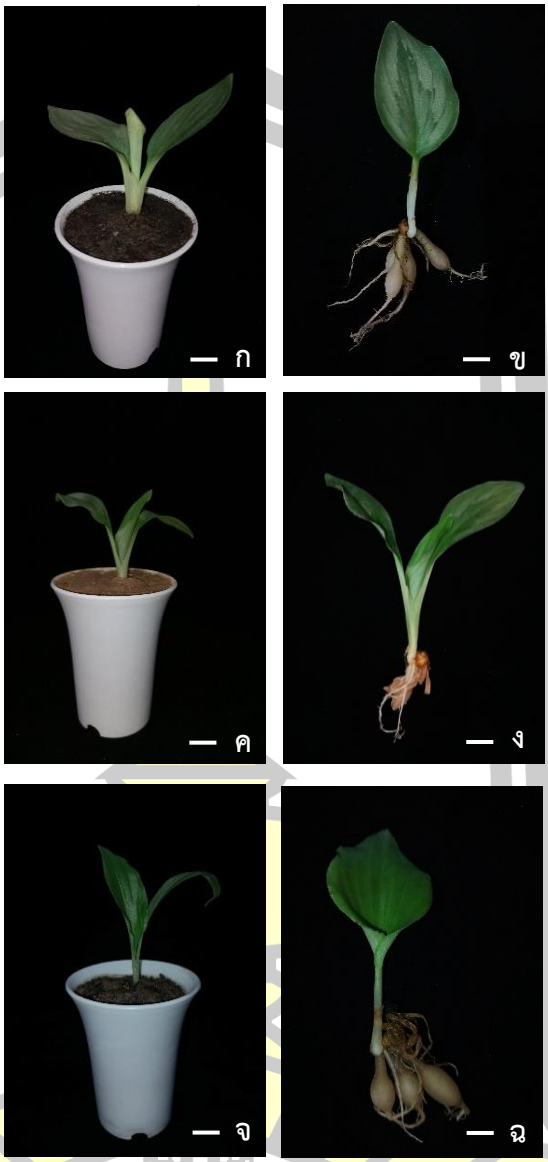
**4.5 การย้ายเปราะโคราชออกปลูกในเรือนเพาะชำ**

นำต้นเปราะโคราชที่เจริญเต็มที่ในหลอดทดลองขนาดประมาณ 7 ซม. ที่มีต้นใบและรากสมบูรณ์แข็งแรงทำการย้ายลงในอาหารใหม่ในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมนเพื่อปรับสภาพพืชเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จากนั้นนำต้นพืชที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองมาปรับสภาพภายนอกห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ไม่มีการควบคุมปัจจัยภายนอกเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ นำพืชที่ปรับสภาพแล้วย้ายออกปลูกในเรือนเพาะชำโดยพืชหนึ่งต้นปลูกในกระถางดำที่มีวัสดุปลูกเพียง 1 ต้น โดยมีการควบคุมความชื้นและแสงให้กับต้นพืช ปลูกเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ในดิน 3 ประเภท คือ ดินร่วน ดินทราย และดินร่วนผสมดินทราย รดน้ำวันละ 1 ครั้ง ครั้งละ 100 มล. เวลาเช้า (9.00-10.00 น.) บันทึกการเจริญเติบโต เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต จำนวนยอดเฉลี่ย ความยาวยอดเฉลี่ย จำนวนใบ ความกว้างใบเฉลี่ย ความยาวใบเฉลี่ย จำนวนรากเฉลี่ย ความยาวรากเฉลี่ย จำนวนรากสะสมอาหารเฉลี่ย และความยาวรากสะสมอาหารเฉลี่ย พบว่าต้นอ่อนเปราะโคราชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพืช อายุ 8 สัปดาห์ สูงประมาณ 8 ซม. ที่ปรับสภาพแล้วนำมาย้ายออกปลูกในเรือนเพาะชำเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ในวัสดุปลูก 3 ชนิด คือ ดินร่วน ดินทราย และดินร่วนผสมดินทราย (1:1) พบว่าเมื่อเริ่มย้ายปลูกเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ต้นอ่อนมีการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี และเริ่มมีการกางใบในสัปดาห์ที่ 2 ต้นโตมีการขยายขนาด และเริ่มมียอดใหม่เกิดขึ้น ต้นอ่อนเปราะโคราชที่ย้ายปลูกในดินร่วน ดินทราย และดินร่วนผสมดินทราย มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 100% ต้นพืชที่ปลูกในดินร่วนผสมดินทรายมีการเกิดยอดมากที่สุด 1.70 ยอด/ต้น และมีจำนวนรากมากที่สุด 6.20 ราก/ชิ้นส่วนพืช ต้นอ่อนเปราะโคราชที่ย้ายปลูกในดินร่วนมีจำนวนใบและความกว้างของใบมากที่สุด 2.54 ใบ/ต้น และ 3.66 ซม. ตามลำดับ ต้นอ่อนเปราะโคราชที่ปลูกในดินทรายมีความยาวยอดมากที่สุด 9.10 ซม. และมีความยาวของใบมากที่สุด 7.18 ซม. (ตาราง 4 และภาพ 8) ต้นพืชที่ปลูกในดินร่วน พบว่ามีความยาวรากเฉลี่ยมากที่สุด 3.32 ซม. นอกจากนี้ในการทดลองย้ายต้นอ่อนเปราะโคราชออกปลูกในครั้งนี้เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ต้นพืชมีการเกิดราก และพบมีการสร้างรากสะสมอาหารเมื่อย้ายปลูกในวัสดุปลูกทุกประเภท เมื่อนำมาวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี DMRT พบว่าจำนวนยอด ความยาวใบ จำนวนราก ความยาวราก และความยาวรากสะสมอาหาร มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

**ตาราง 4** การย้ายต้นอ่อนเปราะโคราชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อออกปลูกในเรือนเพาะชำเป็นเวลา 8 สัปดาห์

| วัสดุปลูก | เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต (%) | จำนวนยอด (ยอด/ต้น) | ความยาวยอด (ซม.) | จำนวนใบ (ใบ/ต้น) | ความกว้างใบ (ซม.) | ความยาวใบ (ซม.) | จำนวนราก (ราก/ต้น) | ความยาวราก (ซม.) | จำนวนรากสะสมอาหาร (ราก/ต้น) | ความยาวรากสะสมอาหาร (ซม.) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ดินร่วน | 100 | 1.20±0.13$^{b}$ | 8.15±0.59$^{a}$ | 2.54±0.40$^{a}$ | 3.66±0.30$^{a}$ | 5.8±0.44$^{b}$ | 3.20±0.30$^{b}$ | 3.32±0.52$^{a}$ | 3.00±.033$^{a}$ | 2.70±0.14$^{a}$ |
| ดินทราย | 100 | 1.10±0.32$^{b}$ | 9.10±1.02$^{a}$ | 2.50±0.17$^{a}$ | 3.03±0.24$^{a}$ | 7.18±0.50$^{a}$ | 4.10±0.45$^{b}$ | 2.13±0.52$^{b}$ | 2.60±0.50$^{a}$ | 1.45±0.32$^{b}$ |
| ดินร่วนผสมดินทราย | 100 | 1.70±0.15$^{a}$ | 8.60±0.85$^{a}$ | 2.10±0.10$^{a}$ | 3.38±0.23$^{a}$ | 6.25±0.37$^{ab}$ | 6.20±0.33$^{a}$ | 2.31±0.30$^{ab}$ | 3.60±0.37$^{a}$ | 2.12±0.24$^{ab}$ |

**หมายเหตุ:** - ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย±ค่าเฉลี่ยเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±SE) อักษรที่แตกต่างกันทางแนวตั้งมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ DMRT




**ภาพที่ 8** ต้นอ่อนเปราะโคราชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อย้ายปลูกในเรือนเพาะชำในดินร่วน ดินทราย และดินร่วนผสมดินทราย (สเกล 1 ซม.)
(ก)-(ข) ปลูกในดินร่วน (ค)-(ง) ปลูกในดินทราย และ (จ)-(ฉ) ปลูกในดินร่วนผสมดินทราย

**4.6 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ**

4.6.1 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

เมื่อนำสารสกัดจากใบและเหง้าของเปราะโคราชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติและใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมน สกัดด้วยโซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐาน วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ด้วยวิธี Folin-ciocalteu ตามวิธีของ Kubola & Siriamornpun (2011) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ปริมาณสารประกอบฟีนอกลิกทั้งหมดคำนวณจากกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก y เท่ากับ 0.0054x + 0.0156 มีค่าสหสัมพันธ์ ($r^2$) = 0.9994 ดังที่แสดงในตารางภาคผนวก และภาพภาคผนวก พบว่าสารสกัดในชิ้นส่วนใบของเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง พบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุดเท่ากับ 107.21 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักแห้ง รองลงมาพบปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในใบที่เจริญในสภาพธรรมชาติเท่ากับ 78.25 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และเหง้าเปราะโคราชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติพบปริมาณฟีนอลิกน้อยที่สุดเท่ากับ 62.56 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ (ตาราง 5)

4.6.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

เมื่อนำสารสกัดจากใบและเหง้าของเปราะโคราชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติและใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมน สกัดด้วยโซเดียมไนไตรท์ ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยใช้รูทินเป็นสารมาตรฐาน ตามวิธีของ Jia *et al*. (1999) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดคำนวณจากกราฟมาตรฐานรูทิน y เท่ากับ 0.0011x + 0.0059 และมีค่าสหสัมพันธ์ ($r^2$) เท่ากับ 0.9933 ดังแสดงในตารางภาคผนวก และภาพภาคผนวก พบว่าสารสกัดจากชิ้นส่วนใบของเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองมีปริมาณของสารประกอบฟลาโวนอยด์มากที่สุดเท่ากับ 15.73 มิลลิกรัมสมมูลรูทินต่อกรัมน้ำหนักแห้ง รองลงมาพบปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ในใบที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติเท่ากับ 15.20 มิลลิกรัมสมมูลรูทินต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และเหง้าเปราะโคราชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติพบปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์น้อยที่สุดเท่ากับ 12.60 มิลลิกรัมสมมูลรูทินต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ (ตาราง 5)

4.6.3 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay

เมื่อนำสารสกัดใบและเหง้าของเปราะโคราชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ และใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมน ที่สกัดด้วยเมทานอล ความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ วิเคราะห์ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระโดยเทียบการสารมาตรฐานโทรล็อกซ์ โดยใช้สมการเชิงเส้น y เท่ากับ 0.549x + 1.1463 และมีค่าสหสัมพันธ์ ($r^2$) เท่ากับ 0.9997 ดังแสดงในตารางภาคผนวก และภาพภาคผนวก วิเคราะห์ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay ตามวิธีของ Kubola & Siriamornpun (2011) พบว่าสารสกัดชิ้นส่วนจากใบของเปราะโคราชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุดเท่ากับ 8.18 มิลลิกรัมสมมูลโทรลอกซ์ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และมีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระสูงสุดเท่ากับ 46.04 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือชิ้นส่วนใบที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองพบมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 7.81 มิลลิกรัมสมมูลโทรลอกซ์ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระเท่ากับ 44.00 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าเหง้าของเปราะโคราชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน้อยที่สุดเท่ากับ 4.05 มิลลิกรัมสมมูลโทรลอกซ์ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และมีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระน้อยที่สุด 23.38 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตาราง 6)

4.6.4 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay

เมื่อนำสารสกัดจากใบและเหง้าของเปราะโคราชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ และใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมน ที่สกัดด้วยเมทานอล ความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ วิเคราะห์ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระโดยเทียบการสารมาตรฐานเฟอร์รัสซัลเฟต (โดยใช้สมการเชิงเส้น y เท่ากับ 0.0005x - 0.0143 และมีค่าสหสัมพันธ์ ($r^2$) เท่ากับ 0.9888 ดังแสดงในตารางภาคผนวก และภาพภาคผนวก วิเคราะห์ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay ตามวิธีของ Kubola & Siriamornpun (2011) พบว่าสารสกัดจากชิ้นส่วนใบของเปราะโคราชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุดเท่ากับ 28.97 มิลลิกรัมสมมูลเฟอร์รัสซัลเฟตต่อกรัมน้ำหนักแห้ง รองลงมาคือชิ้นส่วนใบที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 28.18 มิลลิกรัมสมมูลเฟอร์รัสซัลเฟตต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และพบว่าเหง้าของเปราะโคราชในสภาพธรรมชาติมีฤทธิ์ในการต้านอนมูลอิสระน้อยที่สุดเท่ากับ 14.95 มิลลิกรัมสมมูลเฟอร์รัสซัลเฟตต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ (ตาราง 6)

**ตาราง 5** วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในชิ้นส่วนเปราะโคราชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ และเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง

| ชิ้นส่วนของเปราะโคราช | | TPC (mg GAE/g Dw) | TFC (mg RE/g Dw) |
|---|---|---|---|
| สภาพธรรมชาติ | ใบ | 78.25±0.64[b] | 15.20±0.11[a] |
| | เหง้า | 62.56±0.23[c] | 12.60±0.30[b] |
| เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ | ใบ | 107.21±1.41[a] | 15.73±0.20[a] |

**หมายเหตุ:** - ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย±ค่าเฉลี่ยเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±SE) อักษรที่แตกต่างกันทางแนวตั้งมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ DMRT

**ตาราง 6** การเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP assay

| ชิ้นส่วนของเปราะโคราช | | DPPH (mg TE/g Dw) | %Inhibition (%) | FRAP (mg $FeSO_4$/g Dw) |
|---|---|---|---|---|
| สภาพธรรมชาติ | ใบ | 8.18±0.41[a] | 46.04±2.23[a] | 28.97±1.17[a] |
| | เหง้า | 4.05±0.23[b] | 23.38±1.25[b] | 14.95±0.82[b] |
| เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ | ใบ | 7.81±0.40[a] | 44.00±2.20[a] | 28.18±0.95[a] |

**หมายเหตุ:** - ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย±ค่าเฉลี่ยเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±SE) อักษรที่แตกต่างกันทางแนวตั้งมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ DMRT

พหุน ปณฺ ฑิโต ชีเว

จากการวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของ DPPH assay มีความสัมพันธ์กันในเชิงบวก เมื่อเปรียบเทียบกับเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ (% inhibition) มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 1.00 อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบค่าสหสัมพันธ์ระหว่าง DPPH กับ FRAP มีค่าเท่ากับ 0.910 ซึ่งมีความสัมพันธ์กันในเชิงบวก อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ และจากการวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของฟีนอลิกทั้งหมดกับปริมาณของฟลาโวนอยด์ทั้งหมด พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.839 มีความสัมพันธ์กันในเชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ (ตาราง 7)

**ตาราง 7** การวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่าง TPC, TFC, DPPH, % inhibition และ FRAP

| | correlations | TPC | TFC | DPPH | inhibition | FRAP |
|---|---|---|---|---|---|---|
| DPPH | Pearson Correlation | 0.684* | 0.906** | 1 | 1.000** | 0.910** |
| | Sig. (2-tailed) | 0.042 | 0.001 | | 0.000 | 0.001 |
| | N | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 |
| % Inhibition | Pearson Correlation | 0.684* | 0.906** | 1.000** | 1 | 0.910** |
| | Sig. (2-tailed) | 0.042 | 0.001 | 0.000 | | 0.001 |
| | N | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 |
| FRAP | Pearson Correlation | 0.722* | 0.950** | 0.910** | 0.910** | 1 |
| | Sig. (2-tailed) | 0.028 | 0.000 | 0.001 | 0.001 | |
| | N | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 |
| TPC | Pearson Correlation | 1 | 0.839** | 0.684* | 0.684* | 0.722* |
| | Sig. (2-tailed) | | 0.005 | 0.042 | 0.042 | 0.028 |
| | N | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 |
| TFC | Pearson Correlation | 0.839** | 1 | 0.906** | 0.906** | 0.950** |
| | Sig. (2-tailed) | 0.005 | | 0.001 | 0.001 | 0.000 |
| | **N** | **9** | **9** | **9** | **9** | **9** |

** ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01 (2-tailed)

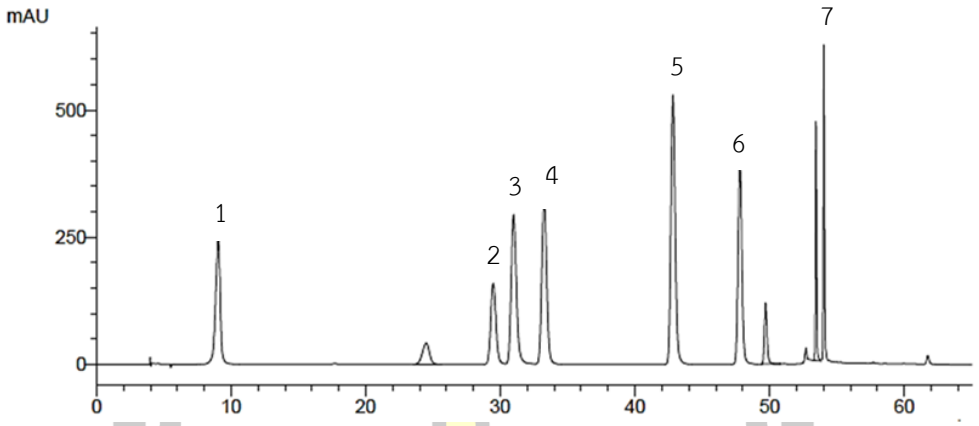
* ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 (2-tailed)

**4.7 ศึกษาองค์ประกอบทางพฤกษเคมีของเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง และที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ ด้วยเทคนิคเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง และแก๊สโครมาโทกราฟี – แมสสเปกโทรเมทรี (GC-MS)**

4.7.1 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกและสารประกอบฟลาโวนอยด์ของเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองและที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

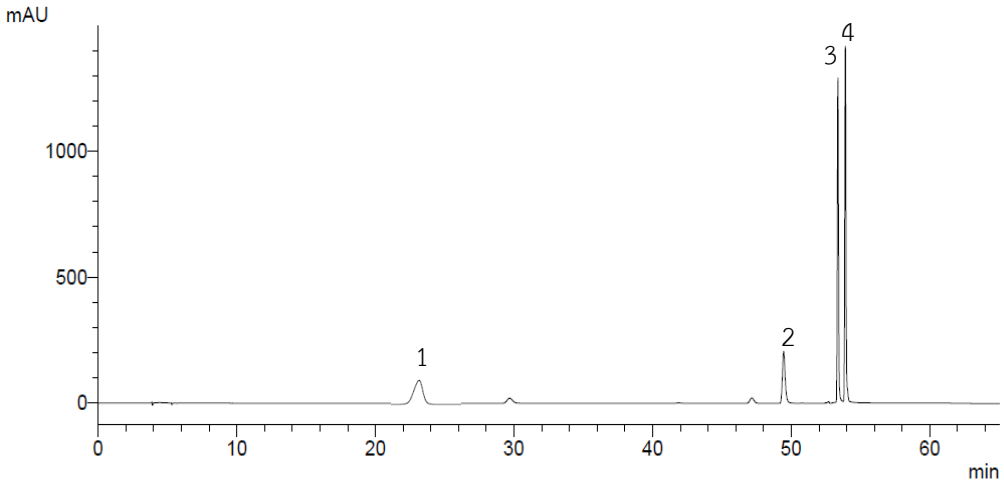
เมื่อนำใบและเหง้าของเปราะโคราชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ เปรียบเทียบกับใบของเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมน มาวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและสารประกอบฟลาโวนอยด์ด้วยวิธีสารมาตรฐานภายนอก (external standard) โดยใช้กราฟมาตรฐานจากสารประกอบฟีนอลิกรวม 7 ชนิด ได้แก่ กรดแกลลิก (gallic acid) กรดวานิลลิก (vanillic acid) กรดคาเฟอิก (caffeic acid) กรดคูมาริก (*p*-coumaric acid) กรดเฟอรูลิก (ferulic acid) กรดไซรินจิก (syringic acid) และกรดซินนามิก (cinnamic acid) สารมาตรฐานฟลาโวนอยด์ทั้งหมด 4 ชนิด ได้แก่ รูทิน (rutin) แคมพ์เฟอรอล (kaempferol) เคอร์ซิติน (quercetin) และคาเทชิน (catechin) ตรวจวัดแบบ PDA detector (photodiode array detector) โดยสารประกอบฟีนอลิกตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 280 และ 320 นาโนเมตร และสารประกอบฟลาโวนอยด์ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 370 นาโนเมตรได้โครมาโทรแกรมของสารมาตรฐานแสดงค่าเวลาคงค้าง (retention time, RT) ของสารมาตรฐานแต่ละชนิด ดังแสดงในภาพ 9 และ 10

พหุน ปณฺฑิโต ชีเว




**ภาพที่ 9** โครมาโทรแกรมของสารมาตรฐานเวลาคงค้าง (retention time, RT) ของสารมาตรฐานสารประกอบฟีนอลิก

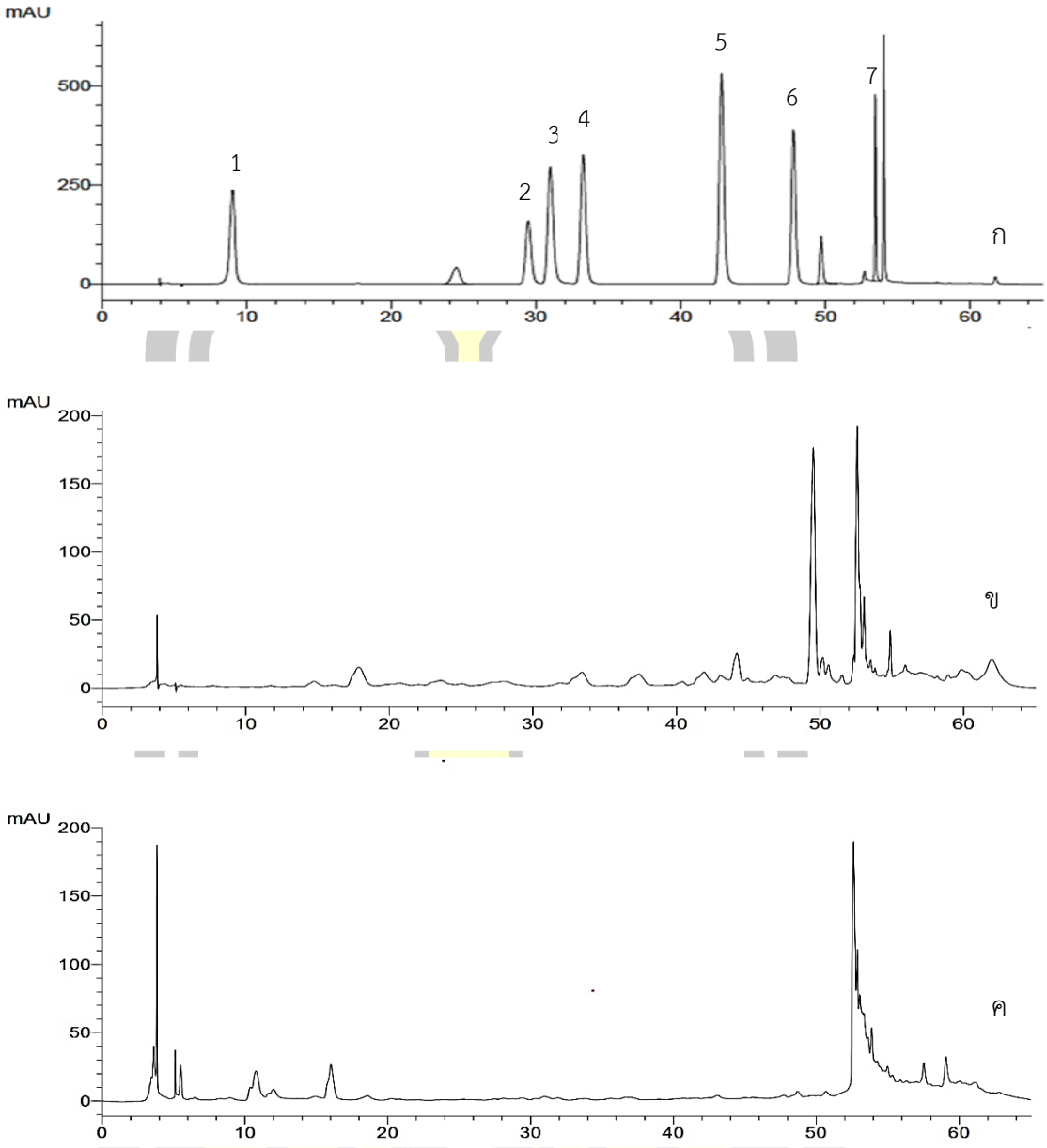
(1) gallic acid (2) vanillic acid (3) caffeic acid (4) syringic acid (5) p-coumaric acid (6) ferulic acid (7) cinnamic acid




**ภาพที่ 10** โครมาโทรแกรมของสารมาตรฐานเวลาคงค้าง (retention time, RT) ของสารมาตรฐานสารประกอบฟลาโวนอยด์

(1) rutin (2) kaempferol (3) quercetin (4) catechin

จากการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกในตัวอย่างใบและเหง้าเปราะโคราชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ และใบเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมน โดยอ้างอิงค่าเวลาคงค้างของสารมาตรฐานสารประกอบฟีนอลิกทั้ง 7 ชนิด พบว่า ใบของเปราะโคราชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ มีสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด 6 ชนิด ได้แก่ กรดแกลลิก กรดวานิลลิก กรดชินนามิก กรดคาเฟอิก กรดเฟอรูลิก และกรดคูมาริก ซึ่งไม่พบกรดไซรินจิก มีปริมาณฟีนอลิกรวมเท่ากับ 560.90 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และมีปริมาณกรดคาเฟอิกมากที่สุดเท่ากับ 413.39 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง รองลงมาคือกรดแกลลิก 78.22 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง พบปริมาณกรดวานิลลิกน้อยที่สุด 1.82 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ชิ้นส่วนของเหง้าเปราะโคราชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ พบกรดฟีนอลิกทั้งหมด 7 ชนิด ได้แก่ กรดแกลลิก กรดวานิลลิก กรดชินนามิก กรดคาเฟอิก กรดไซรินจิก กรดเฟอรูลิก และกรดคูมาริก มีปริมาณฟีนอลิกรวมเท่ากับ 139.69 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และพบกรดแกลลิกมากที่สุดเท่ากับ 28.70 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง รองลงมาคือกรดชินนามิก 24.88 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง พบปริมาณกรดคาเฟอิกน้อยที่สุด 3.05 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ดังแสดงในตาราง 9 ชิ้นส่วนของใบเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง บนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมน มีสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด 7 ชนิด ได้แก่ กรดแกลลิก กรดวานิลลิก กรดชินนามิก กรดคาเฟอิก กรดไซรินจิก กรดเฟอรูลิก และกรดคูมา มีปริมาณฟีนอลิกรวมเท่ากับ 8,046.74 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และมีปริมาณกรดไซรินจิกมากที่สุดเท่ากับ 6,126.67 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง รองลงมาคือกรดคาเฟอิก 1,470.48 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง พบปริมาณกรดชินนามิกน้อยที่สุด 15.03 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง จากการเปรียบเทียบชิ้นส่วนใบและเหง้าของเปราะโคราชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ และชิ้นส่วนใบของเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง บนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมน พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT (ภาพ 11 และตาราง 9)



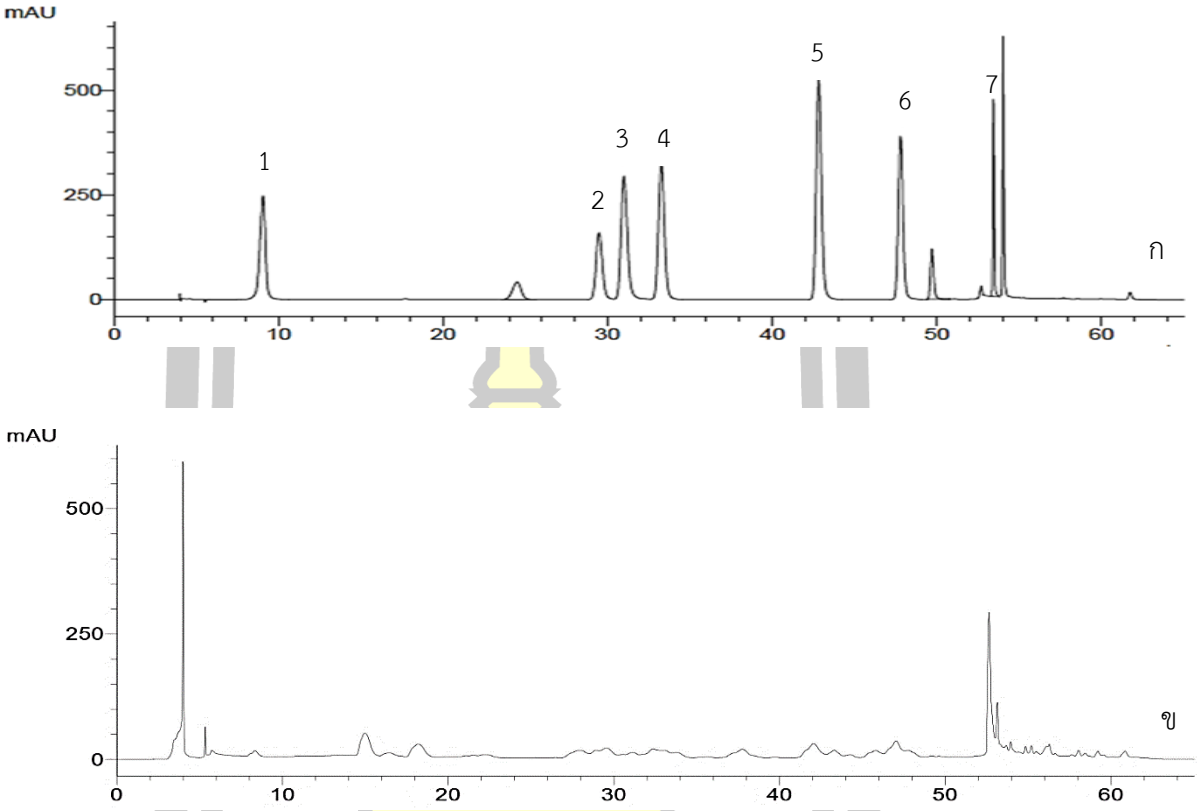

**ภาพที่ 11** โครมาโทรแกรมแสดงค่าเวลาคงค้างของเปราะโคราชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ

(ก) โครมาโทรแกรมสารมาตรฐานสารประกอบฟีนอลิก

(ข) โครมาโทรแกรมตัวอย่างใบ

(ค) โครมาโทรแกรมตัวอย่างเหง้า

(1) gallic acid (2) vanillic acid (3) caffeic acid (4) syringic acid (5) p-coumaric acid (6) ferulic acid (7) cinnamic acid




**ภาพที่ 12** โครมาโทรแกรมแสดงค่าเวลาคงค้างของเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมน

(ก) โครมาโทรแกรมสารมาตรฐานสารประกอบฟีนอลิก

(ข) โครมาโทรแกรมตัวอย่างใบ

(1) gallic acid (2) vanillic acid (3) caffeic acid (4) syringic acid (5) p-coumaric acid (6) ferulic acid (7) cinnamic acid

**ตาราง 8** ชนิดและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกจากชิ้นส่วนต่าง ๆ ของเปราะโคราชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ และเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมน วิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

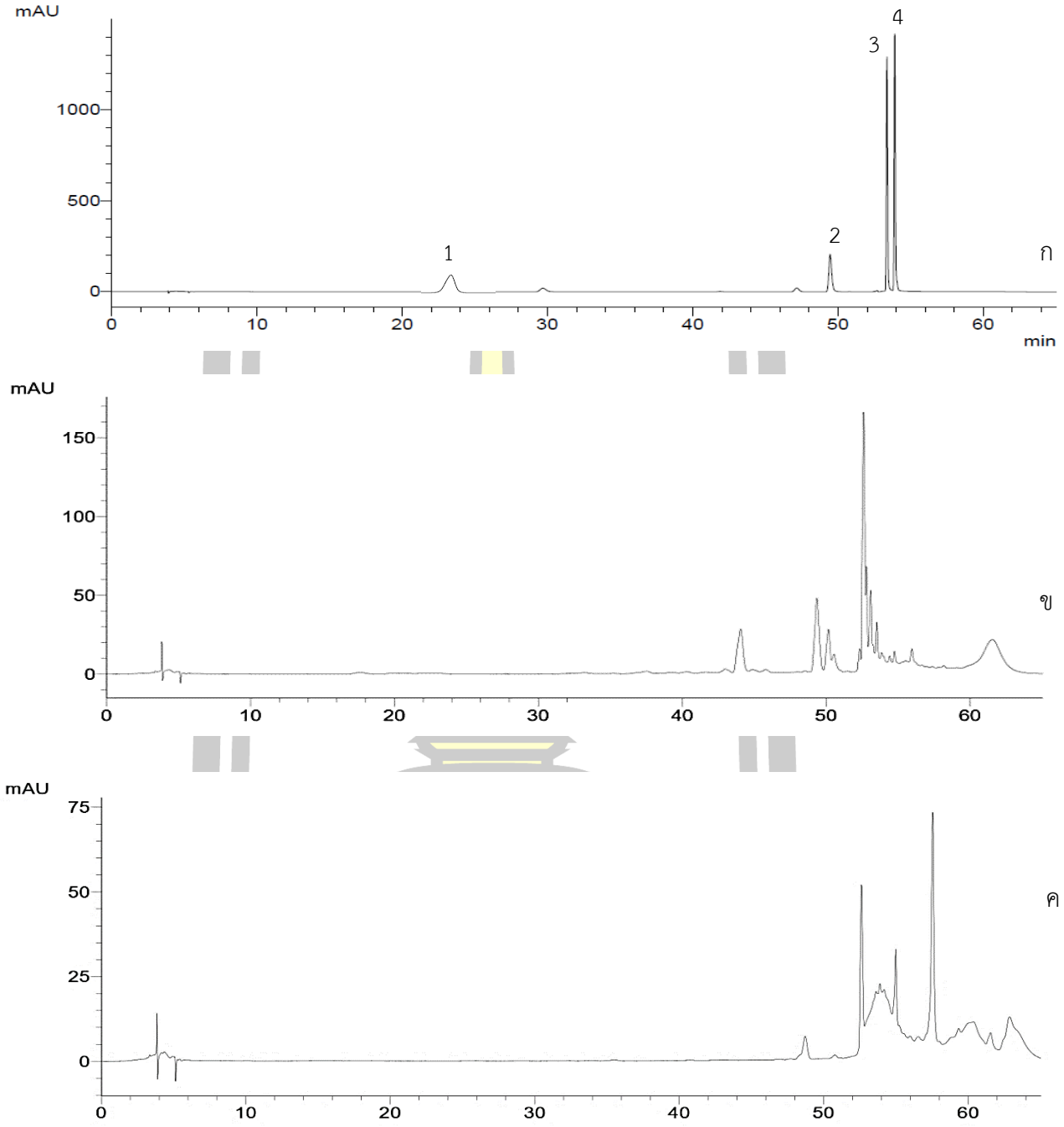
ปริมาณสารประกอบสารประกอบฟีนอลิกจากชิ้นส่วนต่าง ๆ เปราะโคราชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติและที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง (ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)

| สภาวะที่เจริญเติบโต | ชิ้นส่วนพืช | Gallic acid | Vanillic acid | Cinnamic acid | Caffeic acid | Syringic acid | Ferulic acid | *p*-coumaric acid | ปริมาณรวม |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| สภาพธรรมชาติ | ใบ | 78.22±0.71$^{b}$ | 1.82±0.03$^{c}$ | 8.86±0.13$^{c}$ | 413.39±2.12$^{b}$ | ND | 28.89±0.50$^{b}$ | 29.72±0.71$^{b}$ | 560.90 |
| | เหง้า | 28.70±0.08$^{c}$ | 16.21±0.72$^{b}$ | 24.88±1.22$^{a}$ | 3.05±0.00$^{c}$ | 35.00±0.00$^{b}$ | 20.07±0.00$^{c}$ | 11.78±0.04$^{c}$ | 139.69 |
| เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ | ใบ | 169.80±0.57$^{a}$ | 138.77±1.86$^{a}$ | 15.03±1.11$^{b}$ | 1,470.48±2.25$^{a}$ | 6,126.67±4.60$^{a}$ | 70.25±0.27$^{a}$ | 55.74±0.17$^{a}$ | 8,046.74 |

**หมายเหตุ ND** = ตรวจไม่พบ ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย±ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (mean±SE) ที่ได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ อักษรที่แตกต่างกันทางแนวตั้งมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

จากการวิเคราะห์และปริมาณของสารประกอบฟลาโวนอยด์ของเปราะโคราช โดยอ้างอิงจากค่าเวลาคงค้างของสารมาตรฐานสารประกอบฟลาโวนอยด์ 4 ชนิด พบว่าใบของเปราะโคราชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ ตรวจพบสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่ รูทิน แคมพ์เฟอรอล และเคอร์ซิติน ตรวจไม่พบคาเทชิน มีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมเท่ากับ 138.01 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และมีปริมาณรูทินมากที่สุดเท่ากับ 93.02 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง รองลงมาคือเคอร์ซิติน 34.42 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง พบปริมาณแคมพ์เฟอรอลน้อยที่สุด 10.57 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ชิ้นส่วนเหง้าของเปราะโคราชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ ตรวจพบสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด 2 ชนิด ได้แก่ แคมพ์เฟอรอล และเคอร์ซิติน ตรวจไม่พบ รูทิน และคาเทชิน มีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมเท่ากับ 122.76 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และมีปริมาณเคอร์ซิตินมากที่สุดเท่ากับ 94.19 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง รองลงมาคือแคมเฟอรอล 28.57 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ใบของเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง บนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมน ตรวจพบสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่ รูทิน แคมพ์เฟอรอล และเคอร์ซิติน ตรวจไม่พบคาเทชิน และมีปริมาณแคมพ์เฟอรอลมากที่สุดเท่ากับ 49.33 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง รองลงมาคือเคอร์ซิติน 42.95 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง พบรูทินน้อยที่สุด 5.92 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง จากการเปรียบเทียบชิ้นส่วนใบและเหง้าเปราะโคราชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ และใบเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง บนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมน พบว่าปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT (ภาพ 11 และตาราง 9)

พหุน ปณฺฑิโต ชีเว



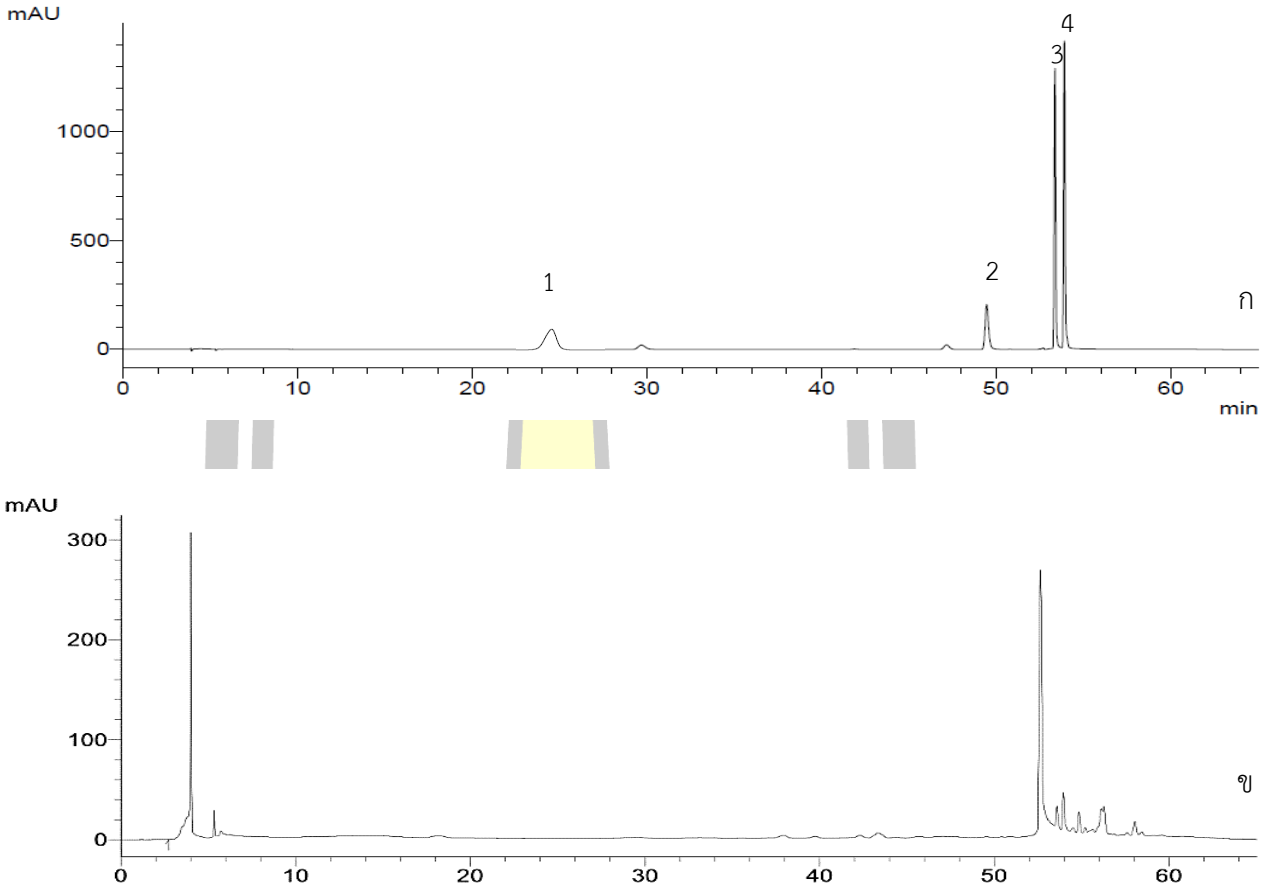

**ภาพที่ 13** โครมาโทรแกรมแสดงค่าเวลาคงค้างเปราะโคราชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ

(ก) โครมาโทรแกรมสารมาตรฐานสารประกอบฟลาโวนอยด์

(ข) โครมาโทรแกรมตัวอย่างใบ

(ค) โครมาโทรแกรมตัวอย่างเหง้า

(1) คาเทชิน (2) รูทิน (3) เคอร์ซิติน และ (4) แคมพ์เฟอรอล




**ภาพที่ 14** โครมาโทรแกรมแสดงค่าเวลาคงค้างใบเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง บนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมน

(ก) โครมาโทรแกรมสารมาตรฐานสารประกอบฟลาโวนอยด์

(ข) โครมาโทรแกรมตัวอย่างใบ

(1) คาเทชิน (2) รูทิน (3) เคอร์ซิติน และ (4) แคมพ์เฟอรอล

**ตาราง 9** ชนิดและปริมาณของสารประกอบฟลาโวนอยด์จากชิ้นส่วนต่าง ๆ ของเปราะโคราชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ และเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง บนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมนวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์จากชิ้นส่วนต่าง ๆ เปราะโคราชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติและที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง (ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)

| สภาวะที่เจริญเติบโต | ชิ้นส่วนพืช | Rutin | Kaempferol | Catechin | Quercetin | ปริมาณรวม |
|---|---|---|---|---|---|---|
| สภาพธรรมชาติ | ใบ | 93.02±0.89[a] | 10.57±0.64[c] | ND | 34.42±0.87[c] | 138.01 |
| | เหง้า | ND | 28.57±0.53[b] | ND | 94.19±1.97[a] | 122.76 |
| เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ | ใบ | 5.92±0.09[b] | 49.33±0.79[a] | ND | 42.95±0.23[b] | 98.20 |

**หมายเหตุ ND** = ตรวจไม่พบ ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย±ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (mean±SE) ที่ได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ อักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

4.7.2 ศึกษาองค์ประกอบทางพฤกษเคมีของเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองและที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี – แมสสเปกโทรเมทรี

นำใบและเหง้าเปราะโคราชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ ใบเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ไม่เติมฮอร์โมน มาวิเคราะห์สารพฤกษเคมีด้วยเทคนิค GC-MS พบว่าสารสกัดจากใบและเหง้าของเปราะโคราชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ และสารสกัดจากใบของเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองสามารถระบุสารสำคัญได้ทั้งหมด 11, 12 และ 7 ชนิด ตามลำดับ และมีค่าร้อยละของพื้นที่ใต้พีกสัมพัทธ์ 100 เปอร์เซ็นต์ทั้งหมด สารประกอบที่พบในใบของเปราะโคราชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ สามารถระบุได้มี 11 ชนิด ได้แก่ bicyclo [3.1.1] heptane, 6,6-dimethyl-2-methylene-, (1s)- มีค่าร้อยละของพื้นที่ใต้พีกสัมพัทธ์มากที่สุด 60.92 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ butanal, 2-methyl- มีค่าร้อยละของพื้นที่ใต้พีกสัมพัทธ์เท่ากับ 12.88 เปอร์เซ็นต์ eucalyptol 7.50 เปอร์เซ็นต์, caryophyllene 5.32 เปอร์เซ็นต์, d-Limonene 3.87 เปอร์เซ็นต์, 1h-Indene, 2,3-dihydro-1,1,3-trimethyl-3-phenyl- 3.37เปอร์เซ็นต์ camphene 2.53 เปอร์เซ็นต์, 2,4-di-tert-butylphenol 1.58 เปอร์เซ็นต์, bicyclo[3.1.0] hexane, 4-methylene-1-(1-methylethyl)- 1.27 เปอร์เซ็นต์, naphthalene,1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydro-4a,8-dimethyl-2-(1-methylethenyl) 0.97 เปอร์เซ็นต์ และ copaene 0.42 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สารประกอบที่พบในเหง้าของเปราะโคราชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ สามารถระบุได้ 12 ชนิด ดังนี้ camphene มีค่าร้อยละของพื้นที่ใต้พีกสัมพัทธ์มากที่สุด 50.73 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ alpha.-pinene มีค่าร้อยละของพื้นที่ใต้พีกสัมพัทธ์เท่ากับ 15.62 เปอร์เซ็นต์, 3-carene 8.76 เปอร์เซ็นต์, dehydroisoandrosterone acetate 8.61 เปอร์เซ็นต์, bicyclo[3.1.1]heptane, 6,6-dimethyl-2-methylene-, (1S) 6.14 เปอร์เซ็นต์, eucalyptol 3.88 เปอร์เซ็นต์, 3h-3a,7-methanoazulene, 2,4,5,6,7,8-hexahydro-1,4,9,9-tetramethyl-, 1.84 เปอร์เซ็นต์, tricyclo[2.2.1.0(2,6)]heptane, 1,7,7-trimethyl- 1.56 เปอร์เซ็นต์, butanal, 2-methyl- 1.13 เปอร์เซ็นต์, bicyclo[2.2.1]heptan-2-one, 1,7,7-trimethyl-, (1s)- 0.70 เปอร์เซ็นต์, 1h-cycloprop[e]azulene, 1a,2,3,4,4a,5,6,7b-octahydro-1,1,4,7-tetramethyl 0.66 เปอร์เซ็นต์ และ germacrene D 0.36 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และสารประกอบที่พบในใบของเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง สามารถระบุได้ 7 ชนิด ดังนี้ caryophyllene มีค่าร้อยละของพื้นที่ใต้พีกสัมพัทธ์มากที่สุด 57.39 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ butanal, 2-methyl- มีค่าร้อยละของพื้นที่ใต้พีกสัมพัทธ์เท่ากับ 29.18 เปอร์เซ็นต์, 3h-3a,7-methanoazulene,2,4,5,6,7,8-

hexahydro-1,4,9,9-tetramethyl-, 2.88 เปอร์เซ็นต์, alpha.-pinene 1.89 เปอร์เซ็นต์, camphene 1.85 เปอร์เซ็นต์, bicyclo[3.1.1]heptane, 6,6-dimethyl-2-methylene-, (1S) 1.62 เปอร์เซ็นต์ และ 1h-cycloprop[e]azulene, 1a,2,3,4,4a,5,6,7b-octahydro-1,1,4,7-tetramethyl 1.28 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตาราง 10)

พหุน ปณ ฑิโต ชีเว

**ตาราง 10** องค์ประกอบทางเคมีจากใบและเหง้าของเปราะโคราชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติและเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง

| ลำดับ | ชื่อสารประกอบ | RT | สูตรโมเลกุล | น้ำหนักมวลโมเลกุล (g/mol) | ร้อยละพื้นที่ใต้พีกสัมพัทธ์ | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | พืชในสภาพธรรมชาติ | | พืชที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง |
| | | | | | ใบ | เหง้า | ใบ |
| 1 | butanal., 2-methyl- | 2.595 | $C_5H_{10}O$ | 86 | 12.88 | 1.13 | 29.18 |
| 2 | tricyclo[2.2.1.0(2,6)]heptane, 1,7,7-trimethyl- | 8.114 | $C_{10}H_{16}$ | 136 | - | 1.56 | - |
| 3 | alpha.-pinene | 8.477 | $C_{10}H_{16}$ | 136 | - | 15.62 | 1.89 |
| 4 | camphene | 8.920 | $C_{10}H_{16}$ | 136 | 2.53 | 50.73 | 1.85 |
| 5 | bicyclo[3.1.0]hexane, 4-methylene-1-(1-methylethyl)- | 9.705 | $C_{10}H_{16}$ | 136 | 1.27 | - | - |
| 6 | bicyclo[3.1.1]heptane, 6,6-dimethyl-2-methylene-, (1S) | 9.779 | $C_{10}H_{16}$ | 136 | 60.29 | 6.14 | 1.62 |
| 7 | 3-carene | 10.839 | $C_{10}H_{16}$ | 136 | | 8.76 | - |
| 8 | D-limonene | 11.429 | $C_{10}H_{16}$ | 136 | 3.87 | - | - |
| 9 | eucalyptol | 11.495 | $C_{10}H_{18}O$ | 154 | 7.50 | 3.88 | - |
| 10 | bicyclo[2.2.1]heptan-2-one, 1,7,7-trimethyl-, (1S)- | 15.084 | $C_{10}H_{16}O$ | 152 | - | 0.70 | - |
| 11 | 3h-3a,7-methanoazulene, 2,4,5,6,7,8-hexahydro-1,4,9,9-tetramethyl-, | 22.889 | $C_{15}H_{24}$ | 204 | - | 1.84 | 2.88 |
| 12 | copaene | 22.207 | $C_{15}H_{24}$ | 204 | 0.42 | - | - |
| 13 | caryophyllene | 23.407 | $C_{15}H_{24}$ | 204 | 5.32 | - | 57.39 |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 14 | 1h-cycloprop[e]azulene, 1a,2,3,4,4a,5,6,7b-octahydro-1,1,4,7-tetramethyl | 23.149 | $C_{15}H_{24}$ | 204 | | 0.66 | 1.28 |
| 15 | germacrene D | 25.058 | $C_{15}H_{24}$ | 204 | | 0.36 | |
| 16 | naphthalene, 1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydro-4a,8-dimethyl-2-(1-methylethenyl) | 25.413 | $C_{15}H_{24}$ | 204 | 0.97 | - | - |
| 17 | 2,4-di-tert-butylphenol | 25.847 | $C_{14}H_{22}O$ | 206 | 1.58 | - | - |
| 18 | 1h-Indene, 2,3-dihydro-1,1,3-trimethyl-3-phenyl- | 30.613 | $C_{18}H_{20}$ | 236 | 3.37 | - | - |
| 19 | dehydroisoandrosterone acetate | 41.840 | $C_{21}H_{30}O_3$ | 331 | - | 8.61 | - |
| | | รวม | | | 11 | 12 | 7 |

พหุน ปณ ฑิโต ชีเว

# บทที่ 5
# สรุป และอภิปรายผลการทดลอง

1. ผลของฮอร์โมน BA, BA ร่วมกับ NAA และ BA ร่วมกับ TDZ และ NAA ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดและรากในเปราะโคราชเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง

จากการนำต้นอ่อนเปราะโคราชมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ความเข้มข้นแตกต่างกัน พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน BA, BA ร่วมกับ NAA และ BA ร่วมกับ TDZ และ NAA ความเข้มข้นแตกต่างกัน พบว่าอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เติมเฉพาะฮอร์โมน BA สามารถชักให้เกิดยอดเฉลี่ย 3.10 ยอด/ชิ้นส่วนพืช มากกว่าอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ไม่เติมฮอร์โมน เนื่องจากฮอร์โมน BA เป็นฮอร์โมนในกลุ่มไซโทไคนินมีคุณสมบัติในการแบ่งเซลล์ของพืช ช่วยสร้างอวัยวะ การเพิ่มขนาดของเซลล์และอวัยวะ กระตุ้นการแตกตาข้าง เมื่อนำฮอร์โมน BA มาใช้ร่วมกับฮอร์โมน NAA พบว่าอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เติมฮอร์โมน BA ความเข้มข้น 4 มก./ล. ร่วมกับ NAA 0.2 มก./ล. สามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ย 4.00 ยอด/ชิ้นส่วนพืช และชักนำให้เกิดรากเฉลี่ยสูงสุด 8.60 ราก/ชิ้นส่วนพืช พืชมีลักษณะต้นโต ใบขนาดใหญ่แผ่กว้าง สีเขียวเข้ม รากมีขนาดใหญ่ สีเขียวเข้ม แตกต่างจากจิราภรณ์ ผุดผ่อง และคณะ (2558) เพาะเลี้ยงเปราะราศี (*Kaempferia larsenii*) บนอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน IAA ความเข้มข้น 0.5 มก./ล. สามารถชักนำให้เกิดรากเฉลี่ยสูงสุด 10.60 ราก/ชิ้นส่วนพืช เนื่องจากฮอร์โมน NAA เป็นฮอร์โมนในกลุ่มออกซินมีคุณสมบัติช่วยในการขยายขนาดของเซลล์ และการชักนำให้เกิดราก เมื่อนำฮอร์โมนชนิดนี้มาใช้ร่วมกับฮอร์โมน BA จึงสามารถช่วยชักนำให้เกิดยอดและรากของเปราะโคราชได้ดียิ่งขึ้น (ทวีศักดิ์ แสงอุดม, 2559) เมื่อนำต้นอ่อนเปราะโคราชมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน BA ความเข้มข้น 2 มก./ล. ร่วมกับ TDZ 3 มก./ล. และ NAA 0.2 มก./ล. สามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ยสูงสุด 4.60 ยอด/ชิ้นส่วนพืช แตกต่างจาก Mohanty *et al.* (2011) เพาะเลี้ยง *K. galanga* บนอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน BA 1 มก./ล. ร่วมกับ IAA 0.5 มก./ล. พบอัตราการเกิดยอดสูงสุด 11.50 ยอด/ชิ้นส่วนพืช แตกต่างจากงานวิจัยของ Parida *et al.* (2011) เพาะเลี้ยงตาเหง้า*ของ K. galanga* บนอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน BA 1 มก./ล. ร่วมกับ IAA 0.5 มก./ล. ชักนำให้เกิดยอดสูงสุด 10.10 ยอด/ชิ้นส่วนพืช เนื่องจากฮอร์โมน TDZ มีผลในการชักนำให้เกิดยอด ตาดอก แคลลัส และโซมาติกเอ็มบริโอ การออกฤทธิ์ของฮอร์โมน TDZ มีผลช่วยส่งเสริมประสิทธิภาพของฮอร์โมนออกซินและไซโทไคนินภายในเซลล์พืชให้สูงขึ้น เมื่อนำฮอร์โมนชนิดนี้มาใช้ร่วมกับฮอร์โมน BA และ NAA สามารถช่วยส่งเสริมให้มีการชักนำให้เกิดยอดเป็นจำนวนมาก อย่างไรก็ตามลักษณะของต้นพืชที่ได้จะมีขนาดเล็ก ต้นและใบมีความสูงไม่มาก ใบสีเขียวอ่อน มียอดจำนวนมาก (วราภรณ์ อำพันกาญจน์, 2552) และจากการ

ทดลองพบว่าการใช้ฮอร์โมน TDZ ร่วมด้วยในความเข้มข้นที่สูงขึ้นมีการยับยั้งการเจริญของต้นพืชอีกด้วย

2. ผลของฮอร์โมน BA ร่วมกับ Kinetin และ NAA ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดและรากเปราะโคราชเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง

เมื่อนำชิ้นส่วนยอดเปราะโคราชมาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติมฮอร์โมน BA ความเข้มข้น 4 มก./ล. ร่วมกับ Kinetin 4 มก./ล. และ NAA 0.2 มก./ล. มีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 3.40 ยอด/ชิ้นส่วนพืช ต้นพืชมีลักษณะเล็ก ใบเรียวแหลม สีเขียวเข้ม มียอดจำนวนมาก มีการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนยอดดีกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมฮอร์โมน BA เพียงอย่างเดียว เนื่องจากฮอร์โมน BA และ Kinetin เป็นฮอร์โมนในกลุ่มไซโทไคนิน มีหน้าที่ในการกระตุ้นการแบ่งเซลล์ของพืช การสร้างอวัยวะ การเจริญของคลอโรพลาสต์ (chloroplast) การพัฒนาของตา และส่งเสริมการเจริญของเนื้อเยื่อ เมื่อนำมาใช้ร่วมกับฮอร์โมน NAA ที่เป็นฮอร์โมนในกลุ่มออกซินช่วยกระตุ้นการเกิดและการเจริญของราก จึงทำให้ชิ้นส่วนเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงมีการชักนำให้เกิดยอดและรากเพิ่มมากขึ้น (ทวีศักดิ์ แสงอดุม, 2559) แตกต่างจาก Kean & Keng (2010) เพาะเลี้ยง *K. galanga* บนอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน BA ความเข้มข้น 5 มก./ล. สามารถชักนำให้เกิดยอดสูงสุด 7.40 ยอด/ชิ้นส่วนพืช และมีจำนวนรากสูงสุด 31.3 ราก/ชิ้นส่วนพืช Geetha *et al.* (1997) นำหน่ออ่อนของ *K. galanga* และ *K. rotunda* มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน Kinetin ความเข้มข้น 0.5 มก./ล. พบว่ามีการชักนำให้เกิดยอด 7 ยอด/ชิ้นส่วนพืช และราก 5 ราก/ชิ้นส่วนพืช ชิ้นส่วนยอดเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมฮอร์โมน BA ซึ่งเป็นฮอร์โมนในกลุ่มไซโทไคนินมีการชักนำให้เกิดยอดได้ดี จะสังเกตเห็นว่าการใช้ฮอร์โมน BA ร่วมกับ Kinetin และ NAA ความเข้มข้นต่ำ ต้นพืชจะมีลักษณะต้นใหญ่ ใบมีขนาดใหญ่มากกว่าเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน BA ร่วมกับ Kinetin และ NAA ความเข้มข้นสูง ต้นพืชมีลักษณะต้นเล็ก ใบเล็กเรียวแหลม และรากมีขนาดสั้น จำนวนน้อย แต่อย่างไรก็ตามอัตราส่วนของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ระยะการพัฒนา และสายพันธุ์พืช

3. ผลร่วมระหว่างฮอร์โมนออกซินและไซโทไคนินที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดและรากเปราะโคราชเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว

เมื่อนำต้นอ่อนเปราะโคราช มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน BA และ Kinetin ที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 2 มก./ล. ร่วมกับ TDZ 2 มก./ล. และ NAA 0.2 มก./ล. เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าต้นอ่อนเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน Kinetin ความเข้มข้น 1 มก./ล. ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 2 มก./ล. และ NAA ความเข้มข้น 0.2 มก./ล. มีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 6.00 ยอด/ชิ้นส่วนพืช และต้นอ่อนเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม BA, Kinetin ร่วมกับ TDZ และ NAA ทุกความเข้มข้นเกิดยอด 5.20-5.33

ยอด/ชิ้นส่วนพืช ซึ่งมีจำนวนยอดมากกว่าต้นอ่อนเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมฮอร์โมนที่เกิดยอด 4.10 ยอด/ชิ้นส่วนพืช เนื่องจากฮอร์โมน Kinetin เป็นฮอร์โมนในกลุ่มไซโทไคนิน มีคุณสมบัติในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของยอด การขยายขนาดของเซลล์ และการกระตุ้นการแบ่งเซลล์ แตกต่างจาก Rahman *et al.* (2005) เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของ *K. galanga* บนอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมนกลุ่มออกซิน (NAA, IBA และ IAA) ร่วมกับฮอร์โมนกลุ่มไซโทไคนิน (BA และ Kinetin) พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน BA ความเข้มข้น 1.0 มก./ล. ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.1 มก./ล. สามารถชักนำให้เกิดยอดสูงสุด 20.50 ยอด/ชิ้นส่วนพืช อาหารสูตร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมนมีความยาวยอดเฉลี่ยสูงสุด 9.08 ซม. ซึ่งมีความสูงมากกว่าต้นอ่อนเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมฮอร์โมนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เกิดยอดน้อยกว่าต้นอ่อนเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน BA ความเข้มข้น 1 มก./ล. ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 2 มก./ล. และ NAA ความเข้มข้น 0.2 มก./ล. มีจำนวนรากเฉลี่ยสูงสุด 7.40 ราก/ชิ้นส่วนพืช ลักษณะของรากมีสีเขียวเข้ม ขนาดใหญ่ แตกต่างจาก Chairangini *et al.* (2005) เพาะเลี้ยง *K. galanga* และ *K. rotunda* บนอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน NAA ความเข้มข้น 2.22 ไมโครโมล สามารถชักนำให้เกิดรากเฉลี่ยสูงสุด 9.00 ราก/ชิ้นส่วนพืช และกมลทิพย์ ไหลไผ่ทอง (2561) ศึกษาชิ้นส่วนยอดของ *K. parviflora* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเหลว เปรียบเทียบกับอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน BAP ความเข้มข้นแตกต่างกัน เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าอาหารเหลวสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน BAP ความเข้มข้น 3 มก./ล. สามารถชักนำให้เกิดยอดสูงสุด 6.30 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช มากกว่าอาหารแข็งที่สามารถชักนำให้เกิดยอด 3.23 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช ต้นอ่อนเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน Kinetin ความเข้มข้น 1 มก./ล. และ 2 มก./ล. ร่วมกับ TDZ 2 มก./ล. และ NAA 0.2 มก./ล. มีจำนวนรากเฉลี่ย 2.87 และ 2.33 ราก/ชิ้นส่วนพืช ตามลำดับ ซึ่งน้อยกว่ารากที่เกิดขึ้นจากการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรอื่น ๆ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโตพืช ชิ้นส่วนพืช ชนิดของพืช สายพันธุ์พืช และระยะการพัฒนา ซึ่งในการทดลองนี้จะเห็นได้ว่าเมื่อเพาะเลี้ยงต้นอ่อนเปราะโคราชในอาหารเหลวที่มีการเติมฮอร์โมน Kinetin และ BA ร่วมกับ TDZ 2 มก./ล. และ NAA 0.2 มก./ล. ส่งเสริมการเจริญของยอดได้ แต่อาหารเพาะเลี้ยงที่ใช้ฮอร์โมน Kinetin ร่วมกับ TDZ 2 มก./ล. และ NAA 0.2 มก./ล. เกิดรากค่อนข้างน้อย นอกจากนี้ในการทดลองครั้งนี้ต้นอ่อนเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวมีการเพิ่มจำนวนยอดและมีความยาวของยอดมากกว่าต้นอ่อนเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง ทั้งนี้อาจเนื่องจากต้นอ่อนเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ต้นอ่อนได้สัมผัสกับอาหารเท่าเทียมกัน ได้รับอากาศและแสงเท่ากัน ทำให้ต้นอ่อนดูดซับอาหารไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ดีกว่าส่งผลให้ต้นอ่อนเพิ่มจำนวนต้นและมีความสูงของต้นมากกว่าที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง และต้นอ่อนเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตในปริมาณสูง มีจำนวนรากลดลงและความยาวยอดสั้น

ลงเมื่อเทียบกับต้นอ่อนเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมน จากการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในปริมาณมากโดยเฉพาะฮอร์โมน TDZ อาจยับยั้งการเจริญของต้นพืชได้ เนื่องจากฮอร์โมน TDZ ส่งผลให้เกิดการสร้างฮอร์โมนเอทิลีน และการเพิ่มขึ้นของฮอร์โมน NAA ในต้นพืชได้เช่นกัน (วราภรณ์ อำพันกาญจน์, 2552)

4. การย้ายเปราะโคราชออกปลูกในเรือนเพาะชำ

จากการนำต้นอ่อนเปราะโคราชย้ายออกปลูกในวัสดุปลูกทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ ดินร่วน ดินทราย และดินร่วนผสมดินทราย พบว่าต้นอ่อนเปราะโคราชที่ย้ายออกปลูกในเรือนเพาะชำในวัสดุปลูกทั้ง 3 ประเภท มีอัตราการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ ต้นอ่อนเปราะโคราชที่ย้ายปลูกในดินร่วนผสมดินทรายมีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 1.70 ยอด/ต้น ซึ่งมากกว่าเมื่อต้นอ่อนเปราะโคราชย้ายออกปลูกในดินร่วนและดินทราย ที่มีจำนวนยอดเฉลี่ย 1.20 และ 1.10 ยอด/ต้น ตามลำดับ ต้นอ่อนเปราะโคราชที่ย้ายปลูกในดินทรายมีความยาวยอดเฉลี่ยสูงสุด 9.10 ซม. เมื่อเทียบกับการย้ายลงปลูกในวัสดุที่เป็นดินร่วน และดินร่วนผสมดินทรายที่มีความยาวยอดเฉลี่ย 8.15 และ 8.60 ซม. ตามลำดับ และต้นอ่อนเปราะโคราชที่ย้ายปลูกในวัสดุที่เป็นดินร่วน พบว่ามีจำนวนใบเฉลี่ยมากที่สุด 2.54 ใบ ใบมีความกว้างเฉลี่ยมากที่สุด 3.66 ซม. ใบมีสีเขียวเข้ม แผ่ออก ต้นอ่อนเปราะโคราชที่ย้ายปลูกในดินร่วนผสมดินทรายมีจำนวนรากเฉลี่ยมากที่สุด 6.20 ราก/ต้น ซึ่งมากกว่าเปราะโคราชที่ปลูกในดินร่วน และดินทราย และต้นอ่อนเปราะโคราชที่ย้ายปลูกในดินร่วนผสมดินทรายมีจำนวนรากสะสมอาหารเฉลี่ยมากที่สุดเท่ากับ 3.60 ราก/ต้น แต่มีความยาวรากสะสมอาหารน้อยกว่าต้นเปราะโคราชที่ปลูกในดินร่วน ซึ่งมีความยาวของรากสะสมอาหารเฉลี่ยมากที่สุดเท่ากับ 2.70 ซม. แตกต่างจาก Charangini *et al.* (2005) ได้นำต้นอ่อน *K. galanga* ย้ายปลูกในดินทรายกับปุ๋ยคอก อัตราส่วน 1:1 ปลูกเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ พบว่าต้นพืชที่ปลูกมีอัตราการรอดชีวิต 80-90 เปอร์เซ็นต์ และเกิดยอด 4-5 ยอด/ต้น จากการทดลองในครั้งนี้ต้นอ่อนเปราะโคราชที่ได้จากเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วนำออกปลูกในเรือนเพาะชำในดินร่วน ดินทราย และดินร่วนผสมดินทราย พบว่ามีการเจริญเติบโตใกล้เคียงกัน ต้นอ่อนเปราะโคราชที่ปลูกในดินร่วนผสมดินทรายให้จำนวนยอด จำนวนราก และจำนวนรากสะสมอาหารมากกว่าต้นอ่อนเปราะโคราชที่ปลูกในดินร่วน และดินทราย

5. วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

จากการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด จากชิ้นส่วนใบและเหง้าของเปราะโคราชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ เปรียบเทียบกับใบของเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองด้วยอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมน พบว่าชิ้นส่วนใบของเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองด้วยอาหารสูตร MS ไม่เติมฮอร์โมน มีปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุดเท่ากับ 107.21 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักแห้ง

และมีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์มากที่สุดเท่ากับ 15.73 มิลลิกรัมสมมูลของรูทินต่อกรัมน้ำหนักแห้ง รองลงมาคือใบเปราะโคราชที่เจริญเติบโตตามธรรมชาติ และเหง้าเปราะโคราชที่เจริญเติบโตตามธรรมชาติมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์น้อยที่สุด ซึ่งค่อนข้างสอดคล้องกับปริมาณฟีนอลิกและปริมาณฟลาโวนอยด์ที่พบมากในใบมากกว่าเหง้า แตกต่างจาก Nonthalee *et al.* (2023) ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดจากชิ้นส่วนใบและเหง้าของ *K. grandifolia* และ *K. siamensis* โดยเปรียบเทียบพืชที่เจริญเติบโตในธรรมชาติ พืชที่ย้ายออกปลูกในเรือนเพาะชำ และต้นพืชที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองบนอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน BAP ความเข้มข้น 4 มก./ล. ร่วมกับ NAA 1 มก./ล. เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าชิ้นส่วนเหง้าของ *K. grandifolia* ที่ย้ายออกปลูกในเรือนเพาะชำมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุด 177.65 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และชิ้นส่วนใบของ *K. siamensis* ที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ พบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุด 233.51 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ชิ้นส่วนใบ *K. grandifolia* พบปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์มากที่สุด 70.24 มิลลิกรัมสมมูลรูทินต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และชิ้นส่วนใบของ *K. siamensis* ที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติพบสารประกอบฟลาโวนอยด์ 137.35 มิลลิกรัมสมมูลรูทินต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งพบมากกว่าชิ้นส่วนพืชที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง เนื่องจากใบของเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง บนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตจึงทำให้ต้นพืชมีการเจริญเติบโตโดยไม่มีปัจจัยทางด้านอิทธิพลของฮอร์โมน รวมถึงการได้รับสารอาหารที่เพียงพอ การควบคุมปัจจัยทางด้านอุณหภูมิและแสง จึงส่งผลต่อการผลิตสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ได้อย่างสม่ำเสมอ และชิ้นส่วนเปราะโคราชที่เก็บมาจากสภาพธรรมชาติมีปัจจัยในด้านของสภาพแวดล้อมที่ต้นพืชเจริญเติบโตส่งผลให้ปริมาณของสารทุติยภูมิที่อยู่ในต้นพืชมีปริมาณไม่เท่ากันขึ้นอยู่กับสภาพถิ่นที่อยู่นั้น ๆ จากการวิจัยนี้จึงทำให้ใบของเปราะโคราชมีปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด มากกว่าชิ้นส่วนใบและเหง้าของเปราะโคราชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ แตกต่างจาก Ali *et al.* (2018) ศึกษาสารสกัดจากเหง้าของ *K. galanga* ที่เจริญเติบโตในธรรมชาติ เมื่อนำสารสกัดจากเหง้า *K. galanga* ที่ได้มาหาปริมาณฟีนอกลิกทั้งหมด และฟลาโวนอยด์ทั้งหมด พบว่าปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและฟลาโวนอยด์ทั้งหมดที่พบในสารสกัดจากเหง้าของ *K. galanga* เท่ากับ 15.40 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และ 37.72 มิลลิกรัมสมมูลคาเทชินต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ แตกต่างจาก Panyakaew *et al.* (2021) ศึกษาสารสกัดจากเหง้าของ *Kaempferia* 9 ชนิด ได้แก่ *K. angustifolia*, *K. elegans*, *K. galanga*-1, *K. galanga*-2, *K. galanga*-3, *K. marginata*, *K. parviflora*, *K. pulchra* และ *K. rotunda* ที่เจริญเติบโตในธรรมชาติ พบว่าสารสกัดจากต้นเปราะทั้ง 9 ชนิด *K. parviflora* มีปริมาณฟลาโวนอยด์สูงสุด 384.0 มิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซิตินต่อกรัม

น้ำหนักแห้ง รองลงมาคือ *K. elegans* มีปริมาณฟลาโวนอยด์ 236.7 มิลลิกรัมสมมูลเคอร์ซิตินต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ในขณะที่สารสกัดจากเหง้าของ *Kaempferia* ชนิดอื่น ๆ มีปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดอยู่ในช่วง 1.69-4.24 มิลลิกรัมสมมูลเคอร์ซิตินต่อกรัมน้ำหนักแห้ง Safriani *et al.* (2021) ศึกษาปริมาณของฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จากสารสกัดเหง้าของ *K. galanga* ที่เจริญเติบโตในธรรมชาติ พบว่าปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดที่พบในเหง้าของ *K. galanga* มีค่าเท่ากับ 0.82 มิลลิกรัมสมมูลเคอร์ซิตินต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดที่พบมีค่าเท่ากับ 1.53 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักแห้ง

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของใบและเหง้าเปราะโคราชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติและใบเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ไม่เติมฮอร์โมน ด้วยวิธี DPPH assay และ FRAP assay พบว่าสารสกัดชิ้นส่วนใบของเปราะโคราชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุดเท่ากับ 8.18 มิลลิกรัมสมมูลโทรลอกซ์ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH assay และมีค่าเท่ากับ 28.97 มิลลิกรัมสมมูลเฟอร์รัสซัลเฟตต่อกรัมน้ำหนักแห้ง รองลงมาคือสารสกัดจากใบเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมนมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เมื่อทดลองด้วยวิธี DPPH assay และ FRAP assay ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดลองด้วยวิธี DPPH assay และ FRAP assay ที่พบในใบเปราะโคราชที่เจริญตามธรรมชาติ ส่วนเหง้าของเปราะโคราชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดลองด้วยวิธี DPPH assay และ FRAP assay น้อยที่สุด ซึ่งค่อนข้างสอดคล้องกับปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดที่พบมากในใบมากกว่าเหง้าเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี FRAP assay จากการวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของ DPPH มีความสัมพันธ์กันในเชิงบวกเมื่อเปรียบเทียบกับเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (% inhibition) มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 1.00 อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบค่าสหสัมพันธ์ระหว่าง DPPH กับ FRAP มีค่าเท่ากับ 0.910 ซึ่งมีความสัมพันธ์กันในเชิงบวก อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ กล่าวคือเมื่อปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกและสารประกอบฟลาโวนอยด์มีปริมาณมาก ก็จะทำให้มีฤทธิต้านอนุมูลอิสระมากขึ้นตามไปด้วย เนื่องจากเปราะโคราชเป็นพืชวงศ์ขิงจัดอยู่ในสกุลเปราะเป็นพืชล้มลุกอายุหลายปี และเจริญเติบโตในช่วงฤดูฝนที่มีการงอกลำต้นเทียมและใบออกมาเพื่อสร้างอาหารและดำรงชีวิต จากงานวิจัยนี้ได้นำส่วนของใบและเหง้าต้นเปราะโคราชมาวิเคราะห์ในช่วงฤดูฝนที่ต้นพืชจะสะสมสารทุติยภูมิไว้ที่ใบมากกว่าในเหง้าจึงทำให้พบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและสารประกอบฟลาโวนอยด์ และสอดคล้องกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้มากที่ใบตามสภาพธรรมชาติ และในใบที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมน แตกต่างจาก Yeap *et al.* (2017) ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดจากเหง้าของ *K. angustifolia* ที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติด้วยวิธี DPPH พบว่าสารสกัดจากเหง้าของ *K. angustifolia* ที่สกัด

ด้วยเอทานอล และคลอโรฟอร์มมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดเท่ากับ 616 มิลลิกรัมสมมูลโทรล็อกซ์ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง รองลงมาคือ เอทิลอะซิเตต และเฮกเซน มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 588 และ 333 มิลลิกรัมสมมูลโทรล็อกซ์ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และเมื่อนำสารสกัดจากเหง้าที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ต้านอนูมล.อิสระด้วยวิธี FRAP โดยใช้โทรลอกซ์เป็นสารมาตรฐาน พบว่าสารสกัดจากเหง้าที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตตมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดเท่ากับ 342 มิลลิกรัมสมมูลโทรลอกซ์ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง รองลงมาคือ คลอโรฟอร์ม และเมทานอล มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 310 และ 224 มิลลิกรัมสมมูลโทรลอกซ์ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ และแตกต่างจาก Ali *et al.* (2018) ศึกษาสารสกัดจากเหง้าของ *K. galanga* ที่เจริญเติบโตในธรรมชาติ เพื่อศึกษาปริมาณฟีนอกลิกทั้งหมด และฟลาโวนอยด์ทั้งหมด โดยปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐาน และการหาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดใช้คาเทชินเป็นสารมาตรฐาน เมื่อนำสารสกัดจากเหง้า *K. galanga* ไปทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH โดยใช้คาเทชินเป็นสารมาตรฐาน ความเข้มข้น 2.67, 4.53 และ 3.18 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดจากเหง้ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยมีค่า $IC_{50}$ เท่ากับ 16.58 มิลลิกรัมสมมูลคาเทชินต่อกรัมน้ำหนักแห้ง แตกต่างจาก Safriani *et al.* (2021) ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จากสารสกัดเหง้าของ *K. galanga* ที่เจริญเติบโตในธรรมชาติ เมื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay มีค่าเท่ากับ 1.10 มิลลิกรัมสมมูลกรดแอสคอบิกต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay มีค่าเท่ากับ 22.15 เปอร์เซ็นต์ Nonglang *et al.* (2022) ศึกษาสารสกัดจากเหง้าของ *K. galanga* ที่เจริญเติบโตในธรรมชาติ เมื่อนำสารสกัดที่ได้มาศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH พบว่ามี % inhibition เท่ากับ 28.05 เปอร์เซ็นต์ และมีค่า $IC_{50}$ เท่ากับ 0.013 มิลลิกรัมสมมูลกรดแอสคอร์บิคต่อกรัมน้ำหนักแห้ง

6. ศึกษาองค์ประกอบทางพฤกษเคมีของเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง และที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง และแก๊สโครมาโทกราฟี – แมสสเปกโทรเมทรี

จากการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกและสารประกอบฟลาโวนอยด์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงของใบและเหง้าเปราะโคราชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ เปรียบเทียบกับใบเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง บนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมน จากการวิเคราะห์พบว่าปริมาณรวมสารประกอบฟีนอลิกในใบของเปราะโคราชที่ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ไม่เติมฮอร์โมนมีค่ามากที่สุด 8,046.74 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง มากกว่าชิ้นส่วนใบและเหง้าเปราะโคราชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติที่มีปริมาณรวมสารประกอบฟีนอลิกเท่ากับ 560.90 และ 139.69 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ พบสารไซรินจิกมากที่สุด 6,126.67 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ในชิ้นส่วนใบเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ไม่

เติมฮอร์โมน รองลงมาพบสารคาเฟอิกปริมาณ 1,470.48 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง โดยกรดไซรินจิกสามารถพบในพืชวงศ์ขิงชนิดอื่นจากงานวิจัยของ Ghareeb *et al.* (2018) พบสารไซรินจิกจาก *Alpinia zerumbet* เมื่อศึกษาชนิดของสารประกอบฟีนอลิกด้วยเทคนิค HPLC-ESI-MS/MS และจากงานวิจัยของ Chumroenphat (2020) ศึกษาชนิดของสารประกอบฟีนอลิกในพืชวงศ์ขิงพบสารไซรินจิกในพืช 7 ชนิด คือ ขิงน้อย (*Zingiber officinale*) อีทือ (*Zingiber mekongense*) หมายี (*Zingiber rubens*) ขิงกระต่าย (*Zingiber junceum*) ขมิ้นชัน (*Curcuma longa*) ข่าคม (*Alpinia zerumbet*) และข่าลิง (*Alpinia conchigera*) โดยสารไซรินจิกเป็นสารประกอบที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติมักถูกพบในพืชและผลไม้ที่รับประทานได้ (Itoh *et al.*, 2009; Pacheco-Palencia *et al.,* 2008) ถูกนำไปใช้ประโยชน์ที่หลากหลาย เช่น งานทางด้านเภสัชกรรม ด้านฤทธิต้านอนมูลอิสระ (Gao *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2017) ยาต้านเบาหวาน (Muthukumaran *et al.,* 2013) ป้องกันตับ (Itoh *et al.,* 2009; Itoh *et al.,* 2010; Yan *et al.,* 2016) เป็นยาลดไขมัน (Ramachandran, 2010) ป้องกันหลอดเลือดและหัวใจถูกทำลาย (Ding *et al.,* 2017; Rasheeda *et al.,* 2018) ป้องกันระบบประสาท (Rasheeda *et al.,* 2018; Tokmak *et al.,* 2017) และมีฤทธิต้านการอักเสบ (Ham *et al.,* 2016; Lee *et al.,* 2012). จากการวิเคราะห์พบว่าปริมาณรวมสารประกอบฟลาโวนอยด์ในใบของเปราะโคราชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติมีค่ามากที่สุด 138.01 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง พบมากกว่าชิ้นส่วนเหง้าที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติและชิ้นส่วนใบเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ไม่เติมฮอร์โมน ที่มีปริมาณรวมของสารประกอบฟลาโวนอยด์เท่ากับ 122.76 และ 98.20 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ และพบสารรูทินมากที่สุด 93.02 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งในชิ้นส่วนใบของเปราะโคราชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ รูทินเป็นสารประกอบฟลาโวนอยด์ที่พบมากในพืชหลายชนิดมักถูกนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ช่วยลดความเสี่ยงของภาวะหลอดเลือดแข็งตัว และช่วยเพิ่มการไหลเวียนของเลือด (Wojcicki, 1995; Kreft *et al.,* 2006) จากการวิเคราะห์ชนิดของสารประกอบฟลาโวนอยด์ด้วยเทคนิค HPLC มีความแตกต่างกันกับการศึกษาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ซึ่งพบมากในใบของเปราะโคราชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ พบมากกว่าใบที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ไม่เติมฮอร์โมน และตรวจไม่พบสารรูทินในเหง้าของเปราะโคราชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ

จากการนำใบและเหง้าของเปราะโคราชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ และใบเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง บนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมน มาวิเคราะห์สารพฤกษเคมีด้วย

เทคนิค GC-MS พบว่าสารสกัดจากใบและเหง้าของเปราะโคราช พบว่าสารสกัดจากใบเปราะโคราชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติมีทั้งหมด 11 ชนิด และเหง้าของเปราะโคราชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติมีทั้งหมด 12 ชนิด และสารสกัดจากใบของเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองมีทั้งหมด 7 ชนิด แล้วมีค่าร้อยละของพื้นที่ใต้พีกสัมพัทธ์ทั้งหมด 100 เปอร์เซ็นต์ เท่ากัน และพบว่าใบของเปราะโคราชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ ตรวจพบ bicyclo[3.1.1]heptane, 6,6-dimethyl-2-methylene-, (1s) ซึ่งมีร้อยละของพื้นที่ใต้พีกสัมพัทธ์มากที่สุดเท่ากับ 60.29 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือใบที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ไม่เติมฮอร์โมนพบ caryophyllene ที่มีร้อยละของพื้นที่ใต้พีกสัมพัทธ์เท่ากับ 57.39 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในเหง้าเปราะโคราชที่เจริญเติบโตในธรรมชาติพบ camphene 50.73 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้สาร bicyclo[3.1.1]heptane, 6,6-dimethyl-2-methylene-, (1s) ยังพบในพืชวงศ์ขิงชนิดอื่นอีก เช่น *Curcuma inodora* (Kumar *et al.,* 2017), *Curcuma longa* (El-Sherif *et al.,* 2019) และ *Amomum villosum* (Tu *et al.,* 2023) โดย bicyclo[3.1.1]heptane, 6,6-dimethyl-2-methylene-, (1s) ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ เช่น ฤทธิ์ต้านเชื้อ *Helicobacter pylori* ฤทธิ์ต้านเชื้อ *Candida* (Mohammed *et al.,* 2016) มีฤทธิ์ต้านเบาหวานและน้ำตาลในเลือดสูง (El Moussaoui *et al.,* 2021) จากการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกด้วยเทคนิค GC-MS ในครั้งนี้พบสาร bicyclo[3.1.0]hexane, 4-methylene-1-(1-methylethyl)-, d-limonene, copaene, naphthalene, 1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydro-4a,8-dimethyl-2-(1-methylethenyl) และ 2,4-di-tert-butylphenol- เฉพาะในใบเปราะโคราชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติเท่านั้น และพบสาร tricyclo[2.2.1.0(2,6)]heptane, 1,7,7-trimethyl-, 3-carene, bicyclo[2.2.1]heptan-2-one, 1,7,7-trimethyl-,(1S)-,3h-3a,7-methanoazulene,2,4,5,6,7,8-hexahydro-1,4,9,tetramethyl-, 1h-cycloprop[e]azulene,1a,2,3,4,4a,5,6,7b-octahydro-1,1,4,7-tetramethyl, germacrene d และ dehydroisoandrosterone acetate เฉพาะในชิ้นเหง้าเปราะโคราชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติเท่านั้น สาร caryophyllane เป็นสารพฤกษเคมีที่พบได้ตามธรรมชาติมักพบในพืชบก และยังพบได้ในสิ่งมีชีวิตบางชนิดและจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในทะเล (Evandri *et al*., 2005) caryophyllene ช่วยกระตุ้นการต้านการอักเสบ เป็นยาแก้ปวด และช่วยป้องกันระบบประสาท (Santos *et al*., 2017) ช่วยยับยั้งกระบวนการสำคัญเช่น mitogen-activated protein kinase (MAPK), PI3K/AKT/mTOR/S6K1 และ STAT3 pathways ซึ่งกระบวนเหล่านี้เป็นสาเหตุในการเจริญเติบโตและการกระจายของเซลล์มะเร็ง (Fidyt *et al*., 2016) นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่าสาร

caryophyllene มีฤทธิ์ในการกระตุ้นยาต้านมะเร็งบางชนิด ซึ่งทำหน้าที่เป็นเคมีบำบัด (chemosensitizers) (Di Giacomo *et al*., 2017) จากงานวิจัยของ Suthisut *et al*. (2011) พบสาร camphene ในพืชวงศ์ขิงชนิดอื่นอีก เช่น *Alpinia conchigera* และ *Zingiber zerumbe*t โดยสาร camphene เป็นสารประกอบในกลุ่ม monoterphene มีการนำไปใช้ประโยชน์ เช่น เป็นสารกำจัดศัตรูพืช ใช้กำจัดมอดแป้ง (*Tribolium castaneum*) และใช้กำจัดด้วงงวงข้าวโพด (*Sitophilus zeamais*) สาร camphene ยังพบได้ทั่วไปในพืชซึ่งมีฤทธิ์ช่วยลดไขมันในเส้นเลือด และลดคลอเลสเตอรอลในร่างกายได้อีกด้วย (Vallianou *et al*., 2016) (ตาราง 11) จากการทดลองในครั้งนี้จะเห็นว่าเมื่อนำใบที่เจริญเติบโตในธรรมชาติและใบที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองมาศึกษาปริมาณสารด้วยเทคนิค GC-MS ชนิดและปริมาณสารที่พบแตกต่างกันโดยใบและเหง้าที่เจริญเติบโตในธรรมชาติ พบชนิดของสารมากกว่าในใบเปราะโคราชที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง ทั้งนี้อาจเนื่องจากสภาพแวดล้อม อุณหภูมิ ปริมาณน้ำ และแสง ส่งผลโดยตรงในการผลิตสารทุติยภูมิของต้นพืช (Ryan, 1978) และพบว่าเมื่อพืชมีการถูกรบกวนจะผลิตสารยับยั้งโปรติเนสซึ่งเป็นเอนไซม์ย่อยโปรตีนจากแมลงและจุลินทรีย์บางชนิด (Green & Ryan, 1972) นอกจากนี้สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชยังส่งผลต่อการผลิตสารทุติยภูมิได้อีกด้วย โดยงานวิจัยของ Nonthalee *et al*. (2023) ศึกษาปริมาณสารประกอบใน *Kaempferia glandifolia* และ *Kaempferia siamensis* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน BAP ความเข้มข้น 4 มก./ล. ร่วมกับ NAA 1 มก./ล. เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ แล้วย้ายต้นพืชออกปลูกในเรือนเพาะชำเป็นเวลา 1 ปี เมื่อนำชิ้นส่วนเหง้าและใบไปหาปริมาณสารประกอบน้ำมันหอมระเหยด้วยเทคนิค GC-MS พบว่าปริมาณสารประกอบน้ำมันหอมระเหยที่พบไม่มีความแตกต่างจากปริมาณสารประกอบของใบและเหง้าที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ Sereena *et al.* (2011) ได้ศึกษาปริมาณน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าสดจากธรรมชาติของ *Kaempferia rotunda* ด้วยเทคนิค GC-MS พบสารประกอบทั้งหมด 13 ชนิด โดยพบสารประกอบ bornyl acetate มากที่สุด 30.12 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือสาร benzyl benzoate พบ 16.59 เปอร์เซ็นต์ และสอดคล้อง Singh *et al.* (2011) ได้วิเคราะห์ปริมาณน้ำมันหอมระเหยจากชิ้นส่วนเหง้าของขมิ้น (*Curcuma longa*) เปรียบเทียบระหว่างสภาพธรรมชาติกับในหลอดทดลองที่ย้ายออกปลูกในเรือนเพาะชำเป็นเวลา 1 ปี ด้วยเทคนิค GC-MS พบสารประกอบหลักน้ำมันหอมระเหย 10 ชนิด ในเหง้า มีพื้นที่ใต้กราฟ 90.04 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ต้นขมิ้นที่ปลูกในสภาพธรรมชาติมีพื้นที่ใต้กราฟ 89.09 เปอร์เซ็นต์ จากตารางพบว่าเมื่อนำเหง้าที่ปลูกในสภาพธรรมชาติและเหง้าที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองที่ย้ายออกปลูกมาวิเคราะห์น้ำมันหอมระเหยพบ ar-

tumerone ในปริมาณมากที่สุด 49.76 และ 49.83 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ รองลงมาคือ curlone พบ 18.37 และ 18.72 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และได้วิเคราะห์ปริมาณน้ำมันหอมระเหยจากชิ้นส่วนเหง้าและใบของขมิ้น เปรียบเทียบระหว่างสภาพธรรมชาติกับในหลอดทดลอง ด้วยเทคนิค GC-MS มาวิเคราะห์น้ำมันหอมระเหยพบ alpha-phellandrene ในใบที่เจริญในสภาพธรรมชาติและใบที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองแล้วย้ายออกปลูกเป็นเวลา 1 ปี ปริมาณที่มากที่สุด 57.80 และ 57.95 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ รองลงมาคือ d-terpinene, tumerone, 3-carene, alpha-pinene, curlone, beta pinene, a-terpineol, alpha-nerolidol, curcumene, caryophyllene และ alpha-farnesene ตามลำดับ แตกต่างจาก Sahoo *et al.* (2014) ศึกษาน้ำมันหอมระเหยจากเหง้า *Keampferia galanga* ที่ปลูกในสภาพธรรมชาติและที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองที่ย้ายออกปลูกในเรือนเพาะชำเป็นเวลา 16 สัปดาห์ ด้วยเทคนิค GC-MS พบสารประกอบหลัก ethyl p-methoxy cinnamate มีเปอร์เซ็นต์พื้นที่ใต้กราฟเท่ากับ 82.01 และ 71.77 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับพบสารประกอบทั้งหมด 6 ชนิด โดยสารประกอบที่พบในเหง้าจากสภาพธรรมชาติที่พบปริมาณสารมากกว่าในหลอดทดลองที่ย้ายออกปลูก มี 2 ชนิด คือ 3-carene และ ethyl p-methoxy cinnamate และพบสาร 4 ชนิดจากเหง้าในหลอดทดลองที่ย้ายออกปลูกพบมากกว่าที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ คือ eucalyptol, ethyl cinnamate, borneol และ pentadecane จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าน้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากเหง้า *K. galanga* ที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติมีปริมาณมากกว่าในหลอดทดลองที่ย้ายออกปลูกอย่างมีนัยสำคัญ แต่อย่างไรก็ตามสารประกอบน้ำมันหอมระเหยที่พบในเหง้าจากสภาพธรรมชาติและในหลอดทดลองที่ย้ายออกปลูกมีความคล้ายคลึงกัน และผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าการเพาะเลี้ยง *K. galanga* ในหลอดทดลองสามารถช่วยในการเพิ่มผลผลิตน้ำมันหอมระเหยได้อย่างมีประสิทธิภาพและลดปริมาณการใช้พืชในธรรมชาติจำนวนมาก

พหุน ปณ ฑิโต ชีเว

**ตาราง 11** ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากชิ้นส่วน ใบ และเหง้าเปราะโคราชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ และใบที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมน

| ลำดับ | ชื่อสาร | ฤทธิ์ทางชีวภาพ | อ้างอิง |
|---|---|---|---|
| 1 | bicyclo[3.1.1]heptane, 6,6-dimethyl-2-methylene-, (1s) | antimicrobial | Mohammed *et al*. (2016) |
| | | anti-diabetic, anti-hyperglycemic | Tu *et al*. (2023) |
| 2 | caryophyllane | anti-inflammatory | Santos *et al*. (2017) |
| | | anticancer | Fidyt *et al*. (2016) |
| | | chemosensitizers | Di Giacomo *et al*. (2017) |
| 3 | camphene | pesticide | Suthisut *et al*. (2011) |
| | | hypolipidaemic agents | Vallianou *et al*. (2016) |

จากการศึกษาในครั้งนี้สามารถนำไปใช้เป็นแนวทางขยายพันธุ์และอนุรักษ์พันธุกรรมเปราะโคราชที่เป็นพืชถิ่นเดียวของประเทศไทย รวมทั้งยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อเป็นแนวทางในการส่งเสริมการนำต้นเปราะโคราชมาพัฒนาเป็นไม้ประดับชนิดใหม่ ซึ่งเป็นการเพิ่มมูลค่าพืช รวมทั้งเป็นแนวทางในการอนุรักษ์ต้นเปราะโคราชให้มีอยู่อย่างยั่งยืนต่อไป จากรายงานการวิจัยก่อนหน้านี้ยังไม่พบรายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเปราะโคราช ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงเป็นการศึกษาการเพาะเลี้ยงเปราะโคราชเป็นครั้งแรก เพื่อศึกษาผลของฮอร์โมนในกลุ่มออกซิน และไซโทไคนินต่อการเจริญเติบโตของต้นเปราะโคราชเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง และอาหารเหลว รวมทั้งศึกษาวัสดุปลูกที่เหมาะสมเมื่อย้ายต้นอ่อนเปราะโคราชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อออกปลูกในเรือนเพาะชำ ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้นอกจากจะใช้ขยายพันธุ์ต้นเปราะโคราชให้ได้จำนวนมาก ยังเป็นการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชถิ่นเดียว นอกจากนี้ข้อมูลที่ได้ยังอาจเป็นข้อมูลพื้นฐานในการเพาะเลี้ยงพืชสกุลเปราะชนิดอื่น ๆ นำไปประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืช การศึกษาสรรพคุณทางยา ซึ่งเป็นการเพิ่มมูลค่า และการสร้างองค์ความรู้ใหม่จากต้นเปราะโคราช การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเปราะโคราชในสภาพหลอดทดลองในครั้งนี้สามารถขยายพันธุ์พืชในปริมาณมากในระยะเวลาสั้น โดยอาศัยสูตรอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสมต่อพืชแต่ละชนิด สามารถเพิ่มจำนวนต้นพืชเป็นทวีคูณ ซึ่งแตกต่างจากการขยายพันธุ์ตามธรรมชาติที่สามารถเพิ่มจำนวนได้ในช่วงฤดูฝนเท่านั้น และจากการศึกษายังพบว่าปริมาณสารพฤกษเคมีที่พบในชิ้นส่วนต่าง ๆ ของเปราะโคราชที่พบมากที่สุดคือต้นเปราะโคราชที่

เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง ซึ่งเป็นผลมาจากปริมาณของสารอาหารในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีปริมาณที่พอเหมาะต่อการเจริญเติบโตขึ้นต้นพืช และการนำไปสังเคราะห์สารทุติยภูมิ และด้วยการควบคุมปัจจัยต่าง ๆ เช่น ปริมาณแสง และอุณหภูมิ ในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จึงมีความแตกต่างจากต้นเปราะโคราชที่เจริญเติบโตในธรรมชาติ ที่มีสภาพแวดล้อมในการเจริญเติบโตที่แตกต่างและไม่มีการควบคุมปัจจัยต่าง ๆ จึงทำให้ปริมาณของสารพฤกษเคมีมีความแตกต่าง และจากการศึกษาสารพฤกษเคมีในเปราะโคราชยังสามารถนำไปต่อยอดเพื่อใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ เช่น ใช้เป็นอาหาร ยารักษา หรือการแปรรูปสารสกัดจากต้นเปราะโคราชเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ในอนาคตได้อีกด้วย

พหูน ปณฺฑิโต ชีเว

# บรรณานุกรม

# บรรณานุกรม


กมลทิพย์ ไหลไผ่ทอง. (2561). *การพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่และการเพิ่มชุดโครโมโซมของกระชายดำในหลอดทดลอง*. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

กฤติกา นรจิตร. (2548). คุณสมบัติของสารสกัดจากพืชวงศ์ขิง. *อิทธิพลของวิธีการสกัดต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียและการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ.*กรุงเทพฯ:มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

จิราภรณ์ ผุดผ่อง, สุรพล แสนสุข และปิยะพร แสนสุข. (2558). การขยายพันธุ์เปราะราศี (*Kaempferia larsenii* Sirirugsa) ในหลอดทดลองเพื่อการอนุรักษ์พืชหายากในประเทศไทย. *วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*, *43*(4), 673–687.

ทวีศักดิ์ แสงอุดม. (2559). สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช. *สารควบคุมการเจริญเติบโตพืชและแนวทางการใช้กับไม้ผล* (หน้า 8). กรุงเทพฯ: สถาบันวิจัยพืชสวน.

ปิยะพร แสนสุข. (2557). การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. มหาสารคาม : มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.

วราภรณ์ อำพันกาญจน์. (2552). บทบาทของ Thidiazuron ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. *วารสารมหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา*, *4*(2), 123-135.

วันดี กฤษณพันธ์. (2544). พฤกษเคมีเบื้องต้น. *เภสัชวินิจฉัยยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติเล่มที่ 1* (หน้า 34-102). กรุงเทพฯ: แสงเทียนการพิมพ์.

วินัย ดะห์ลัน. (2550). โภชนาการพื้นฐานเพื่อการมีสุขภาพสมบูรณ์สูงสุด. Retrieved from nutrition.anamai.moph.go.th/images/files/phytonutrient. %0A doc.%0A.

สุรพล แสนสุข. (2543). *การศึกษาสัณฐานวิทยา โครโมโซม และละอองเรณูของพรรณไม้วงศ์ขิงในอุทยานแห่งชาติภูพาน*. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

อรอุมา ภู่ประเสริฐ และมาลัย สถิรพันธุ์. (2549). เทคนิคการคู่ต่อเครื่องมือวิเคราะห์ทางเภสัชศาสตร์. *วารสารไทยไภษัชยนิพนธ์*, *3*, 1–23.

Ali, H., Yesmin, R., Satter, M. A., Habib, R. & Yeasmin, T. (2018). Antioxidant and antineoplastic activities of methanolic extract of *Kaempferia galanga* Linn. rhizome against ehrlich ascites carcinoma cells. *Journal of King Saud University Science*, *30*(3), 386-392.

Azwanida, N. N. (2015). A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, *4*(196), 2167-0412.

Begum, T., Gogoi, R., Sarma, N., Pandey, S. K. & Lal., M. (2022). Direct sunlight and partial shading alter the quality, quantity, biochemical activities of *Kaempferia parviflora* Wall., ex Baker rhizome essential oil: A high industrially important species. *Industrial Crops and Products*, *180*, 114-765.

Bhadra, S., Mondal., S. & Bandyopadhyay, M. (2020). An empirical study on the underutilized medicinal genus *Kaempferia* from India revealed cytological and genetic variability. *The Nucleus*, *63*(3), 257-270.

Bhatt, A., Kean, O. B. & Keng, C. L. (2012). Sucrose, benzylaminopurine and photoperiod effects on *in vitro* culture of *Kaempferia galanga* L. *Plant Biosystems*, *146*(4), 900–905.

Chirangini, P., Sinha, S. K. & Sharma, G. J. (2005). *In vitro* propagation and microrhizome induction in *Kaempferia galanga* L. and *K. rotunda* L. *Indian Journal of Biotechnology*, *4*(3), 404–408.

Chumroenphat, T. (2020). *Analysis of bioactive compounds and biological activity in Thai Zingiberaceae and the effect of processing*. Doctor of Philosophy Biotechnology, Mahasarakham University.

Chumroenphat, T., Saensouk, S. & Saensouk, P. (2021). Chemical composition and antioxidant activity of three species of *Cornukaempferia* in Thailand. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, *22*(9). 4036-4044.

Collin, H. A. (2001). Secondary product formation in plant tissue cultures. *Plant Growth Regulation*, *34*(1), 119–134.

De Castro, M. L. & Priego-Capote, F. (2010). Soxhlet extraction: past and present panacea. *Journal of chromatography A, 1217*(16), 2383-2389.

Devi, A. R. & Raj, N. M. (2019). Evaluation of *Kaempferia galanga* L. morphotypes and its chemical markers. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, *8*(5), 1554-1558.

Di Giacomo, S., Di Sotto, A., Mazzanti, G. & Wink, M. (2017). Chemosensitizing properties of β-caryophyllene and β-caryophyllene oxide in combination with doxorubicin in human cancer cells. *Anticancer Research*, *37*(3), 1191-1196.

Ding, S. K., Wang, L. X., Guo, L. S., Luo, P., Du, J. J., Zhao, Z. L. & Wang, G.G. (2017). Syringic acid inhibits apoptosis pathways via downregulation of *p38MAPK* and *JNK* signaling pathways in *H9c2* cardiomyocytes following hypoxia/reoxygenation injury. *Molecular Medicine Reports*, *16*(2), 2290–2294.

Dong, M. W. (2006). *Modern HPLC for Practicing Scientists*. John Wiley & Sons.

El Moussaoui, A., Mechchate, H., Bourhia, M., Es-safi, I., Salamatullah, A. M., Alkaltham, M. S. & Bari, A. (2021). Glycemic control potential of chemically characterized extract from *Withania frutescens* l. roots in severe diabetes-induced mice. *Applied Sciences*, *11*(9), 1-9.

El-Sherif, F., Yap, Y. K. & Ibrahim, H. I. (2019). Laser irradiation induces DNA polymorphism and alters phytochemicals compositions as well as growth and yield of *Curcuma longa*. *Journal of Diseases and Medicinal Plants*, *5*, 29-38.

Evandri, M. G., Battinelli, L., Daniele, C., Mastrangelo, S., Bolle, P. & Mazzanti, G. (2005). The antimutagenic activity of *Lavandula angustifolia* (lavender) essential oil in the bacterial reverse mutation assay. *Food and Chemical Toxicology*, *43*(9), 1381-1387.

Fidyt, K., Fiedorowicz, A., Strada, L. & Szumny, A. (2016). β-caryophyllene and β-caryophyllene oxide—natural compounds of anticancer and analgesic properties. *Cancer Medicine*, *5*(10), 3007-3017.

Gao, Y., Guo, X., Liu, Y., Fang, Z., Zhang, M., Zhang, R. & Liu, R. H. (2018). A full utilization of rice husk to evaluate phytochemical bioactivities and prepare cellulose nanocrystals. *Scientific Reports*, *8*, 1-8.

Geetha, S. P., Manjula, C., John, C. Z., Minoo, D. & Babu, K. N. (1997). Micropropagation of *Kaempferia* spp. (*K. galanga* L. and *K rotunda* L.) *Indian Institute of Spices Research*, *6*(2), 129–135.

Ghareeb, M. A., Sobeh, M., Rezq, S., El-Shazly, A. M., Mahmoud, M. F. & Wink, M. (2018). HPLC-ESI-MS/MS profiling of polyphenolics of a leaf extract from *Alpinia zerumbet* (Zingiberaceae) and its anti-inflammatory, anti-nociceptive, and antipyretic activities *in vivo*. *Molecules*, *23*(12), 32-38.

Green, T. R. & Ryan, C. A. (1972). Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves: a possible defense mechanism against insects. *Science*, *175*(4023), 776-777.

Ham, J. R., Lee, H. I., Choi, R. Y., Sim, M. O., Seo, K. I. & Lee, M. K. (2016). Anti-steatotic and anti-inflammatory roles of syringic acid in high-fat diet-induced obese mice. *Food & Function*, *7*(2), 689–697.

Haque, S. M. & Ghosh, B. (2018). Micropropagation of *Kaempferia angustifolia* Roscoe-an aromatic, essential oil yielding, underutilized medicinal plant of Zingiberaceae family. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, *21*(2), 147-153.

Itoh, A., Isoda, K., Kondoh, M., Kawase, M., Kobayashi, M., Tamesada, M. & Yagi, K. (2009). Hepatoprotective effect of syringic acid and vanillic acid on concanavalin a-induced liver injury. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, *32*(7), 1215–1219.

Itoh, A., Isoda, K., Kondoh, M., Kawase, M., Kobayashi, M., Tamesada, M. & Yagi, K. (2009). Hepatoprotective effect of syringic acid and vanillic acid on concanavalin a-induced liver injury. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, *32*(7), 1215–1219.

Itoh, A., Isoda, K., Kondoh, M., Kawase, M., Watari, A., Kobayashi, M. & Yagi, K. (2010). Hepatoprotective effect of syringic acid and vanillic acid on *CCl4*-induced liver injury. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, *33*(6), 983–987.

Jagtap, S. (2015). Preliminary phytochemical screening and antioxidant activity of rhizome extracts of *Kaempferia scaposa* (Nimmo) Benth. *Journal of Academia and Industrial Research (JAIR)*, *3*(12), 613-620.

Jolad, S. D., Lantz, R., C., Solyom, A. M., Chen, G. J., Bates, R. B. & Timmermann, B. N. (2004). Fresh organically grown ginger (*Zingiber officinale*): composition and effects on LPS-induced PGE2 production. *Phytochemistry*, *65*(13), 1937-1954.

Kaewamatawong, R. & Jounmunkong, Z. (2006). DPPH free radical scavenging activity and total phenol compounds content of some thai medicinal plant extracts. *Journal of Ubon Ratchathani University*, *2*(8), 76-88.

Kalpana M. & Anbazhagan, M. (2015). *In vitro* production of *Kaempferia galanga* L. - an endangered medicinal plant. *Journal of Phytology*, *1*(1), 56–61.

Kalpana, M. & Anbazhag M. (2009). *In vitro* production of *Kaempferia galanga* (L.) - an endangered medicinal plant. *Journal of Phytology*, *1*(1), 56–61.

Koneman, W. E., Allen, D. S., Janda, M. W., Schreckenberger, C. P. & Washington, C. Kreft, I., Fabjan, N. & Yasumoto, K. (2006). Rutin content in buckwheat (Fagopyrum esculentum Moench) food materials and products. *Food Chemistry*, *98*(3), 508-512.

Kreft, I., Fabjan, N. & Yasumoto, K. (2006). Rutin content in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) food materials and products. *Food Chemistry*, *98*(3), 508-512.

Kubola, J. & Siriamornpun, S. (2011). Phytochemicals and antioxidant activity of different fruit fractions (peel, pulp, aril and seed) of Thai gac (Momordica cochinchinensis Spreng). *Food chemistry*, *127*(3), 1138-1145.

Kumar, A. (2020). Phytochemistry, pharmacological activities and uses of traditional medicinal plant *Kaempferia galanga* L.–an overview. *Journal of Ethnopharmacology*, *253*, 112-667.

Kumar, R. & Akkara, Y. (2017). Analysis by gas chromatography-mass spectrometry of the essential oil of *Curcuma inodora* Blatt. (Zingiberaceae) from Southern India. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, *6*(4), 1629-1634.

Labrooy, C., Abdullah, T. L. & Stanslas, J. (2020). Influence of N6-benzyladenine and sucrose on *in vitro* direct regeneration and microrhizome induction *of Kaempferia parviflora* Wall. ex Baker, an important ethnomedicinal herb of Asia. *Tropical Life Sciences Research*, *31*(1), 123.

Lee, M. H., Kang, H., Lee, K., Yang, G., Ham, I., Bu, Y. & Choi, H. Y. (2012). the aerial part of *Taraxacum coreanum* extract has an anti-inflammatory effect on peritoneal macrophages *in vitro* and increases survival in a mouse model of septic shock. *Journal of Ethnopharmacology*, *146*(1), 1–8.

Ma, X. & Gang, D. R. (2006). Metabolic profiling of turmeric (*Curcuma longa* L.) plants derived from *in vitro* micropropagation and conventional greenhouse cultivation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(25), 9573–9583.

Maneetong, S. (2019). Simple extraction for the scanning of antioxidant activity of vegetables and fruits in Buriram, Thailand by DPPH, ABTS and FRAP assays. *SNRU Journal of Science and Technology*, *11*(3), 114-121.

Mekjaruskul, C. & Sripanidkulchai, B. (2020). *Kaempferia parviflora* nanosuspension formulation for scalability and improvement of dissolution profiles and intestinal absorption. *American Association of Pharmaceutical Scientists*, *21*(2), 1-11.

Mohammed, G. J., Omran, A. M. & Hussein, H. M. (2016). antibacterial and phytochemical analysis of *Piper nigrum* using gas chromatography-mass spectrum and fourier-transform infrared spectroscopy. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, *8*(6), 977-996.

Mohanty, S., Parida, R., Singh, S., Joshi, R. K., Subudhi, E. & Nayak, S. (2011). Biochemical and molecular profiling of micropropagated and conventionally grown *Kaempferia galanga*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *106*(1), 39–46.

Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, *15*(3), 473–497.

Muthukumaran, J., Srinivasan, S., Venkatesan, R. S., Ramachandran, V. & Muruganantham, U. (2013). Syringic acid, a novel natural phenolic acid, normalizes hyperglycemia with special reference to glycoprotein components in experimental diabetic rats. *Journal of Acute Disease*, *2*, 304–309.

Neelapong, W., Phonyotin, B. & Sittikijyothin, W. (2018). Extraction of active compounds from Thai herbs: steam distillation and solvent extraction. *The Journal of King Mongkut's University of Technology North Bangkok*, *28*(4), 1-10.

Nonglang, F. P., Khale, A. & Bhan, S. (2022). Phytochemical characterization of the ethanolic extract of *Kaempferia galanga* rhizome for antioxidant activities by HPTLC and GCMS. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, *8*(1), 1-12.

Nonthalee, S., Maneechai, S., Saensouk, S. & Saensouk, P. (2022). *In vitro* propagation, microrhizome induction, and evaluation of genetic variation by RAPD markers of *Kaempferia siamensis* Sirirugsa. *Propagation of Ornamental Plants*, *22*(1), 11-13.

Nonthalee, S., Maneechai, S., Saensouk, S. & Saensouk, P. (2023). Comparative phytochemical profiling (GC-MS and HPLC) and evaluation of antioxidant activities of wild, *in vitro* cultured and greenhouse plants of *Kaempferia grandifolia* Saensouk and Jenjitt and *Kaempferia siamensis* Sirirugsa; rare plant species in Thailand. *Pharmacognosy Magazine*, *16*(1), 156-167.

Oirere, E. K., Anusooriya, P., Arulraj, C. & Gopalakrishnan V. K. (2015). Phytochemical analysis of n-haxane leaf extract of *Alpinia purpurata* (Vieill.) K. schum using UV-Vis, FTIR and GCMS. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 7*(8), 387-389.

Pacheco-Palencia, L. A., Mertens-Talcott, S. & Talcott, S. T. (2008). Chemical composition, antioxidant properties, and thermal stability of a phytochemical enriched oil from acai (Euterpeoleracea Mart.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(12), 4631–4636.

Panyakaew, J., Chalom, S., Sookkhee, S., Saiai, A., Chandet, N., Meepowpan, P. & Mungkornasawakul, P. (2021). *Kaempferia* sp. extracts as UV protecting and antioxidant agents in sunscreen. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, *27*(1), 37-56.

Parida, R., Mohanty, S., Kuanar, A. & Nayak, S. (2010). Rapid multiplication and *in vitro* production of leaf biomass in *Kaempferia galanga* through tissue culture. *Electronic Journal of Biotechnology*, *13*(4), 4-8.

Park, H. Y., Kim, K. S., Ak, G., Zengin, G., Cziáky, Z., Jeko, J. & Sivanesan, I. (2021). Establishment of a rapid micropropagation system for *Kaempferia parviflora* wall. Ex Baker: phytochemical analysis of leaf extracts and evaluation of biological activities. *Plants*, *10*(4), 698.

Picheansoonthon, C. (2011). Two new *Kaempferia* (Zingiberaceae) from Thailand. *Japanese Journal of Botany*, *86*, 1–8.

Pornpimon M. & Sakamon D. (2007). Antimicrobial and antioxidant activities of Indian gooseberry and galangal extracts. *LWT. Food Science and Technology, 41,* 1153–1159.

POWO (2023). *Plants of the World Online. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew*. Published on the Internet; http://www.plantsoftheworldonline.org/ Retrieved 25 April 2023.

Rachkeeree, A., Kantadoung, K., Puangpradub, R. & Suksathan, R. (2020). Phytochemicals, antioxidants and anti-tyrosinase analyses of selected ginger plants. *Pharmacognosy Journal., 12*(4), 872-883.

Rahman, M., Amin, M., Ahamed, T., Ali, M. R. & Habib, A. (2004). Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from leaf base-derived callus of *Kaempferia galanga* L. *Asian Journal of Plant Sciences*, *3*(6), 675–678.

Rahman, M.M., Amin, M.N., Ahamed, T., Ahmad, S., Habib, A., Ahmed, R., Ahmed, M.B. & Ali, M. R. (2005). *In vitro* rapid propagation of black thorn (*Kaempferia galanga* L.): a rare medicinal and aromatic plant of bangladesh. *Journal of Biological Sciences*, *5*(3), 300–304.

Rahman, Z., Othman, A. N., Ghazalli, M. N. & Adlan, N. A. S. (2022). Micropropagation of *Kaempferia angustifolia* Roscoe via direct regeneration. *American Journal of Plant Sciences*, *13*(6), 734-743.

Rahman, Z., Shukor, S., Abbas, H., Machap, C. A., Alias, M. S. B., Mirad, R. & Othman, A. N. (2018). Optimization of extraction conditions for total phenolics and total flavonoids from *Kaempferia parviflora* rhizomes. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, *9*(5), 205-214.

Rajasekharan, P. E., Ambika, R. & Ganeshan, S. (2015). *In vitro* regeneration and conservation of *Kaempferia galanga*. *Journal of Genetics and Evolution*, *2*(2), 35–43.

Ramachandra Rao, S. & Ravishankar, G. A. (2002). Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, *20*(2), 101–153.

Ramachandran, V. (2010). Preventive effect of syringic acid on hepatic marker enzymes and lipid profile against acetaminophen induced hepatotoxicity rats. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*, *1*(4), 393–398.

Rao, S. R. & Ravishankar, G. A. (2002). Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology advances*, *20*(2), 101-153.

Rasheeda, K., Bharathy, H. & NishadFathima, N. (2018). Vanillic acid and syringic acid: exceptionally robust aromatic moieties for inhibiting *in vitro* self-assembly of type I collagen. *International Journal of Biological Macromolecules*, *1*(113), 952-960.

Rivero-Pérez, M. D., Muniz, P. I. L. A. R. & González-Sanjosé, M. L. (2007). Antioxidant profile of red wines evaluated by total antioxidant capacity, scavenger activity, and biomarkers of oxidative stress methodologies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(14), 5476-5483.

Ryan, C. A. (1978). Proteinase inhibitors in plant leaves: a biochemical model for pest-induced natural plant protection. *Trends in Biochemical Sciences*, *3*(3), 148-150.

Saensouk, P., Muangsan, N., Saensouk, S. & Sirinajun, P. (2016). *In vitro* propagation of *Kaempferia marginata* Carey ex Roscoe, a native plant species to Thailand. *Journal of Animal and Plant Sciences*, *26*(5), 1405–1410.

Safriani, N., Rungkat, F. Z., Yuliana, N. D. & Prangdimurti, E. (2021). Immunomodulatory and antioxidant activities of select Indonesian vegetables, herbs, and spices on human lymphocytes. *International Journal of Food Science*, 1939, 1-12.

Sahoo, S., Parida, R., Singh, S., Padhy, R. N. & Nayak, S. (2014). Evaluation of yield, quality and antioxidant activity of essential oil of *in vitro* propagated *Kaempferia galanga* Linn. *Journal of Acute Disease*, *3*(2), 124–130.

Sani, S. A., Faik, A. M., Abdulla, R. & Kunasekaran, S. (2019). Phytochemical., antioxidant and antibacterial activities of two kinds of Sabah Zingberaceae. In *Journal of Physics: Conference Series*, 1358, 1-11.

Santos, N. A. G., Martins, N. M., Sisti, F. M., Fernandes, L. S., Ferreira, R. S., de Freitas, O. & Santos, A. C. (2017). The cannabinoid beta-caryophyllene (BCP) induces neuritogenesis in PC12 cells by a cannabinoid-receptor-independent mechanism. *Chemico Biological Interactions*, *261*, 86-95.

Senarath, R., Karunarathn, B. & Jimmy, G. (2017). *In vitro* propagation *of Kaempferia galanga* (Zingiberaceae) and comparison of larvicidal activity and phytochemical identities of rhizomes of tissue cultured and naturally grown plants. *Journal of Applied Biotechnology & Bioengineering*, *2*(4), 1-7.

Sereena, K., Kumar, U. P. & Shree, B. R. (2011). Histochemical and phytochemical markers for the authentication of ayurvedic raw drug hallakam (*Kaempferia rotunda*) and its marketed adulterant. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, *2*(11), 2952–2958.

Shirin, F., Kumar, S. & Mishra, Y. (2000). *In vitro* plantlet production system for *Kaempferia galanga*, a rare Indian medicinal herb. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *63*(3), 193–197.

Singh, S., Kuanar, A. & Mohanty, S. (2011). Evaluation of phytomedicinal yield potential and molecular profiling of micropropagated and conventionally grown turmeric (*Curcuma longa* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 104, 263–269.

Singh, S., Sahoo, S., Sahoo, B. C., Dash, M., Nayak, S. & Kar, B. (2022). Derivatives of cinnamic acid esters and terpenic diversity in volatiles of thirty-six sand ginger (*Kaempferia galanga* L.) accessions of eastern india revealing quality chemovars. *Molecules*, *27*(3), 11-16.

Song, L., Wu, X., Xie, J., Zhang, H., Yang, H., Zeng, Q. & Xie, W. (2021). *Kaempferia galanga* Linn. extract–a potential antibacterial agent for preservation of poultry products. *Food Science and Technology*, *147*, 111-553.

Sripanidkulchai, B., Mekjaruskul, C., Areemit, R., Cheawchanwattana, A. & Sithithaworn, J. (2019). Glucose tolerance test and pharmacokinetic study of *Kaempferia parviflora* extract in healthy subjects. *Nutrients*, *11*(5), 1176.

Srivastava, N., Singh, S., Gupta, A. C., Shanker, K., Bawankule, D. U. & Luqman, S. (2019). Aromatic ginger (*Kaempferia galanga* L.) extracts with ameliorative and protective potential as a functional food, beyond its flavor and nutritional benefits. *Toxicology Reports*, *6*, 521-528.

Suphrom, N., Sonyot, W., Insumrong, K., Sawangsup, P., Sutamuang, P. & Ingkaninan, K. (2017). GC-MS analysis and *in vitro* anti-androgenic activity of *Kaempferia rotunda* Linn extract. *Naresuan University Journal: Sciences and Technology*, *25*(4), 34–43.

Suradej, B., Sookkhee, S., Panyakaew, J., Mungkornasawakul, P., Wikan, N., Smith, D. R. & Nimlamool, W. (2019). *Kaempferia parviflora* extract inhibits STAT3 activation and interleukin-6 production in HeLa cervical cancer cells. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(17), 1-21.

Suthisut, D., Fields, P. G. & Chandrapatya, A. (2011). Contact toxicity, feeding reduction, and repellency of essential oils from three plants from the ginger family (Zingiberaceae) and their major components against *Sitophilus zeamais* and *Tribolium castaneum*. *Journal of Economic Entomology*, *104*(4), 1445-1454.

Swapna, T. S., Binitha, M. & Manju, T. S. (2004). *In vitro* multiplication in *Kaempferia galanga* Linn. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *118*(1–3), 233–241.

Techaprasan, J., Klinbunga, S., Ngamriabsakul, C. & Jenjittikul, T. (2010). Genetic variation of *Kaempferia* (Zingiberaceae) in Thailand based on chloroplast DNA (*psba-trnh* and *peta-psbj*) sequences. *Genetics and Molecular Research*, *9*(4), 1957-1973.

Tokmak, M., Sehitoglu, M. H., Yuksel, Y., Guven, M., Akman, T., Aras, A. B. & Cosar, M. (2017). The axon protective effects of syringic acid on ischemia/reperfusion injury in a rat sciatic nerve model. *Turkish Neurosurgery*, *27*(1), 124–132.

Tu, X., Liu, Y., Yanli, Y., Wenxiu, L., Ping, L., Du, L. & Jian-Neng, L. (2022). effects of four drying methods on *Amomum villosum* Lour.'Guiyan1'volatile organic compounds analyzed via headspace solid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry coupled with OPLS-DA. *the Royal Society of Chemistry*, *12*(41), 26485-26496.

Tuan, N. H., Tung, N. T. & Khanh, P. N. (2019). Research on chemical compositions and anti-microbial activity of the essential oil of the rhizome of *Kaempferia daklakensis* NH Tuan & ND Trong–A new record from Vietnam flora. *Journal of King Saud University Science*, *31*(4), 1505-1510.

Vallianou, I. & Hadzopoulou-Cladaras, M. (2016). Camphene, a plant derived monoterpene, exerts its hypolipidemic action by affecting SREBP-1 and MTP expression. *Public Library of Science One*, *11*(1), 1-21.

Varghese, B. A., Nair, R. V. R., Jude, S., Varma, K., Amalraj, A. & Kuttappan, S. (2021). Green synthesis of gold nanoparticles using *Kaempferia parviflora* rhizome extract and their characterization and application as an antimicrobial., antioxidant and catalytic degradation agent. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, *126*, 166-172.

Victório, C.P., Kuster, R.M. & Lage, C. L. S. (2011). Leaf and root volatiles procuced by tissue culture of *Alpinia zerumbet* (Pers) Burtt & Smith under the influence of different plant groeth regulators. *Quim. Nova*, *34*(3), 430-433.

Wang, S., Raquel, M., Goya, L., Miryam, A.-B., Beatriz, S. & Laura, B. (2016). A phenolic extract from grape by-products and its main hydroxybenzoic acids protect $CaCo_2$ cells against pro-oxidant induced toxicity. *Food and Chemical Toxicology*, *88*, 65–74.

Wojcicki, J., Barcew-Wiszniewska, B., Samochowiec, L. & Rozewicka, L. (1995). *Extractum Fagopyri* reduces atherosclerosis in high-fat diet fed rabbits. *Die Pharmazie*, *50*(8), 560-562.

Yan, S. L., Wang, Z. H., Yen, H. F., Lee, Y. J. & Yin, M. C. (2016). Reversal of ethanol-induced hepatotoxicity by cinnamic and syringic acids in mice. *Food and Chemical Toxicology*, *98*, 119–126.

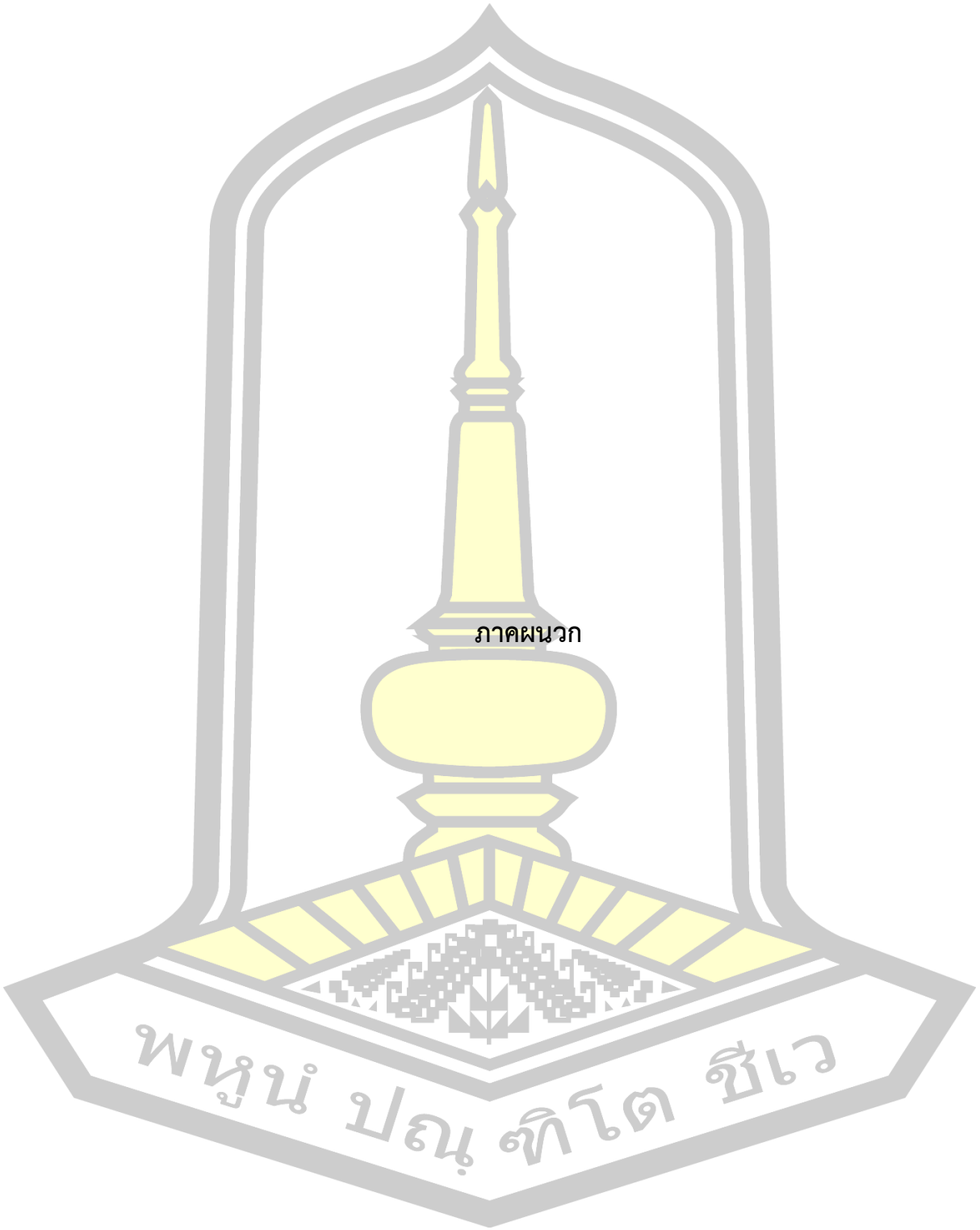
Yeap, Y. S. Y., Kassim, N. K., Ng, R. C., Ee, G. C. L., Saiful Yazan, L. & Musa, K. H. (2017). Antioxidant properties of ginger (*Kaempferia angustifolia* Rosc.) and its chemical markers. *International Journal of Food Properties*, *20*(1), 1158-1172.

Zhishen, J., Mengcheng, T. & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food chemistry*, *64*(4), 555-559.

Zhong, J.J. (2002). Plant cell culture for production of paclitaxel and other taxanes. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *94*(6), 591–599.

Zhou, X., Huang, S., Wang, P., Luo, Q., Huang, X., Xu, Q. & Chen, X. (2017). A syringic acid derivative and two iridoid glycosides from the roots of *Stachys geobombycisand* their antioxidant properties. *Natural Product Research*, *23*, 1–6.

Zuraida, A., Izzati, K., Nazreena, O. & Omar, N. (2015). *In vitro* microrhizome formation in *Kaempferia parviflora*. *Annual Research & Review in Biology*, *5*(5), 460–467.




**ภาคผนวก**

**ตารางภาคผนวก 1** การแบ่งกลุ่มสารเคมี และการเตรียมสารละลายเข้มข้นของสูตรอาหาร MS (Murashige and Skoog, 1962)

| สารเคมี | ปริมาณสารเคมี (มก./ล.) | ความเข้มข้น (เท่า) | ปริมาณสารเคมีใน Stock solution (มก./ล.) | ปริมาตรที่ใช้ (มล/ล) |
|---|---|---|---|---|
| Stock solution 1 | | | | 50 |
| $NH_4NO_3$ | 1,650 | 20 | 33,000 | |
| $KNO_3$ | 1,900 | 20 | 38,000 | |
| $CaCl_2.2H_2O$ | 440 | 20 | 8,800 | |
| $MgSO_4.7H_2O$ | 370 | 20 | 7,400 | |
| $KH_2PO_4$ | 170 | 20 | 3,400 | |
| Stock solution 2 | | | | 5 |
| KI | 0.83 | 200 | 166 | |
| $H_3BO_3$ | 6.2 | 200 | 1,240 | |
| $MnSO_4.4H_2O$ | 22.3 | 200 | 4,460 | |
| $ZnSO_4.7H_2O$ | 8.6 | 200 | 1,720 | |
| $Na_2MoO_4.2H_2O$ | 0.25 | 200 | 50 | |
| $CuSO_4.5H_2O$ | 0.025 | 200 | 5 | |
| $CoCl_2.6H_2O$ | 0.025 | 200 | 5 | |
| Stock solution 3 | | | | 5 |
| $FeSO_4.7H_2O$ | 27.85 | 200 | 5,560 | |
| $Na_2EDTA.2H_2O$ | 37.3 | 200 | 7,460 | |
| Stock solution 4 | | | | 5 |
| Myo-inosital | 100 | 200 | 20,000 | |
| Nicotinic acid | 0.5 | 200 | 100 | |
| Pyridoxine HCl | 0.5 | 200 | 100 | |
| Thiamine HCl | 0.5 | 200 | 100 | |
| Glycine | 2 | 200 | 400 | |

**ตารางภาคผนวก 2** การวิเคราะห์ผลทางสถิติการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของใบและเหง้าเปราะโคราชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ และใบที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมนด้วยเทคนิค DPPH assay

**Descriptive**

| DPPH | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95 เปอร์เซ็นต์ Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| LN | 3 | 8.1772 | .70442 | .40670 | 6.4274 | 9.9271 | 7.38 | 8.70 |
| RN | 3 | 4.0503 | .39401 | .22748 | 3.0715 | 5.0291 | 3.60 | 4.29 |
| LT | 3 | 7.8064 | .69576 | .40170 | 6.0781 | 9.5348 | 7.10 | 8.50 |
| Total | 9 | 6.6780 | 2.04782 | .68261 | 5.1039 | 8.2521 | 3.60 | 8.70 |

หมายเหตุ: LN = ใบในธรรมชาติ, RN = เหง้าในธรรมชาติ, LT = ใบในหลอดทดลอง

**ANOVA**

| DPPH | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Between Groups | 31.278 | 2 | 15.639 | 41.317 | .000 |
| Within Groups | 2.271 | 6 | .379 | | |
| Total | 33.549 | 8 | | | |

**Duncan**

| DPPH Sample | N | Subset for alpha = 0.05 | |
|---|---|---|---|
| | | 1 | 2 |
| RN | 3 | 4.0503 | |
| LT | 3 | | 7.8064 |
| LN | 3 | | 8.1772 |
| Sig. | | 1.000 | .488 |

หมายเหตุ: LN = ใบในธรรมชาติ, RN = เหง้าในธรรมชาติ, LT = ใบในหลอดทดลอง

**ตารางภาคผนวก 3** การวิเคราะห์ผลทางสถิติการเปรียบเทียบ % inhibition ของใบและเหง้าเปราะโคราชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ และใบที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมน

**Descriptive**

| % inhibition | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95 เปอร์เซ็นต์ Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| LN | 3 | 46.0367 | 3.86699 | 2.23261 | 36.4305 | 55.6428 | 41.64 | 48.91 |
| RN | 3 | 23.3867 | 2.16288 | 1.24874 | 18.0138 | 28.7595 | 20.89 | 24.69 |
| LT | 3 | 44.0067 | 3.82053 | 2.20578 | 34.5159 | 53.4974 | 40.15 | 47.79 |
| Total | 9 | 37.8100 | 11.24046 | 3.74682 | 29.1698 | 46.4502 | 20.89 | 48.91 |

หมายเหตุ: LN = ใบในธรรมชาติ, RN = เหง้าในธรรมชาติ, LT = ใบในหลอดทดลอง

**ANOVA**

| % Inhibition | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Between Groups | 942.328 | 2 | 471.164 | 41.296 | .000 |
| Within Groups | 68.456 | 6 | 11.409 | | |
| Total | 1010.784 | 8 | | | |

**Duncan**

| Inhibition Sample | N | Subset for alpha = 0.05 | |
|---|---|---|---|
| | | 1 | 2 |
| RN | 3 | 23.3867 | |
| LT | 3 | | 44.0067 |
| LN | 3 | | 46.0367 |
| Sig. | | 1.000 | .489 |

หมายเหตุ: LN = ใบในธรรมชาติ, RN = เหง้าในธรรมชาติ, LT = ใบในหลอดทดลอง

**ตารางภาคผนวก 4** การวิเคราะห์ผลทางสถิติเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของใบและเหง้าเปราะโคราชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ และใบที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมน ด้วยเทคนิค FRAP assay

**Descriptive**

| FRAP | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95 เปอร์เซ็นต์ Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| LN | 3 | 28.9733 | 2.03021 | 1.17214 | 23.9300 | 34.0166 | 26.72 | 30.66 |
| RN | 3 | 14.9467 | 1.42693 | .82384 | 11.4020 | 18.4914 | 13.30 | 15.82 |
| LT | 3 | 28.1800 | 1.63805 | .94573 | 24.1109 | 32.2491 | 26.42 | 29.66 |
| Total | 9 | 24.0333 | 6.98373 | 2.32791 | 18.6652 | 29.4015 | 13.30 | 30.66 |

หมายเหตุ: LN = ใบในธรรมชาติ, RN = เหง้าในธรรมชาติ, LT = ใบในหลอดทดลอง

**ANOVA**

| FRAP | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Between Groups | 372.498 | 2 | 186.249 | 63.199 | .000 |
| Within Groups | 17.682 | 6 | 2.947 | | |
| Total | 390.180 | 8 | | | |

**Duncan**

| FRAP Sample | N | Subset for alpha = 0.05 | |
|---|---|---|---|
| | | 1 | 2 |
| RN | 3 | 14.9467 | |
| LT | 3 | | 28.1800 |
| LN | 3 | | 28.9733 |
| Sig. | | 1.000 | .592 |

หมายเหตุ: LN = ใบในธรรมชาติ, RN = เหง้าในธรรมชาติ, LT = ใบในหลอดทดลอง

**ตารางภาคผนวก 5** การวิเคราะห์ผลทางสถิติเปรียบเทียบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของใบและเหง้าเปราะโคราชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ และใบที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมน

**Descriptive**

| TPC | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95 เปอร์เซ็นต์ Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| LN | 3 | 78.2593 | 1.10477 | .63784 | 75.5149 | 81.0036 | 77.11 | 79.31 |
| RN | 3 | 62.5617 | .40332 | .23286 | 61.5598 | 63.5636 | 62.11 | 62.89 |
| LT | 3 | 107.2099 | 2.44846 | 1.41362 | 101.1276 | 113.2922 | 104.59 | 109.44 |
| Total | 9 | 82.6770 | 19.66203 | 6.55401 | 67.5634 | 97.7905 | 62.11 | 109.44 |

หมายเหตุ: LN = ใบในธรรมชาติ, RN = เหง้าในธรรมชาติ, LT = ใบในหลอดทดลอง

**ANOVA**

| TPC | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Between Groups | 3078.008 | 2 | 1539.004 | 625.769 | .000 |
| Within Groups | 14.756 | 6 | 2.459 | | |
| Total | 3092.764 | 8 | | | |

**Duncan**

| TPC sample | N | Subset for alpha = 0.05 | | |
|---|---|---|---|---|
| | | 1 | 2 | 3 |
| RN | 3 | 62.5617 | | |
| LN | 3 | | 78.2593 | |
| LT | 3 | | | 107.2099 |
| Sig. | | 1.000 | 1.000 | 1.000 |

หมายเหตุ: LN = ใบในธรรมชาติ, RN = เหง้าในธรรมชาติ, LT = ใบในหลอดทดลอง

**ตารางภาคผนวก 6** การวิเคราะห์ผลทางสถิติเปรียบเทียบปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของใบและเหง้าเปราะโคราชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ และใบที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมน

**Descriptive**

| TFC | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95 เปอร์เซ็นต์ Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| LN | 3 | 15.2030 | .18549 | .10709 | 14.7422 | 15.6638 | 15.00 | 15.36 |
| RN | 3 | 12.6000 | .52326 | .30210 | 11.3001 | 13.8999 | 12.09 | 13.14 |
| LT | 3 | 15.7303 | .34800 | .20092 | 14.8658 | 16.5948 | 15.41 | 16.10 |
| Total | 9 | 14.5111 | 1.48792 | .49597 | 13.3674 | 15.6548 | 12.09 | 16.10 |

หมายเหตุ: LN = ใบในธรรมชาติ, RN = เหง้าในธรรมชาติ, LT = ใบในหลอดทดลอง

**ANOVA**

| TFC | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Between Groups | 16.853 | 2 | 8.426 | 58.882 | .000 |
| Within Groups | .859 | 6 | .143 | | |
| Total | 17.711 | 8 | | | |

**Duncan**

| TFC sample | N | Subset for alpha = 0.05 | |
|---|---|---|---|
| | | 1 | 2 |
| RN | 3 | 12.6000 | |
| LN | 3 | | 15.2030 |
| LT | 3 | | 15.7303 |
| Sig. | | 1.000 | .139 |

หมายเหตุ: LN = ใบในธรรมชาติ, RN = เหง้าในธรรมชาติ, LT = ใบในหลอดทดลอง

**ตารางภาคผนวก 7** การวิเคราะห์ผลทางสถิติเปรียบเทียบปริมาณกรดแกลลิกในใบเปราะโคราชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ และใบที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมน ด้วยเทคนิค HPLC

**Descriptive**

| กรดแกลลิก | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95 เปอร์เซ็นต์ Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| LT | 3 | 169.8000 | 1.00135 | .57813 | 167.3125 | 172.2875 | 168.74 | 170.73 |
| LN | 3 | 78.2233 | 1.22680 | .70829 | 75.1758 | 81.2709 | 76.96 | 79.41 |
| RN | 3 | 28.7000 | .14731 | .08505 | 28.3341 | 29.0659 | 28.54 | 28.83 |
| Total | 9 | 92.2411 | 62.00112 | 20.66704 | 44.5828 | 139.8994 | 28.54 | 170.73 |

หมายเหตุ: LN = ใบในธรรมชาติ, RN = เหง้าในธรรมชาติ, LT = ใบในหลอดทดลอง

**ANOVA**

| กรดแกลลิก | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Between Groups | 30748.056 | 2 | 15374.028 | 18234.157 | .000 |
| Within Groups | 5.059 | 6 | .843 | | |
| Total | 30753.115 | 8 | | | |

**Duncan**

| กรดแกลลิก | N | Subset for alpha = 0.05 | | |
|---|---|---|---|---|
| | | 1 | 2 | 3 |
| RN | 3 | 28.7000 | | |
| LN | 3 | | 78.2233 | |
| LT | 3 | | | 169.8000 |
| Sig. | | 1.000 | 1.000 | 1.000 |

หมายเหตุ: LN = ใบในธรรมชาติ, RN = เหง้าในธรรมชาติ, LT = ใบในหลอดทดลอง

**ตารางภาคผนวก 7** การวิเคราะห์ผลทางสถิติเปรียบเทียบปริมาณกรดวานิลลิกในใบเปราะโคราชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ และใบที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมน ด้วยเทคนิค HPLC

**Descriptive**

| กรดวานิลลิก | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95 เปอร์เซ็นต์ Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| LT | 3 | 138.7667 | 3.22132 | 1.85983 | 130.7645 | 146.7689 | 135.60 | 142.04 |
| LN | 3 | 1.8233 | .06028 | .03480 | 1.6736 | 1.9731 | 1.76 | 1.88 |
| RN | 3 | 16.2067 | 1.24275 | .71750 | 13.1195 | 19.2938 | 15.43 | 17.64 |
| Total | 9 | 52.2656 | 65.19697 | 21.73232 | 2.1507 | 102.3804 | 1.76 | 142.04 |

หมายเหตุ: LN = ใบในธรรมชาติ, RN = เหง้าในธรรมชาติ, LT = ใบในหลอดทดลอง

**ANOVA**

| กรดวานิลลิก | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Between Groups | 33981.310 | 2 | 16990.655 | 4274.379 | .000 |
| Within Groups | 23.850 | 6 | 3.975 | | |
| Total | 34005.160 | 8 | | | |

**Duncan**

| กรดวานิลลิก | N | Subset for alpha = 0.05 | | |
|---|---|---|---|---|
| | | 1 | 2 | 3 |
| LN | 3 | 1.8233 | | |
| RN | 3 | | 16.2067 | |
| LT | 3 | | | 138.7667 |
| Sig. | | 1.000 | 1.000 | 1.000 |

หมายเหตุ: LN = ใบในธรรมชาติ, RN = เหง้าในธรรมชาติ, LT = ใบในหลอดทดลอง

**ตารางภาคผนวก 8** การวิเคราะห์ผลทางสถิติเปรียบเทียบปริมาณกรดชินนามิกในใบเปราะโคราชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ และใบที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมน ด้วยเทคนิค HPLC

**Descriptive**

| กรดชินนามิก | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95 เปอร์เซ็นต์ Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| LT | 3 | 15.0300 | 1.92190 | 1.10961 | 10.2557 | 19.8043 | 13.75 | 17.24 |
| LN | 3 | 8.8600 | .22271 | .12858 | 8.3068 | 9.4132 | 8.62 | 9.06 |
| RN | 3 | 24.8800 | 2.10545 | 1.21558 | 19.6498 | 30.1102 | 23.60 | 27.31 |
| Total | 9 | 16.2567 | 7.14217 | 2.38072 | 10.7667 | 21.7466 | 8.62 | 27.31 |

หมายเหตุ: LN = ใบในธรรมชาติ, RN = เหง้าในธรรมชาติ, LT = ใบในหลอดทดลอง

**ANOVA**

| กรดชินนามิก | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Between Groups | 391.732 | 2 | 195.866 | 71.867 | .000 |
| Within Groups | 16.352 | 6 | 2.725 | | |
| Total | 408.084 | 8 | | | |

**Duncan**

| กรดชินนามิก | N | Subset for alpha = 0.05 | | |
|---|---|---|---|---|
| | | 1 | 2 | 3 |
| LN | 3 | 8.8600 | | |
| LT | 3 | | 15.0300 | |
| RN | 3 | | | 24.8800 |
| Sig. | | 1.000 | 1.000 | 1.000 |

หมายเหตุ: LN = ใบในธรรมชาติ, RN = เหง้าในธรรมชาติ, LT = ใบในหลอดทดลอง

**ตารางภาคผนวก 9** การวิเคราะห์ผลทางสถิติเปรียบเทียบปริมาณกรดคาเฟอิกมิกในใบเปราะโคราชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ และใบที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมน ด้วยเทคนิค HPLC

**Descriptive**

| กรดคาเฟอิก | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95 เปอร์เซ็นต์ Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| LT | 3 | 1470.4847 | 3.90189 | 2.25276 | 1460.7919 | 1480.1776 | 1466.19 | 1473.80 |
| LN | 3 | 413.3903 | 3.67170 | 2.11985 | 404.2693 | 422.5113 | 409.86 | 417.19 |
| RN | 3 | 3.0539 | .33629 | .19416 | 2.2185 | 3.8893 | 2.70 | 3.36 |
| Total | 9 | 628.9763 | 655.67099 | 218.5570 | 124.9830 | 1132.9696 | 2.70 | 1473.80 |

หมายเหตุ: LN = ใบในธรรมชาติ, RN = เหง้าในธรรมชาติ, LT = ใบในหลอดทดลอง

**ANOVA**

| กรดคาเฟอิก | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Between Groups | 3439177.904 | 2 | 1719588.952 | 179004.459 | .000 |
| Within Groups | 57.638 | 6 | 9.606 | | |
| Total | 3439235.542 | 8 | | | |

**Duncan**

| กรดคาเฟอิก | N | Subset for alpha = 0.05 | | |
|---|---|---|---|---|
| | | 1 | 2 | 3 |
| RN | 3 | 3.0539 | | |
| LN | 3 | | 413.3903 | |
| LT | 3 | | | 1470.4847 |
| Sig. | | 1.000 | 1.000 | 1.000 |

หมายเหตุ: LN = ใบในธรรมชาติ, RN = เหง้าในธรรมชาติ, LT = ใบในหลอดทดลอง

**ตารางภาคผนวก 10** การวิเคราะห์ผลทางสถิติเปรียบเทียบปริมาณกรดไซรินจิกในใบเปราะโคราชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ และใบที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมน ด้วยเทคนิค HPLC

**Descriptive**

| กรดไซรินจิก | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95 เปอร์เซ็นต์ Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| LT | 3 | 6126.6700 | 7.95512 | 4.59289 | 6106.9084 | 6146.4316 | 6118.69 | 6134.60 |
| LN | 3 | .0000 | .00000 | .00000 | .0000 | .0000 | .00 | .00 |
| RN | 3 | 35.0000 | .00000 | .00000 | 35.0000 | 35.0000 | 35.00 | 35.00 |
| Total | 9 | 2050.0211 | 3057.52281 | 1019.17427 | -300.1990 | 4400.2412 | .00 | 6134.60 |

หมายเหตุ: LN = ใบในธรรมชาติ, RN = เหง้าในธรรมชาติ, LT = ใบในหลอดทดลอง

**ANOVA**

| กรดไซรินจิก | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Between Groups | 74786618.607 | 2 | 37393309.303 | 236802.385 | .000 |
| Within Groups | 947.456 | 6 | 157.909 | | |
| Total | 74787566.063 | 8 | | | |

**Duncan**

| กรดไซรินจิก | N | Subset for alpha = 0.05 | |
|---|---|---|---|
| | | 1 | 2 |
| LN | 3 | .0000 | |
| RN | 3 | 23.3933 | |
| LT | 3 | | 6126.6700 |
| Sig. | | .063 | 1.000 |

หมายเหตุ: LN = ใบในธรรมชาติ, RN = เหง้าในธรรมชาติ, LT = ใบในหลอดทดลอง

**ตารางภาคผนวก 11** การวิเคราะห์ผลทางสถิติเปรียบเทียบปริมาณกรดเฟรูลิกในใบเปราะโคราชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ และใบที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมน ด้วยเทคนิค HPLC

**Descriptive**

| กรดเฟรูลิก | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95 เปอร์เซ็นต์ Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| LT | 3 | 70.2533 | .46694 | .26959 | 69.0934 | 71.4133 | 69.94 | 70.79 |
| LN | 3 | 28.8933 | .87523 | .50532 | 26.7191 | 31.0675 | 27.89 | 29.50 |
| RN | 3 | 20.0700 | 0.0000 | 0.0000 | 20.0700 | 20.0700 | 20.07 | 20.07 |
| Total | 9 | 37.5089 | 26.17907 | 8.72636 | 17.3859 | 57.6319 | .00 | 70.79 |

หมายเหตุ: LN = ใบในธรรมชาติ, RN = เหง้าในธรรมชาติ, LT = ใบในหลอดทดลอง

**ANOVA**

| กรดเฟรูลิก | Sum of Squares | Df | Mean Square | F | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Between Groups | 5185.889 | 2 | 2592.945 | 52.408 | .000 |
| Within Groups | 296.859 | 6 | 49.476 | | |
| Total | 5482.748 | 8 | | | |

**Duncan**

| กรดเฟรูลิก | N | Subset for alpha = 0.05 | | |
|---|---|---|---|---|
| | | 1 | 2 | 3 |
| RN | 3 | 13.3800 | | |
| LN | 3 | | 28.8933 | |
| LT | 3 | | | 70.2533 |
| Sig. | | 1.000 | 1.000 | 1.000 |

หมายเหตุ: LN = ใบในธรรมชาติ, RN = เหง้าในธรรมชาติ, LT = ใบในหลอดทดลอง

**ตารางภาคผนวก 12** การวิเคราะห์ผลทางสถิติเปรียบเทียบปริมาณกรดคูมาริกในใบเปราะโคราชที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ และใบที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมน ด้วยเทคนิค HPLC

**Descriptive**

| กรดคูมาริก | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95 เปอร์เซ็นต์ Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| LT | 3 | 55.7433 | .29704 | .17150 | 55.0054 | 56.4812 | 55.41 | 55.98 |
| LN | 3 | 29.7233 | 1.23314 | .71195 | 26.6600 | 32.7866 | 28.30 | 30.47 |
| RN | 3 | 11.7833 | .06429 | .03712 | 11.6236 | 11.9430 | 11.71 | 11.83 |
| Total | 9 | 32.4167 | 19.15265 | 6.38422 | 17.6946 | 47.1387 | 11.71 | 55.98 |

หมายเหตุ: LN = ใบในธรรมชาติ, RN = เหง้าในธรรมชาติ, LT = ใบในหลอดทดลอง

**ANOVA**

| กรดคูมาริก | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Between Groups | 2931.366 | 2 | 1465.683 | 2726.006 | .000 |
| Within Groups | 3.226 | 6 | .538 | | |
| Total | 2934.592 | 8 | | | |

**Duncan**

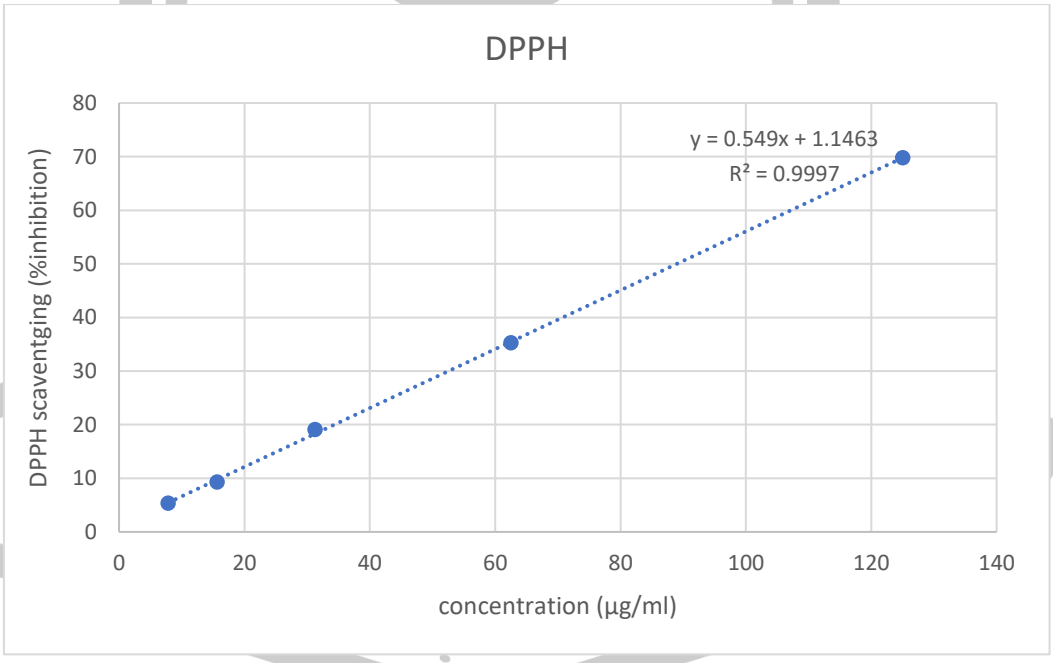
| กรดคูมาริก | N | Subset for alpha = 0.05 | | |
|---|---|---|---|---|
| | | 1 | 2 | 3 |
| RN | 3 | 11.7833 | | |
| LN | 3 | | 29.7233 | |
| LT | 3 | | | 55.7433 |
| Sig. | | 1.000 | 1.000 | 1.000 |

หมายเหตุ: LN = ใบในธรรมชาติ, RN = เหง้าในธรรมชาติ, LT = ใบในหลอดทดลอง

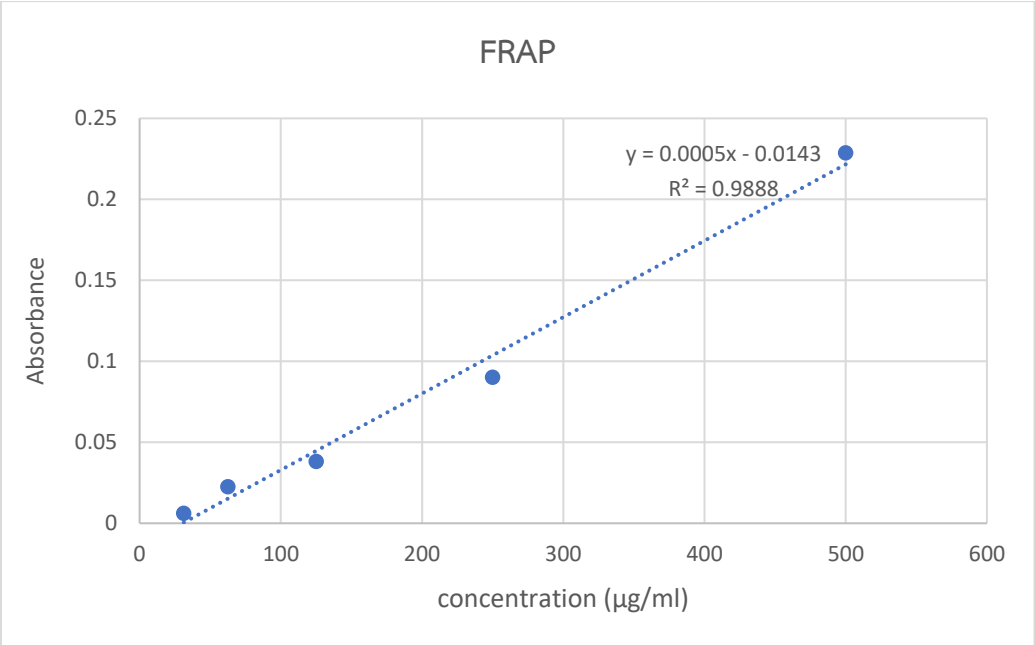
**ตารางภาคผนวก 13** สมการสารมาตรฐานกรดฟีนอลิกและสารประกอบฟลาโวนอยด์ด้วยเทคนิค HPLC

| สารมาตรฐาน | Calibration curve | $r^2$ | Linear rang (µg/ml) |
|---|---|---|---|
| Gallic acid | y=32282x-153589 | 0.996 | 5.77- 34.15 |
| Vanillic acid | y=21320x-5203 | 0.9986 | 0.35- 28.41 |
| Cinnamic acid | y=98924x+39386 | 0.9998 | 1.72- 5.46 |
| Caffeic acid | y=1574.7x+4485.2 | 0.9551 | 0.5390-294.7608 |
| Syringic acid | y=774.35x-4162.6 | 0.9993 | 7.00- 1,226.92 |
| Ferulic acid | y=62448x-172995 | 0.9987 | 3.29- 14.16 |
| *p*-coumaric acid | y=81159x-165836 | 0.9992 | 2.342-11.195 |
| Rutin | y=26626x-11367 | 0.9996 | 1.15- 18.93 |
| Kaempferol | y=53916x+19303 | 0.9958 | 9.29- 50.91 |
| Quercetin | y=43398x+28906 | 0.9995 | 6.66- 19.46 |

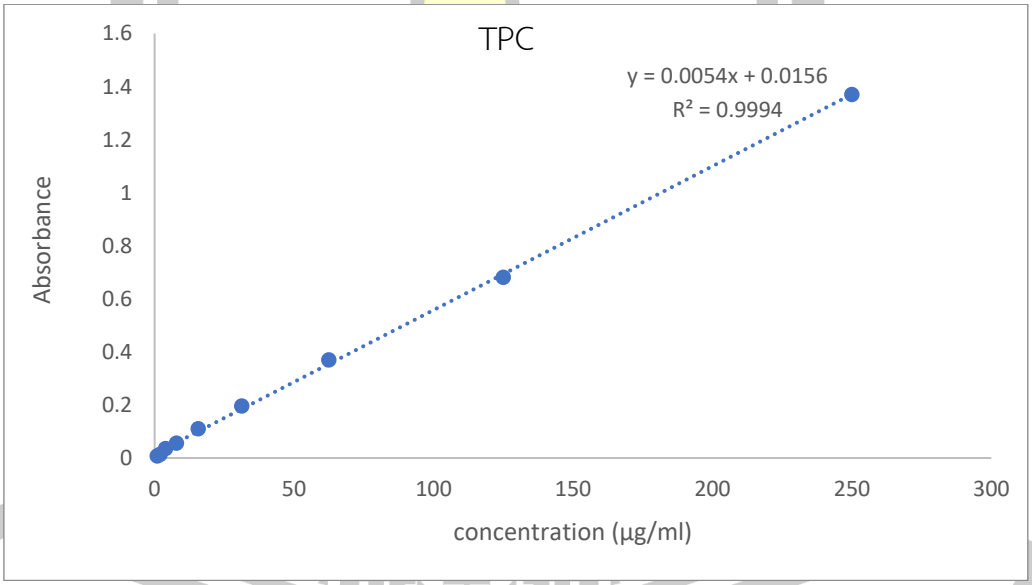
**กราฟมาตรฐาน**



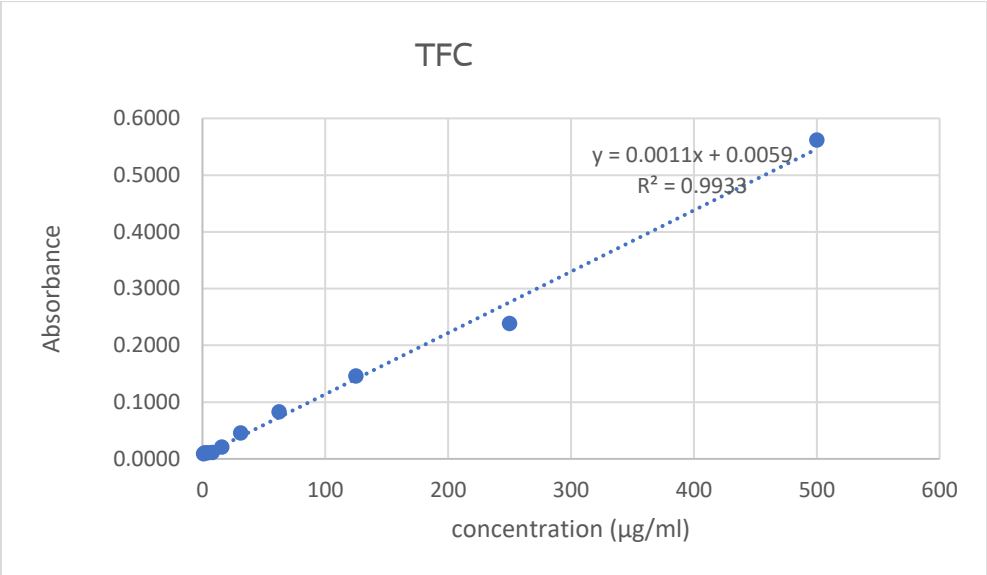

**ภาพภาคผนวก 1** กราฟมาตรฐานของ DPPH และ % inhibition




**ภาพภาคผนวก 2** กราฟมาตรฐานของ FRAP

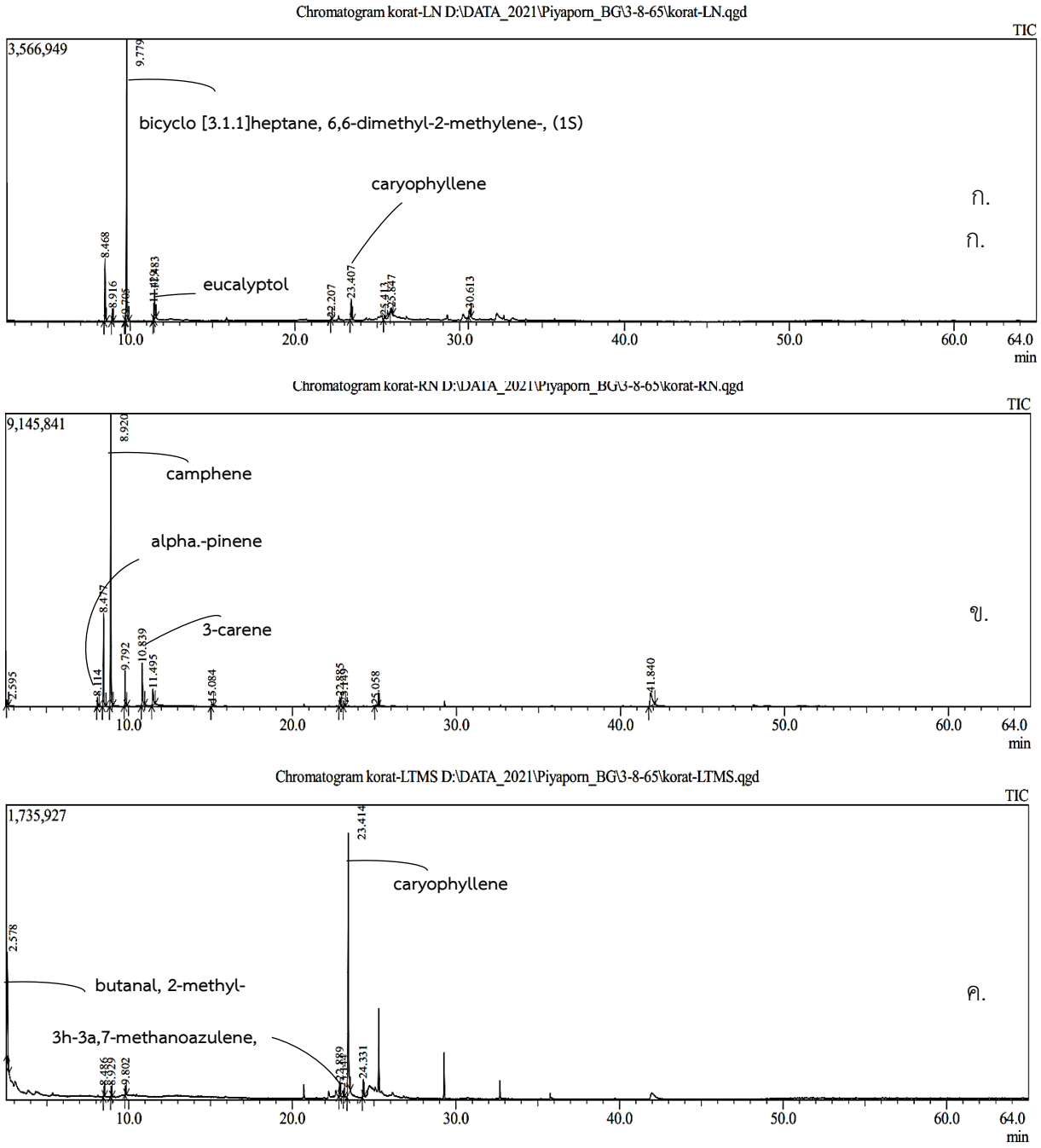



**ภาพภาคผนวก 3** กราฟมาตรฐานของ TPC




**ภาพภาคผนวก 4** กราฟมาตรฐานของ TFC

พหุน ปณ ฑิโต ชีเว




**ภาพภาคผนวก 5** โครมาโทรแกรมแสดงค่าเวลาคงค้างสารสกัดจากชิ้นส่วน ใบ และเหง้าเปราะโคราช ที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ และใบที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง

(ก) โครมาโทรแกรมของใบในสภาพธรรมชาติ

(ข) โครมาโทรแกรมของเหง้าในสภาพธรรมชาติ

(ค) โครมาโทรแกรมใบในหลอดทดลอง

# ประวัติผู้เขียน

| | |
|---|---|
| **ชื่อ** | นายสิทธิศักดิ์ สะลิวรรณ์ |
| **วันเกิด** | 1 กรกฎาคม 2537 |
| **สถานที่เกิด** | จังหวัดนครราชสีมา ประเทศไทย |
| **สถานที่อยู่ปัจจุบัน** | 169 ตำบลละหานปลาค้าว อำเภแอเมืองยาง จังหวัดนครราชสีมา 30270 |
| **ประวัติการศึกษา** | พ.ศ. 2555 มัธยมศึกษาตอนปลายโรงเรียนจุฬาภรณราชวิทยาลัย บุรีรัมย์ อำเภอสตึก จังหวัดบุรีรัมย์<br>พ.ศ. 2559 ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.) สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม<br>พ.ศ. 2565 ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วท.ม.) สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม |
| **ทุนวิจัย** | ทุนอุดหนุนการวิจัยสำหรับนิสิตระดับบัณฑิตศึกษา (ปริญญาโท) งบประมาณเงินรายได้ คณะวิทยาศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ.2565 |
| **ผลงานวิจัย** | สิทธิศักดิ์ สะลิวรรณ์, สุรพล แสนสุข และปิยะพร แสนสุข. (2565). การขยายพันธุ์ในหลอดทดลองของเปราะโคราช (Kaempferia koratensis Picheans.) พืชถิ่นเดียวของประเทศไทย. วารสารวิทยาศาสตร์ คชศาสน์, 44(1), 1-13. |

พหุน ปณ ฑิโต ชีเว