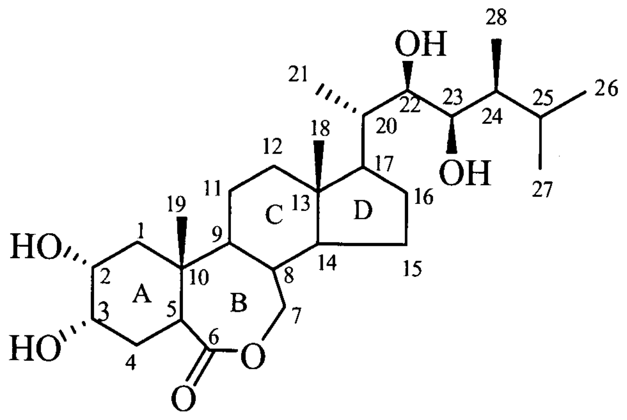
บทที่ 2
ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ฮอร์โมนพืชบราสสิโนไลด์ (Brassinolide)

พืชเป็นสิ่งมีชีวิตที่เจริญเติบโต โดยสะสมพลังงานจากแสงอาทิตย์มาสร้างโมเลกุลที่ใหญ่และซับซ้อนอย่างต่อเนื่องจากไอออนและโมเลกุลของสารที่มีขนาดเล็ก ซึ่งเป็นวัตถุดิบในการเจริญเติบโต การเจริญเติบโตของพืช ขึ้นกับปัจจัยต่างๆ เช่น ปริมาณแสง อาหาร น้ำ ชนิดของดิน แร่ธาตุต่างๆในดิน อุณหภูมิ สารควบคุมการเจริญเติบโต และฮอร์โมนพืช เป็นต้น (นพดล จรัสสัมฤทธิ์, 2537; พีรเดช ทองอำไพ, 2537)

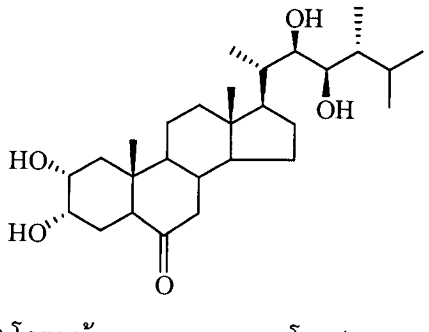
ฮอร์โมนพืช (Plant hormones) คือ สารอินทรีย์ที่พืชสร้างขึ้นในส่วนใดส่วนหนึ่ง เช่น ใบอ่อน ราก หรือลำต้น แล้วลำเลียงไปยังส่วนอื่นๆ และทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสรีระของพืช มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการเจริญเติบโตของพืช การขยายพันธุ์ การเร่งการออกดอก การติดผล การเพิ่มขนาดผล เป็นต้น ฮอร์โมนพืชที่พืชสร้างขึ้นนี้จะอยู่ในระดับน้อยมากที่ 10^{-6}-10^{-5} โมลาร์ (อานัฐ ตันโช, 2555) ฮอร์โมนพืชที่รู้จักกันดี มีอยู่ 5 กลุ่ม ได้แก่ ออกซิน (Auxins), ไซโตไคนิน (Cytokinins), จิบเบอเรลลิน (Gibberellins), กรดแอบไซซิก (Abscisic acids) และเอทธิลีน (Ethylene) ต่อมาในปี ค.ศ. 1970 ได้มีการค้นพบฮอร์โมนพืชกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์ (BRs) ในสารที่สกัดจากเกสรดอกไม้ โดยบราสสิโนสเตียรอยด์ จัดเป็นฮอร์โมนพืชกลุ่มใหม่ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูง ช่วยในการเจริญเติบโตของพืชได้ดีมาก โดยใช้ในปริมาณที่น้อยมากเมื่อเทียบกับฮอร์โมนพืชกลุ่มอื่นๆ ที่กล่าวมา ออกฤทธิ์ได้ในระดับนาโนโมลาร์หรือต่ำกว่า (Hooley, R., 1996) ปัจจุบันมีฮอร์โมนมากกว่า 60 ชนิดในกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์ ที่ถูกค้นพบและมีรายงานสูตรโครงสร้าง (Bajguz, A., and Tretyn, A., 2003) โดยสารกลุ่มนี้จะอยู่ในรูปสเตียรอยด์อิสระ หรืออยู่กับสารประกอบน้ำตาลและกรดไขมัน สามารถพบได้ในพืชหลากหลายชนิดมาก ทั้งพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ใบเลี้ยงคู่ พืชไร้ดอก (จิมโนสเปิร์ม) เช่น เฟิร์น เกสรของถั่วลันเตา เกสรของข้าวโพด เกสรดอกทานตะวัน เกสรดอกบัควีท เกสรดอกส้ม เมล็ดต้นเอ็ลดา ใบชาเขียว ใบต้นเกาลัด ใบสาหร่าย ถั่วเหลือง ถั่วลิสงเถา (Pinto peanut) เป็นต้น (Takatsuto, S., 1994)

บราสสิโนสเตียรอยด์ตัวแรกที่ถูกค้นพบ คือ บราสสิโนไลด์ (Brassinolide) โครงสร้าง ดังในรูปที่ 2-1 มีวง 4 วงติดกันและมีคาร์บอน 28 ตัวต่อกันเป็นโครงสร้างหลัก ตัวอื่นๆจะแตกต่างกันที่จำนวนของหมู่ไฮดรอกซิลที่ต่ออยู่กับวง A การมีหรือไม่มีกลุ่มคีโตน หรือแลกโตนที่ต่ออยู่กับคาร์บอนตัวที่ 6 ในวง B หรือชนิดของหมู่ต่างๆที่มาต่ออยู่กับโครงสร้างหลัก และการวางตัวของหมู่ต่างๆที่มาต่ออยู่กับโครงสร้างหลัก (Zullo, M. A. T., and Adam, G., 2002)



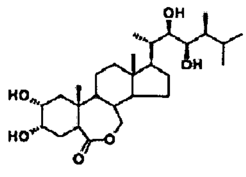
รูปที่ 2.1 โครงสร้างของบราสสิโนไลด์ (Brassinolide) มีคาร์บอน 28 ตัวเป็นโครงสร้างหลัก

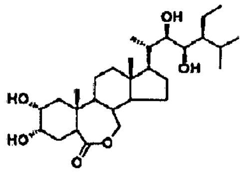
นอกจากบราสสิโนไลด์ ฮอร์โมนที่เป็นที่รู้จักและพบมากอีกตัวในกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์ คือ แคสตาสเตอโรน (Castasterone) โครงสร้างแสดงดังในรูปที่ 2-2 แคสตาสเตอโรนเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากเมตาบอลิกของบราสสิโนไลด์ และสารฮอร์โมนหลายตัวในกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์ จะเห็นได้ว่าโครงสร้างของบราสสิโนไลด์จะคล้ายกับโครงสร้างของแคสตาสเตอโรนมาก แต่บราสสิโนไลด์มีฤทธิ์ทางชีวภาพมากกว่าแคสตาสเตอโรนถึง 5 เท่า (Clouse, S. D., 2004) จึงถูกนำมาใช้ในทางการเกษตรมากกว่า

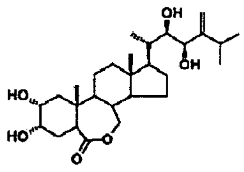


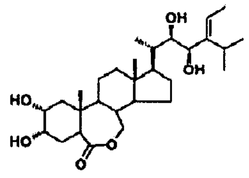
รูปที่ 2.2 โครงสร้างของแคสตาสเตอโรน (castasterone)

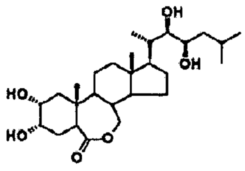
ฮอร์โมนตัวอื่นๆในกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์ที่มีรายงานอีก 51 ตัว มีสูตรโครงสร้างดังในรูปที่ 2.3 และมีชื่อเรียกต่างๆกันออกไปดังแสดงใต้สูตรโครงสร้าง (Clouse, S. D., 2004)

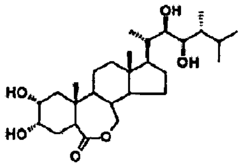

Brassinolide (1)

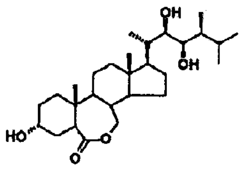

28-Homobrassinolide (2)

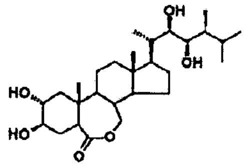

Dolicholide (3)

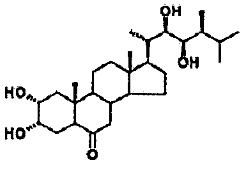

28-Homodolicholide (4)

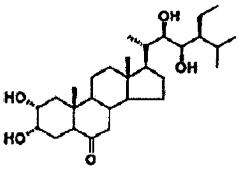

28-Norbrassinolide (5)

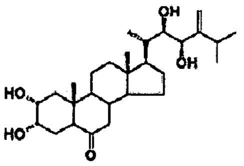

24-Epibrassinolide (6)

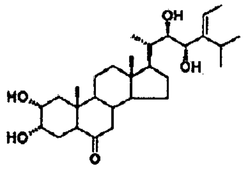

2-Deoxybrassinolide (7)

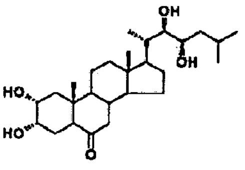

3-Epibrassinolide (8)

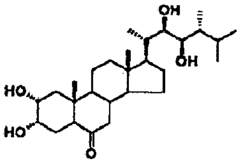

Castasterone (9)

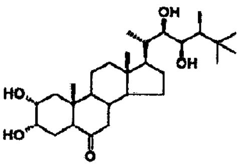

28-Homocastasterone (10)

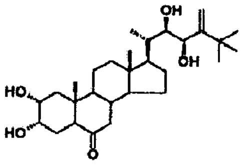

Dolichosterone (11)

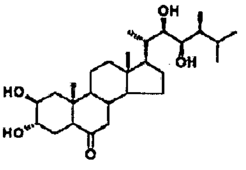

28-Homodolichosterone (12)

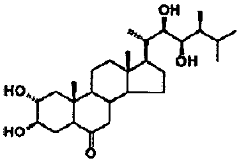

28-Norcastasterone (13)

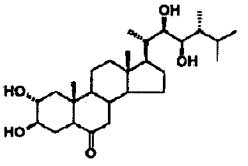

24-Epicastasterone (14)

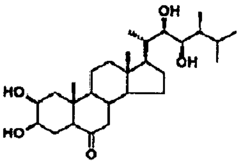

25-Methylcastasterone (15)

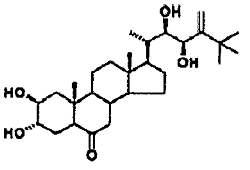

25-Methyldolichosterone (16)

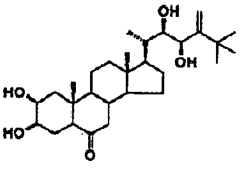

2-Epicastasterone (17)

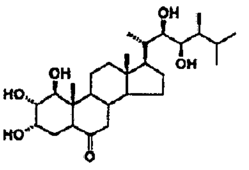

3-Epicastasterone (18)

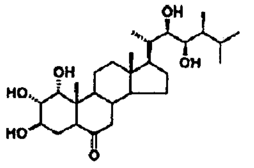

3,24-Diepicastasterone (19)

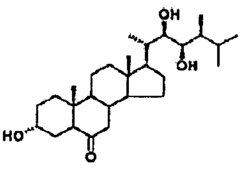

2,3-Diepicastasterone (20)

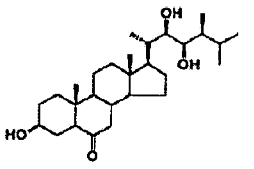

2-Epi-25-methyldolichosterone (21)

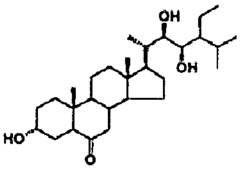

2,3-Diepi-25-methyldolichosterone (22)

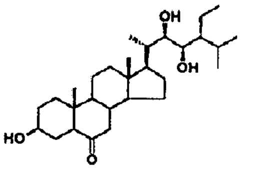

1β-Hydroxycastasterone (23)


3-Epi-1α-hydroxycastasterone (24)

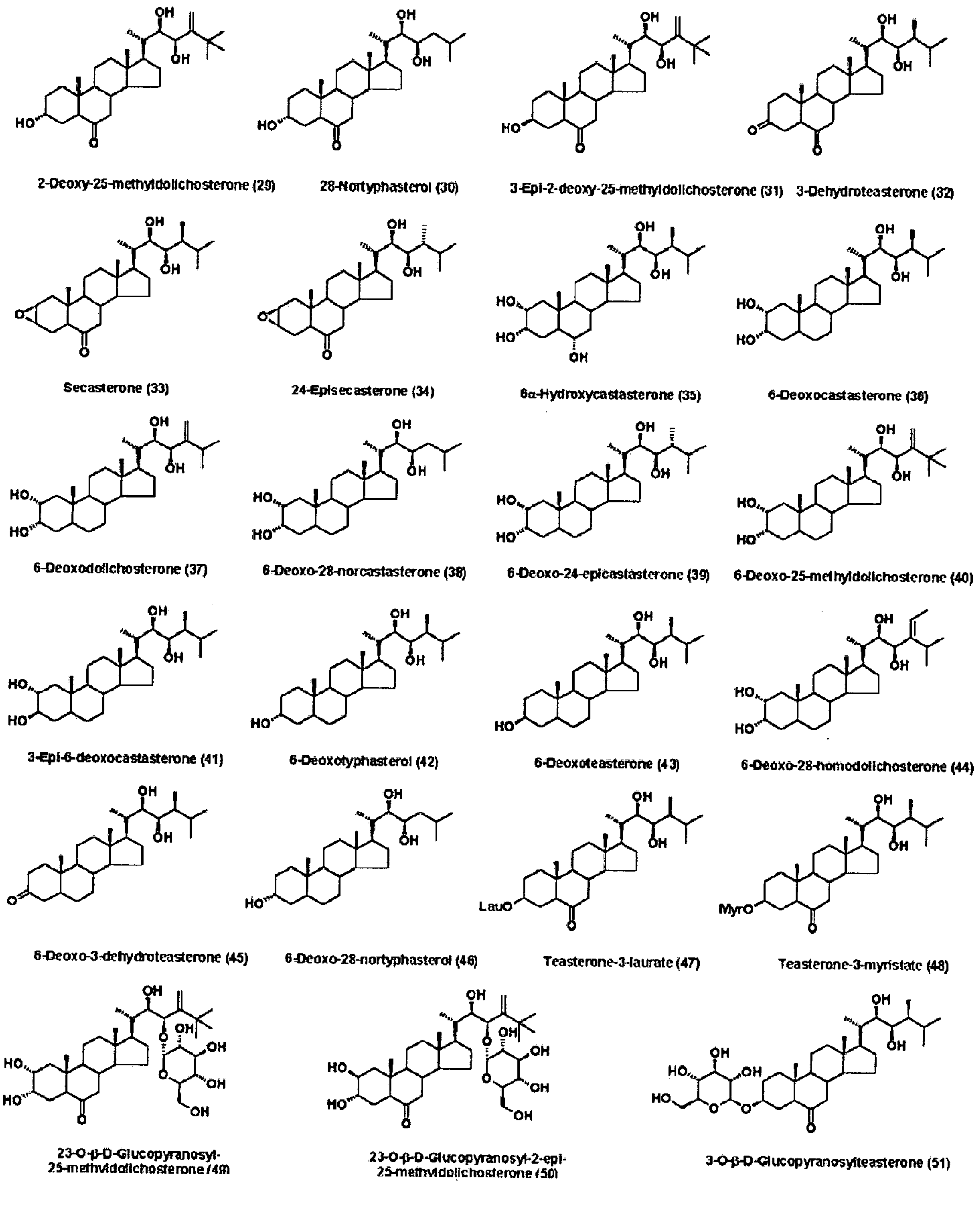

Typhasterol (25)


Teasterone (26)


28-Homotyphasterol (27)


28-Homoteasterone (28)

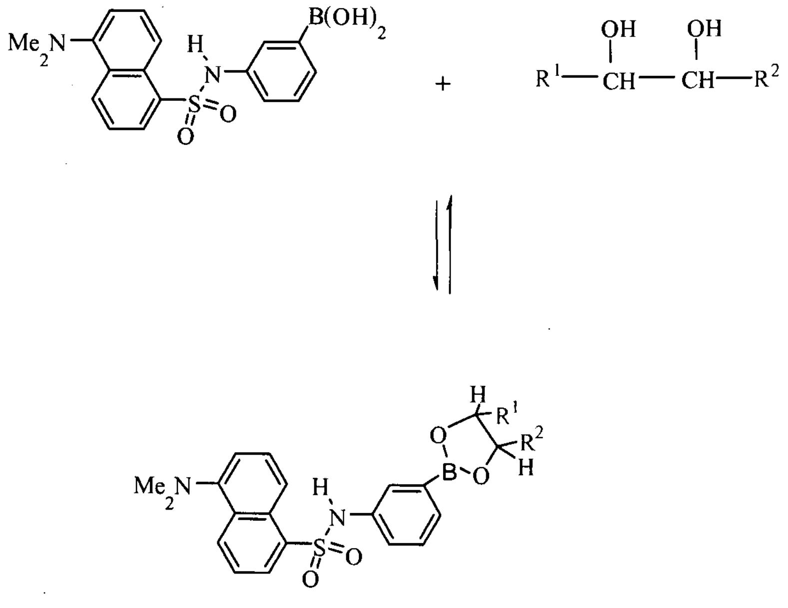
รูปที่ 2.3 โครงสร้างของฮอร์โมนกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์



รูปที่ 2.3 โครงสร้างของฮอร์โมนกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์ (ต่อ)

การวิเคราะห์บราสสิโนสเตียรอยด์ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์

แดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด ใช้เป็นตัวตรวจวัดทางเคมีเชิงฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescent chemosensor) และถูกใช้เป็นรีเอเจนต์กันอย่างแพร่หลายสำหรับการทำอนุพันธ์กับน้ำตาลฟรุกโตสหรือน้ำตาลชนิดอื่นๆ (Crespo-Otero, R., Suardiaz, R., Pina-Luis, G., Valdes, M. G., Diaz-Garcia, M. E., and Montero, L. A., 2008;Luis, G. P., Granda, M., Badia, R., and Diaz-Garcia, M. E., 1998) โดยแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด เป็นฟลูออโรฟอร์ที่เกิดปฏิกิริยากับหมู่ไดออล (Vicinal diols) (หมู่ไฮดรอกซิลบนอะตอมของคาร์บอนที่อยู่ติดกัน) และอะมิโนแอลกอฮอล์ ได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารเชิงซ้อนที่มีลักษณะเป็นวง (ดังรูปที่ 2.4) (Gamoh, K., Okamoto, N., Takatsuto, S., and Tejima, I., 1990;Gamoh, K., Omote, K., Okamoto, N., and Takatsuto, S., 1989;Takatsuto, S., Omote, K., Gamoh, K., and Ishibashi, M., 1990;Winter, J., Schneider, B., Meyenburg, S., Strack, D., and Adam, G., 1999)



รูปที่ 2.4 ปฏิกิริยาของแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด กับหมู่ไดออล (Vicinal diols) เกิดเป็นสารเชิงซ้อนที่มีลักษณะเป็นวงที่สามารถให้ฟลูออเรสเซนซ์ได้ (-, 2555)

ค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์และความยาวคลื่นที่เกิดพีคขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมรอบๆแดนซิลที่เป็นฟลูออโรฟอร์ และจากรูปที่ 2.3 จะสังเกตได้ว่าฮอร์โมนเกือบทุกตัวในกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์มีหมู่ไดออล ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 และ 3 (รูปที่ 2.3) กลุ่มนี้จะมีชื่อเรียกว่า Side-chain

cis-diol ดังนั้นบราสสิโนสเตียรอยด์จึงสามารถเกิดปฏิกิริยากับรีเอเจนต์แดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด (Dansylaminophenyl boronic acid) ให้ผลิตภัณฑ์ที่วัดการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ได้

น้ำหมักชีวภาพ (Bio-extract)

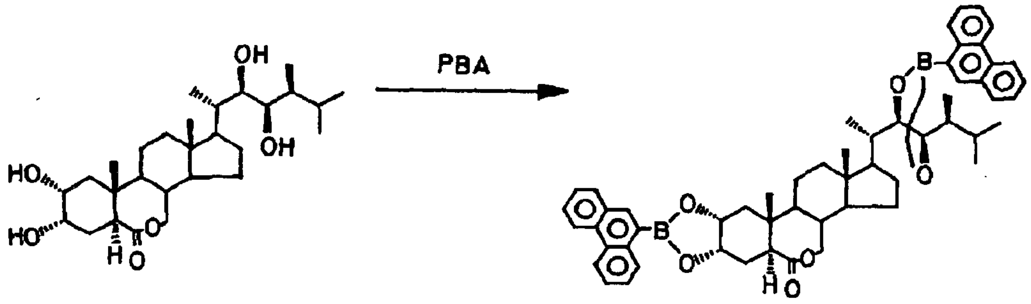
น้ำหมักชีวภาพหรือน้ำสกัดชีวภาพ เป็นสารละลายเข้มข้นที่ได้จากการหมักเศษพืชหรือสัตว์ (เยาวพา จิระเกียรติกุล และ นฤมล วชิรปัทมา, 2551) หรือเป็นของเหลวที่ได้มาจากวิธีการสกัดน้ำเลี้ยงจากเซลล์พืชและเซลล์สัตว์ซึ่งประกอบด้วยสารประกอบอินทรีย์โดยใช้น้ำตาลหรือกาก น้ำตาล (Molasses) ใส่ลงไปจะได้น้ำเลี้ยงที่สกัดออกมาเป็นสีน้ำตาล โดยขบวนการ “พลาสโมไลซีส (Plasmolysis)” ซึ่งมีจุลินทรีย์หลากหลายชนิดที่ทำหน้าที่ย่อยสลายวัสดุอินทรีย์ให้มีโมเลกุลเล็กลงตามลำดับ โดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งให้อาหารและพลังงานของจุลินทรีย์ สามารถหมักได้ทั้งในสภาพที่มี และไม่มีออกซิเจน น้ำสกัดชีวภาพหรือน้ำหมักชีวภาพที่ได้นี้จะมีทั้งจุลินทรีย์ธรรมชาติที่เกิดขึ้นหลากหลายชนิด รวมทั้งมีสารประกอบที่สกัดได้จากเซลล์พืชและเซลล์สัตว์ชนิดต่างๆ ได้แก่ สารพวกคาร์โบไฮเดรต โปรตีน กรดอะมิโน ฮอร์โมน เอนไซม์ และอื่นๆ น้ำสกัดชีวภาพจะเกิดขึ้นมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับปริมาณน้ำเลี้ยงในต้นพืช โดยปกติน้ำเลี้ยงในต้นพืชสดจะมีอยู่ประมาณ 90-98 เปอร์เซ็นต์ ถ้าส่วนของพืชมีน้ำมาก น้ำสกัดก็จะเกิดขึ้นมาก ภายในระยะเวลาเพียง 2-3 วัน แต่เนื่องจากขบวนการทำในระยะแรกเกี่ยวข้องกับขบวนการสกัดน้ำเลี้ยงจากเซลล์ทางชีวภาพ (Bio-extract) และในช่วงหลัง เกี่ยวข้องกับขบวนการหมัก ดังนั้นนักวิชาการบางกลุ่มจึงเรียกน้ำสกัดชีวภาพว่า “น้ำหมักชีวภาพ” (มุกดา สุขสวัสดิ์, 2545;เยาวพา จิระเกียรติกุล และ นฤมล วชิรปัทมา, 2551)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Gamoh, K., Kitsuwa, T., Takatsuto, S., Fujimoto, Y., and Ikekawa, N. (1988) ได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมนพืชกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์ 7 ตัว ได้แก่ บราสสิโนไลด์ แคสตาสเตอโรน บราสสิโนน 28-นอร์บราสสิโนไลด์ 28-โฮโมบราสสิโนไลด์ 28-โฮโมแคสตาสเตอโรน และโดลิคลอสเตอโรน ในเกสรของถั่วปากอ้า (Broad bean) โดยการทำอนุพันธ์ที่หมู่ไดออล (Vicinol diol) กับ 1-แนพธาลีนบอโรนิค แอซิด (1-Naphthaleneboronic acid) ที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นตรวจวัดสารผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ที่มีดีเทคเตอร์เป็นยูวี-วิสิเบิ้ล ที่ 280 นาโนเมตร โดยใช้คอลัมน์ ODS (C-18) และใช้ตัวทำละลายผสมระหว่างอะซิโตรไนไตร์ลกับน้ำ ($CH_3CN:H_2O$) เป็นเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) เพื่อแยกฮอร์โมนแต่ละตัวออกจากกันที่รีเทนชันไทม์ต่างๆ จากโครมาโตแกรมพบว่า สามารถแยกฮอร์โมนทั้ง 7 ตัวออกจากกันได้ในเวลา 18 นาที และมีค่าร้อยละการได้กลับคืนของบราสสิโนไลด์อยู่ในช่วง 88.6-95.5

เปอร์เซ็นต์ (n=4, 2.9%RSD) นอกจากนี้ยังรายงานว่าวิธีนี้สามารถวิเคราะห์ปริมาณบราสสิโนไลด์ได้ต่ำถึงระดับ 100 พิโคกรัม

Gamoh, K., Omote, K., Okamoto, N., and Takatsuto, S. (1989) ได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมนพืชกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์ ได้แก่ บราสสิโนไลด์ โฮโมบราสสิโนไลด์ นอร์บราสสิโนไลด์ แคสตาสเตอโรน โฮโมแคสตาสเตอโรน นอร์แคสคาสเทอโรน และโดลิคลอสเตอโรน ในเกสรของถั่วปากอ้า (Broad bean, *Vicia faba L.)* โดยการทำอนุพันธ์กับ 9-ฟีแนนทรีน บอโรนิค แอซิด (9-Phenanthreneboronic acid) 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใน 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรโดยปริมาตร) ไพริดีน-อะซิโตรไนไตร์ล ที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที (ดังรูปที่ 2.5) จากนั้นตรวจวัดสารผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ที่มีดีเทคเตอร์เป็นฟลูออเรสเซนซ์ ความยาวคลื่นที่ใช้ในการกระตุ้น คือ 305 นาโนเมตร (λ_{ex}) และตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ที่คายออกมาที่ความยาวคลื่น 375 นาโนเมตร (λ_{em}) โดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่างอะซิโตรไนไตร์ลกับน้ำ ($CH_3CN:H_2O$) เป็นเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ในอัตราส่วน 90:10 ที่อัตราการไหล 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที แยกในคอลัมน์ ODS (C-18) จากการวิเคราะห์พบว่า มีปริมาณของบราสสิโนไลด์ โดลิคลอ สเตอโรน นอร์แคสคาสเทอโรน และแคสตาสเตอโรน เท่ากับ 180.8± 3.1, 536.5± 4.5, 628.4± 3.6 และ 134.4± 2.2 นาโนกรัมต่อกรัม ตามลำดับ



รูปที่ 2.5 ปฏิกิริยาของบราสสิโนไลด์ กับ 9-ฟีแนนทรีนบอโรนิค แอซิด (9-Phenanthreneboronic acid, PBA)

Gamoh, K., and Takatsuto, S. (1989) ได้ศึกษาการทำอนุพันธ์ของบราสสิโนสเตียรอยด์ โดยใช้ รีเอเจนต์ที่เป็นอนุพันธ์ของกรดบอโรนิค คือ 1-ไซยาโนไอโซอินโดล-2-*เมตา*-เฟนิลบอโรนิค แอซิด (1-cyanoisoindole-2-*m*-phenylboronic acid) ซึ่งเตรียมได้จาก*ออร์โธ*-แพทธาลาดีไฮด์ (*o*-phthalaldehyde) และ*เมตา*-อะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด (*m*-aminophenylboronic acid) ปฏิกิริยาการทำอนุพันธ์ของบราสสิโนสเตียรอยด์กับรีเอเจนต์จะทำในสารละลายผสมของอะซิ

โตรไนไตร์ลที่มีไพริดีนอยู่ ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ที่สามารถให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ได้ แล้วทำการตรวจวัดด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ความยาวคลื่นที่ใช้ในการกระตุ้น คือ 330 นาโนเมตร (λ_{ex}) และความยาวคลื่นที่สารคายแสงที่ 400 นาโนเมตร (λ_{em}) พบว่าอนุพันธ์ของบราสสิโนสเตียรอยด์กับรีเอเจนต์บอโรเนตมีขีดจำกัดการตรวจวัดที่ 20 พิโคกรัม (S/N = 3) นอกจากนี้รีเอเจนต์ที่ศึกษามีข้อดี คือ มีสภาพไวในการวิเคราะห์สูง เมื่อเทียบกับอนุพันธ์ของกรดบอโรนิคชนิดอื่นที่นิยมใช้ เช่น 9-ฟีแนนทรีนบอโรนิค แอซิด (9-phenanthreneboronic acid) และมีความเฉพาะเจาะจงในการทำปฏิกิริยาสูง คือ ทำปฏิกิริยาที่หมู่ ไดออล (1,2-diol group)

Gamoh, K., Okamoto, N., Takatsuto, S., and Tejima, I. (1990) ได้สังเคราะห์รีเอเจนต์ตัวใหม่สำหรับใช้วิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมนบราสสิโนสเตียรอยด์ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ซึ่งมีดีเทคเตอร์เป็นเครื่องสเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์ รีเอเจนต์ตัวนี้คือ *เมตา*-อะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด (*m*-dansylaminophenylboronic acid, DABA) การเตรียมอนุพันธ์ แดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโนเนต (Dansylaminophenylboronates) ทำได้โดยนำแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด 10 มิลลิกรัม ละลายใน 0.1 เปอร์เซ็นต์ ไพริดีนในอะซิโตรไนไตร์ล 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายที่ได้ 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในฮอร์โมนบราสสิโนสเตียรอยด์ที่สกัดจากเกสรพืช ปิดฝาหลอดทดลอง นำไปให้ความร้อนที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งให้เย็น และนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ตรวจวัดด้วยเครื่องสเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์ ค่าความยาวคลื่นที่ใช้ในการกระตุ้น คือ 345 นาโนเมตร (λ_{ex}) และค่าความยาวคลื่นที่สารคายแสงออกมาตรวจวัดที่ 515 นาโนเมตร (λ_{em}) รีเอเจนต์ตัวใหม่นี้ ให้ค่าขีดจำกัดการตรวจวัดเท่ากับ 25 พิโคกรัมของสารมาตรฐานบราสสิโนไลด์ (S/N=2) ซึ่งดีกว่ารีเอเจนต์แนพธาลีนบอโรนิค แอซิด (Naphthaleneboronic acid) ที่ให้อนุพันธ์แนพธาลีนบอโรเนต (Naphthaleneboronate)

Takatsuto, S., Omote, K., Gamoh, K., and Ishibashi, M. (1990) ได้ทำการแยกและทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของฮอร์โมนบราสสิโนไลด์และแคสตาสเตอโรน ในเกสรดอกบัควีท โดยวิธีวัดการเจริญเติบโตของเมล็ดข้าวส่วนที่งอก (Rice lamina inclination) เกสรดอกบัควีทถูกสกัดด้วยตัวทำละลาย และทำการแยกฮอร์โมนที่สกัดได้ให้มีความบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคทางโครมาโตกราฟี แล้วจึงนำมาทำอนุพันธ์กับ 9-ฟีแนนทรีนบอโรนิค แอซิด (9-phenanthreneboronic acid) และแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด (Dansylaminophenylboronic acid) ที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วทำการตรวจวัดด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ที่มีดีเทคเตอร์เป็นฟลูออเรสเซนซ์ ค่าความยาวคลื่นที่ใช้ในการกระตุ้นและค่าความยาวคลื่นที่สารคายแสงตรวจวัดที่ 305 นาโนเมตร (λ_{ex}) 375 นาโนเมตร (λ_{em}) และ 345 นาโนเมตร (λ_{ex}) 515 นาโนเมตร (λ_{em}) ตามลำดับ ปริมาณของบราสสิโนไลด์และแคสตาสเตอโรน ที่ตรวจวัดได้ เท่ากับ 5.0 และ 7.1 นาโน

กรัมต่อกรัม ตามลำดับ จากนั้นทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของฮอร์โมนบราสสิโนไลด์และแคสตาสเตอโรนในเกสรดอกบัคีวีท ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟี-แมสสเปกโทรเมทรี พบว่ามีโมเลกุลลาร์ไอออนของแคสตาสเตอโรน *บิส* มีเทนบอโรเนต (Castasterone *bis*-methaneboronate) ที่มวล/ประจุ 512.3842 และบราสสิโนไลด์ *บิส*มีเทนบอโรเนต (Brassinolide *bis*-methaneboronate) ที่มวล/ประจุ 528.3791 ซึ่งสามารถยืนยันได้ว่าในเกสรดอกบัควีทมีฮอร์โมนพืชที่ใช้ในการศึกษาทั้งสองชนิด

Winter, J., Schneider, B., Meyenburg, S., Strack, D., and Adam, G. (1999) ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนบราสสิโนสเตียรอยด์ โดยการเกิดอนุพันธ์ 2 ชนิด (Double-derivatized brassinosteroids) ชนิดแรกเป็นการเกิดปฏิกิริยาระหว่างฮอร์โมนบราสสิโนสเตียรอยด์กับ แดนซิลไฮดราซีน ที่อุณหภูมิห้อง และทิ้งไว้ 1 คืน จะได้อนุพันธ์แดนซิลไฮดราโซน จากนั้นฮอร์โมนที่เหลือจะถูกทำให้เป็นเบสโดยการเติมไพริดีนก่อนไปทำปฏิกิริยากับแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด ที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ได้อนุพันธ์แดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรเนต อนุพันธ์ทั้งสองชนิดนี้ถูกนำไปฉีดผ่านคอลัมน์ LiChrospher 100 RP18 ของเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) มีตัวทำละลายผสมระหว่างเมทานอลและน้ำ (CH_3OH:H_2O) เป็นเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) เพื่อแยกฮอร์โมนทั้งหมดสารออกจากอื่นๆในตัวอย่าง รวมทั้งรีเอเจนต์ที่ใช้ในการเกิดอนุพันธ์ด้วย และใช้ตัวทำละลายผสมระหว่างอะซิโตรไนไตร์ลกับน้ำ (CH_3CN:H_2O) เป็นเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) เพื่อแยกฮอร์โมนแต่ละตัวออกจากกันที่รีเทนชันไทม์ต่างๆกัน ตรวจวัดปริมาณที่ดีเทคเตอร์ฟลูออเรสเซนซ์ โดยความยาวคลื่นที่ใช้ในการกระตุ้นคือ 230 นาโนเมตร (λ_{ex}) และตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ที่สารคายแสงออกมาที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร (λ_{em}) วิธีนี้ทำให้สามารถตรวจวัดปริมาณของฮอร์โมนบราสสิโนไลด์ได้เกือบทุกตัว

Pachthong, C., Supyen, D., Buddhasukh, D., and Jatisatienr, A. (2006) ได้ศึกษาการแยกและพิสูจน์เอกลักษณ์ของบราสสิโนไลด์ และแคสตาสเตอโรนในเกสรดอกฟักทอง (*Cucurbita moschata Duch.*) โดยเกสรดอกฟักทองแห้งจะถูกสกัดด้วยเมทานอล นำไประเหยตัวทำละลายออก สารสกัดที่ได้จะถูกพาร์ทิชั่นระหว่างน้ำและคลอโรฟอร์ม โดยส่วนที่อยู่ในชั้นคลอโรฟอร์มจะมีฤทธิ์ทางชีวภาพทดสอบด้วยวิธีวัดการเจริญเติบโตของเมล็ดข้าวส่วนที่งอก (Rice lamina inclination) นำสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพมาทำให้บริสุทธิ์แล้วจึงทำอนุพันธ์กับเมทิลบอโรนิคแอซิด (Methylboronic acid) เกิดผลิตภัณฑ์เป็นบราสสิโนไลด์ *บิส*มีเทนบอโรเนต (Brassinolide *bis*-methaneboronate) และแคสตาสเตอโรน *บิส*มีเทนบอโรเนต (Castasterone *bis*-methaneboronate) ตรวจวัดผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟี-แมสสเปกโทรเมทรี เพื่อแยกและพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารประกอบที่ได้ทั้งสองชนิด จากผลการวิเคราะห์สามารถระบุได้ว่ามีแคสตาสเตอโรน และบราสสิโนไลด์ เท่ากับ 112 และ 36 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ของน้ำหนัก

เกสรดอกฟักทองแห้ง ตามลำดับ และสามารถนำไปใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบในการผลิตฮอร์โมนพืชจากธรรมชาติ ซึ่งมีราคาถูก สามารถนำไปใช้ประโยชน์ทางเกษตรกรรมได้

Huo, F., Wang, X., Han, Y., Bai, Y., Zhang, W. et al. (2012) ได้นำเสนอรีเอเจนต์ชนิดใหม่ คือ 2-โบรโมไพริดีน-5-บอโรนิค แอซิด (2-bromopyridine-5-boronic acid, BPBA) ที่ใช้ในการทำอนุพันธ์กับบราสสิโนสเตียรอยด์ทั้ง 3 ตัว คือ 24-อีพิบราสสิโนไลด์ 28-โฮโมบราสสิโนไลด์ และ 28-อีพิโฮโมบราสสิโนไลด์ ปฏิกิริยาการทำอนุพันธ์สามารถทำได้ง่าย เพียงการเขย่าด้วยมือที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นสารผลิตภัณฑ์ที่ได้จะถูกทำการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค Ultra High Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Triple Quadrupole Mass Spectrometry (UHPLC-ESI-QqQ-MS) ใช้ตัวทำละลายผสมระหว่างอะซิโตรไนไตร์ลกับน้ำ ($CH_3CN:H_2O$) ผสมกับ 0.1 เปอร์เซ็นต์ กรดฟอร์มิก เป็นเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) รูปแบบการชะแบบเกรเดียน ที่อัตราการไหล 0.35 มิลลิลิตรต่อนาที วิธีวิเคราะห์ดังกล่าวนี้สามารถทำได้ง่ายรวดเร็ว และมีสภาพไวในการวิเคราะห์สูง มีขีดจำกัดการตรวจวัด (S/N=3) ขีดจำกัดการหาปริมาณ (S/N=10) สำหรับบราสสิโนสเตียรอยด์ทั้งสามชนิด มีค่าอยู่ในช่วง 2.00-8.00 นาโนกรัมต่อลิตร และ 6.00-23.00 นาโนกรัมต่อลิตร ตามลำดับ มีช่วงความเป็นเส้นตรง เท่ากับ 10-10,000 นาโนกรัมต่อลิตร ค่าร้อยละการได้กลับคืนของบราสสิโนสเตียรอยด์ มีค่าอยู่ในช่วง 76.9-86.1 เปอร์เซ็นต์ วิธีวิเคราะห์ที่นำเสนอขึ้นใหม่นี้ประสบความสำเร็จเป็นอย่างสูง เนื่องจากใช้ตัวอย่างพืช *A.thaliana* เพียง 2 กรัมเท่านั้น แต่สามารถทำการหาปริมาณของบราสสิโนสเตียรอยด์ได้ โดยมีค่าเท่ากับ 0.055 นาโนกรัมต่อกรัม และ 0.070 นาโนกรัมต่อกรัม สำหรับ 24-อีพิบราสสิโนไลด์ และ28-อีพิโฮโม บราสสิโนไลด์ ตามลำดับ