

บทที่ 2

ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ข้อมูลเบื้องต้นของบัวหลวง

บัวหลวง (lotus) เป็นพืชสมุนไพรไทยที่ใช้เป็น สัญลักษณ์ทางพุทธศาสนา และ อยู่คู่กับพุทธศาสนามายาวนาน ตามพุทธประวัติ กล่าวว่าเมื่อพระพุทธองค์ทรงประสูติแล้ว ก็มีดอกบัวมารองรับขณะทรงก้าวเดิน ดังนั้นดอกบัวจึงเป็นสัญลักษณ์ของพุทธบูชา พุทธศาสนิกชน ใช้ดอกบัวในการไหว้พระ ทำบุญ และบูชาสิ่งศักดิ์สิทธิ์ สิ่งที่เป็นมงคล แม้ขณะพนมมือไหว้ ก็ยังมีลักษณะคล้ายดอกบัวตูม ดอกบัวจึงเป็นสัญลักษณ์ ใช้แทนสิ่งดีงาม ความบริสุทธิ์คนไทยจึงนิยมปลูกบัวไว้ในสระน้ำ ทั้งสถานที่สำคัญ และบ้านเรือน ประกอบกับทุกส่วนของบัวหลวงมีประโยชน์มากทั้งใช้ในพิธีกรรม ทางศาสนา เป็นยาสมุนไพร และส่วนราก และเหง้านำมาประกอบเป็นอาหาร

บัวหลวงมีชื่อเรียกต่างๆ เช่น บัว , สัตตบงกช , อุบล , โชค (เขมร) , (Sacred Lotus , Lotus Stamen ,East Indian Lotus) เป็นพืชขนาดใหญ่จัดเป็นพืชน้ำ มีอายุหลายปี โดยออกดอกตลอดปีใบมีก้านแข็ง (sacred Lotus) (วุฒิ วุฒิธรรมเวช , 2540) มีชื่อทางพฤกษศาสตร์ว่า *NelumbonuciferaGaertn.* ในวงศ์ปทุมชาติ (*Nelumbonaceae*) กลุ่มที่มีถิ่นกำเนิดทางเอเชียตะวันออกเฉียงใต้เรียกว่า ปทุมชาติเขตร้อน มีหลายพันธุ์ เช่น เมื่อดอกใหญ่ ทรงฉลวย สีชมพู เรียก “ปทุม” หรือ “ประทุม” หรือ “ปัทม” หรือ “โกกนท” เมื่อดอกใหญ่ ทรงฉลวย สีขาว เรียก “บุณฑริก” เมื่อดอกใหญ่ ทรงป้อมซ้อน สีชมพู เรียก “สัตตบงกช” เมื่อดอกใหญ่ ทรงป้อม ซ้อน สีขาว เรียก “สัตตบุษย์” เมื่อดอกเล็ก เรียก “บัวปักกิ่ง” หรือ “บัวหลวงจีน” *NelumbonuciferaGaertn.varpekinensis.* มีทั้งดอกสีชมพูและสีขาว เมื่อดอกเล็กมาก เรียก “บัวเข็ม” (วิเชียร จีรวงส์, 2537)

บัวหลวง มีลักษณะทางพฤกษศาสตร์ คือเป็นไม้ล้มลุก มีเหง้าและไหลอยู่ใต้ดิน เหง้า จะมีลักษณะเป็นท่อนยาว มีปล้องสีเหลืองอ่อนจนถึงเหลือง แข็งเล็กน้อย ถ้าตัดตามขวางจะเป็นรูปกลมๆ หลายรู ไหลจะเป็นส่วนที่เจริญไปเป็นต้นใหม่ ใบ ใบเดี่ยวรูปโล่ ออกสลับ แผ่นใบจะชูเหนือน้ำ รูปใบเกือบกลม ขนาดใหญ่ ขนานเส้นผ่านศูนย์กลาง 20-50 ซม.โคนเว้าตื้น ขอบเรียบและเป็นคลื่น ผิวใบมีนวล ก้านใบแข็งเป็นหนาม ถ้าตัดตามขวางจะเห็นเป็นรูปภายใน ก้านใบมีน้ำยางขาว เมื่อหักจะมีสายใยสีขาว ใบอ่อนสีเทานวล ปลายมีขนงอขึ้นทั้งสองด้าน ก้านใบจะติดตรงกลางแผ่นใบ ดอก เดี่ยว มีสีขาว สีชมพู กลิ่นหอม บัวหลวงจะเริ่มบานตั้งแต่ตอนเช้า ก้านดอกยาวมีหนามเหมือนก้านใบ ชูดอกเหนือน้ำ และชูสูงกว่าใบเล็กน้อย กลีบดอกมีจำนวนมากเรียงซ้อนหลายชั้นเมื่อบานเต็มที่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 15-25 ซม.มีเกสรตัวผู้มารอบฐานฝัก ปลายอับเรณูมีรยางค์

คล้ายกระบอกเล็กๆ กลีบเลี้ยง 4- 5 กลีบ ขนาดเล็ก สีขาวอมเขียว หรือสีเทาอมชมพู ร่วงง่าย กลีบดอกมีจำนวนมากเรียงซ้อนหลายชั้น เกสรตัวผู้มีจำนวนมากสีเหลือง ปลายอับเรณูมีระยะคล้ายกระบอกเล็กๆ สีขาว เกสรตัวเมียจะฝังอยู่ในฐานรองดอกรูปกรวยสีเหลืองนวล ผลรูปกลมรี มีจำนวนมากอยู่ในฝักรูปกรวย รูปกลมรี สีเขียวนวล เมื่ออ่อนมีสีเหลือง รูปกรวยนี้เมื่อเป็นผลแก่จะขยายใหญ่ขึ้นมีสีเทาอมเขียว ที่เรียกว่า "ฝักบัว" มีผลสีเขียวอ่อนฝังอยู่เป็นจำนวนมาก(ชยันต์ พิเชียรสุนทร และคณะ, 2544) รากมีลักษณะเป็นเหง้าหรือไหลหยั่งลงในดินลึกเป็นรากเก็บอาหารขนาดใหญ่ทรงกลมยาวคืบไปตามแนวนอนใต้ดินและเป็นปล้องเนื้อในเป็นรู (วุฒิ วุฒิธรรมเวช, 2540) ดังแสดงในตารางที่ 2.1 ขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดหรือไหล (คณิดา เลขะกุล และคณะ, 2536) สามารถปลูกได้ในระดับน้ำตั้งแต่ 1-2 เซนติเมตร ไปจนถึง 2-3 เมตร

ตามตำราพื้นบ้านของไทยรายงานว่าทุกส่วนของบัวหลวงสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ทั้งหมด เช่น ดื่มน้ำ ดอกบัว เกสรตัวผู้ เมล็ด ใบ ยางจากก้านใบและก้านดอก เหง้า และราก นอกจากนั้นบัวหลวงที่นำมาใช้ในตำรับยาไทย โดยเฉพาะในตำรับยาหอม มีสรรพคุณ ช่วยบำรุงหัวใจ ทำให้จิตใจชุ่มชื้น และแก้อาการวิงเวียน ตำรับยาหอม ที่ปรากฏ ในบัญชียาสมุนไพรรักษาตามประกาศคณะกรรมการแห่งชาติด้านยา (ฉบับที่ ๕) ประกอบด้วยตำรับยาหอมเทพจิตร มี เครื่องยาส่วนประกอบเป็น เกสรบัวหลวง ดอกบัวขม และดอกบัวเผื่อน กับสมุนไพรรักษาอื่น ๆ เป็น ส่วนประกอบ ส่วนตำรับยาหอมนวโกศ เครื่องยามีเกสรบัวหลวงเป็นส่วนประกอบ เป็นต้น (คณะกรรมการแห่งชาติด้านยา, 2551) ส่วนของเกสรบัวหลวง ได้จากเกสรตัวผู้ของดอกบัวหลวง เก็บเมื่อดอกบานเต็มที่แยกเอาเฉพาะเกสรตัวผู้นำไปผึ่งให้แห้งในที่ร่ม เมื่อแห้งจะเป็นเส้นมีสีเหลืองและมีกลิ่นหอมรสฝาด ถูกนำมาเข้า “พิกัตยาไทย” คือ การจำกัดจำนวนตัวยาหลายสิ่งหลายอย่าง นำมารวมกันเข้าเป็นหมวดโดยมีน้ำหนักของตัวยาในพิกัตนั้นเท่ากันเกสรบัวหลวงจัดอยู่ในพิกัต “เกสรทั้งห้า” (ดอกมะลิ ดอกพิกุล ดอกบุนนาค ดอกสารภี และเกสรบัวหลวง) “เกสรทั้งเจ็ด” (ดอกมะลิ ดอกพิกุล ดอกบุนนาค ดอกสารภี และเกสรบัวหลวงดอกจำปา ดอกกระดังงา) (ชยันต์ พิเชียร และคณะ, 2544) และ “เกสรทั้งเก้า” (ดอกมะลิ ดอกพิกุล ดอกบุนนาค ดอกสารภี และเกสรบัวหลวงดอกจำปา ดอกกระดังงาดอกลำดวน ดอกลำเจียก) นอกจากนี้บัวหลวงยังจัดอยู่ใน “พิกัตบัวทั้งห้า” ประกอบด้วย บัวสัตตบุษย์ บัวสัตตบรรณ บัวลินจง บัวจงกลนี และบัวนิลบล เป็นต้น ลักษณะทางกายภาพของ เครื่องยาเกสรบัวหลวง พบว่ามีลักษณะภายนอกเป็นไปตามเภสัชตำรับจีน คือ เกสรมีลักษณะเป็นเส้นบางๆ ตรงกลางเห็นเป็นร่องลึกลงไป ขนาดความยาว 0.6-2 เซนติเมตร ความกว้าง 0.1 เซนติเมตร มีกลิ่นหอมเฉพาะ รสฝาด (นพมาศ สุนทรเจริญนนท์และนางลักษณ เรืองวิเศษ, 2551) (ตารางที่ 2.2)

ตารางที่ 2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของส่วนต่างๆของบัวหลวง(อุไรพรรณ ปรากฏมทรัพย์, 2555)

ส่วนของบัวหลวง	ลักษณะทางพฤกษศาสตร์
ลำต้น (stolon, rhizome)	เจริญเติบโตขนานเรียใต้ผิวดินใต้น้ำ ลำต้นอ่อนมีลักษณะเป็นก้านสีขาวขุ่น เรียกว่า ไหล (Stolon) ลำต้นแก่จะมีขนาดใหญ่ขึ้นและแข็งสีครีมหรือน้ำตาลอ่อนเรียกว่า เหง้าที่เจริญเติบโตในแนวนอน (rhizome)แต่เวลานำมาประกอบอาหารนิยม เรียกว่า รากบัว
ก้านใบ (petiole)	เปลือกแข็งมีตุ่มหนามเล็กๆ (spiny) ลักษณะแผ่นใบชูสูงแผ่เหนือผิวน้ำเมื่อต้นสมบูรณ์เต็มที่
ใบบัว (leaf blade)	รูปทรงกลม (orbicular) ลักษณะฐานใบ (senus) หรือโคนใบปิด (peltate) โคนและปลายใบเว้าเข้า (connate-perfoliate) ใบอ่อนใต้น้ำจะห่อตัวจนส่งใบพ้นน้ำประมาณ 1 สัปดาห์ จึงคลี่แผ่ หน้าใบไม่จับน้ำ ใบมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ 5-10 เซนติเมตร ไปจนถึง 30-40 เซนติเมตร ตามขนาดของต้นและพันธุ์
ก้านดอก (peduncle)	เปลือกแข็งมีตุ่มหนามเล็กๆ ส่งให้ดอกชูสูงเหนือผิวน้ำ
ดอกบัว (flower)	ดอกเดี่ยว ทรงดอกมีทั้งทรงแหลมและป้อม กลีบดอกมีทั้งซ้อนและไม่ซ้อน ขนาดเล็ก หรือใหญ่ ตามแต่พันธุ์ เริ่มบานตอนรุ่งสาง
กลีบเลี้ยง (sepal)	ทั่วไปมี 4-6 กลีบ ขนาดเล็กกว่ากลีบดอกชัดเจน
กลีบดอก (petal)	รูปทรง เดียวกับทรงดอก กลีบจำนวนมาก สีขาว หรือชมพู หรือแดง หากกลีบดอกเป็นสีเหลือง มักเป็น ปทุมชาติเขตอบอุ่น-หนาว
เกสรตัวผู้ (stamen)	ประกอบด้วยก้านชูอับละอองเกสรทรงฝักยาวสีเหลือง ภายในมีละอองเกสรสีเหลือง ตรงปลายมีรยางค์เป็นติ่งเล็กสีขาวขุ่น มีทั้งลักษณะปกติ และลักษณะที่เป็นหมันคล้ายกลีบ ผล (fruit) คือ เมล็ดบัว (seed) ที่มีเปลือกหุ้ม

เกิดอยู่ในฝักบัว (torus) เมล็ดมีขนาดใหญ่ภายในเมล็ด มีต้นอ่อน (embryo) ที่นิยมเรียกว่า ดิบบัว ส่วนนี้มีรสขมเป็นส่วนประกอบเครื่องยาสมุนไพร



ภาพที่ 2.1 ลักษณะส่วนต่างๆของบัวหลวง

ตารางที่ 2.2การใช้แบบพื้นบ้านของบัวหลวง

ส่วนที่ใช้	สรรพคุณ และวิธีการใช้
เกสรตัวผู้	บำรุงหัวใจ เกสรปรุงเป็นยาหอมบำรุงหัวใจ บรรเทาอาการหน้ามืด วิงเวียน ^{5,7} ทำให้ชื่นใจ เป็นยาสงบประสาท ขับเสมหะปริมาณที่ใช้1.เกสรบัวหลวงสดหรือแห้ง ปริมาณ 1 หยิบมือ ชงกับน้ำร้อน 1 แก้ว (ประมาณ 240 มิลลิลิตร) ทิ้งไว้นาน 10-15 นาที ดื่มขณะที่ยังอุ่นอยู่ ครั้งละ 1 แก้ว วันละ 3-4 ครั้ง2.เกสรบัวหลวงแห้งบดเป็นผงครั้งละ 0.5-1 ช้อนชา ชงน้ำร้อนดื่ม (สถาบันวิจัยสมุนไพร, 2547) ตามตำรายาไทยเกสรบัวหลวงใช้บำรุงหัวใจ ทำให้ชุ่มชื้น บำรุงปอด บำรุงตับ บำรุงกำลัง คุชธาตุ แก้กลม แก้ไข้ ตามตำรายาจีน ใช้แก้ปัสสาวะบ่อย แก้น้ำกามเคลื่อน (ฝันเปียก) แก้กตขาว ประจำเดือนมามากกว่าปกติ เลือดกำเดาไหล และแก้อาการท้องเสีย (สถาบันวิจัยสมุนไพร, 2547 และ ชยันต์ พิเชียรสุนทร,2547)
ดอก	แก้อาการไข้ใน ช่วยให้นอนหลับปริมาณที่ใช้ดอกบัวตูมแห้ง 3-5 ดอก ต้มกับน้ำ 4-7 แก้ว ให้เดือนนาน5-10 นาที ดื่มขณะที่ยังอุ่นอยู่รับประทานวันละ 4 ครั้ง ครั้งละ 1แก้ว หรือดื่มต่างน้ำ (สถาบันวิจัยสมุนไพร, 2547และสมพร ภูติยานันท์, 2542)
ดี	มีรสขมจัด ช่วยขยายเส้นเลือดหัวใจ กรณีเส้นเลือดตีบ (พญามาจารย์วิพุธโยคะ รัตนรังษี , 2541)
ใบ	ใช้ห้ามเลือด ใบอ่อนกินได้เป็นผัก โบราณใช้ใบแก้เอาตินหุ้มอบในกองไฟบดให้ละเอียดผสมพิมเสนแทรกยาหอมกินให้มีลมแบ่งในการคลอเคลือบ แก้อาการปวดศีรษะ แก้ไข้ท้องร่วง ไขมันเสมหะปนเลือด เลือดกำเดาไหล และประจำเดือนมามากผิดปกติ (ชยันต์

	พิเชียรสุนทร, 2544)
ก้าน	แก้ริดสีดวงจมูก แก้ลมพิษ ยางจากก้านใบและก้านดอก แก้ท้องเดิน ใช้เป็นยาห้ามเลือด
เหง้า	เป็นยาเย็นใช้บำรุงกำลัง แก้อ่อนเพลียในกระหายน้ำ แก้เสมหะ แก้พุพอง (ชยันต์ พิเชียรสุนทร, 2544 และ นิจศิริ เรื่องรังษี, ธวัชชัย มังคละคุปต์, 2547)
ฝัก	ได้จากฝักแก่ ที่แกะเมล็ดและเอาก้านออก ใช้แก้ประจำเดือนมาผิดปกติหรือตกเลือด แก้เป็นตะคริวที่ท้อง และห้ามเลือด (สถาบันวิจัยสมุนไพร, 2547)
เมล็ด	ใช้จากฝักแก่ ใช้รับประทานเป็นอาหาร แก้อาการท้องร่วง (สถาบันวิจัยสมุนไพร, 2547)

2.2 องค์ประกอบทางเคมีที่พบในบัวหลวง

สารองค์ประกอบทางเคมีหลักที่พบในส่วนต่างๆของบัวหลวง ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ แอลคาลอยด์ แทนนิน และเรซิน ดังแสดงในตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 องค์ประกอบทางเคมีที่พบในบัวหลวง

ส่วนของบัวหลวง	สารองค์ประกอบทางเคมี
เกสรตัวผู้	พบสารฟลาโวนอยด์เช่น quercetin, loteolin, isoquercetrin, loteolinglucoside, และแอลคาลอยด์ (สถาบันวิจัยสมุนไพร, 2547)
ดอก	พบสารฟลาโวนอยด์ เช่น quercetin, loteolin, isoquercetrin, loteolinglucoside, kaempferol, kaempferol 3-galactoglucoside, และ kaempferol 3-diglucoside (สถาบันวิจัยสมุนไพร, 2547)
ดี	พบสารแอลคาลอยด์ คือ methylcorypalline ทำให้เส้นเลือดขยายตัว (วุฒิ วุฒิธรรมเวช, 2540) และแอลคาลอยด์ชนิดอื่นๆ เช่น liensinine, isoliensinine, neferins, lotusine,

	nuciferine, pronuciferine, demethylcoclaurine และสารฟลาโวนอยด์ เช่น galuteolin, hyperin, rutin (สถาบันวิจัยสมุนไพร, 2547)
ใบ	พบสารแอลคาลอยด์ dehydroemrine, dehydronuciferine, dehydroanonaine, N-methylisococlaurine, roemerine, nuciferine, anonaine, pronuciferine, N-nornuciferine, nornuciferine, amepavine, N-methylcoclaurine (Kunitomo, <i>et al.</i> , 1973) และสารพวกฟลาโวนอยด์ เช่น quercetin, isoquercetrin, nelumboside (สถาบันวิจัยสมุนไพร, 2547)
ก้าน	พบสารแอลคาลอยด์ หลายชนิด เช่น roemerine, nornuciferine, nuciferine, amepavine และพบสารพวก resin, tannin (สถาบันวิจัยสมุนไพร, 2547)
เหง้า	พบสารพวกแทนนิน และ asparagine (สถาบันวิจัยสมุนไพร, 2547)
ฝัก	พบสาร ฟลาโวนอยด์ quercetin และแอลคาลอยด์หลายชนิด เช่น nelumbine, nuciferine, N-nornuciferine, oxoushinsunine, N-noramepavine (สถาบันวิจัยสมุนไพร, 2547)

2.3ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของบัวหลวง

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่พบใน ส่วนเกสรและดอกบัว มีฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกเดชันโดย ส่วนเกสรตัวผู้มีฤทธิ์จับอนุมูลอิสระ DPPH โดยมีค่า EC_{50} 42.05 $\mu\text{g/ml}$ (คณะกรรมการแห่งชาติด้านยา, 2551) นอกจากนี้สารสกัดเอทานอลจากส่วนเมล็ด มีรายงานฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และมีฤทธิ์ปกป้องการทำงานของตับ (Sohn, *et al.*, 2003)

ฤทธิ์ต้านเบาหวาน

ส่วนเอนไซม์ที่มีฤทธิ์ยับยั้ง rat lens aldose reductase (RLAR) และ advance glycation end products (AGE) โดยมีค่า IC_{50} 48.30 และ 125.48 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ ซึ่งการยับยั้ง RLAR และ AGE มีผลต่อการลดการเกิดภาวะเบาหวาน สารสกัดเอทานอลจาก ส่วนเหง้า มีฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือดหนูที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย streptozotocin โดยลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ 73 % และ 67 % ในหนูปกติ และหนูที่เป็นเบาหวาน ตามลำดับ (Mukherjee, *et al.*, 1997)

ฤทธิ์ต่อหัวใจ และความดันโลหิต

สารสกัดด้วยน้ำจากส่วนต้นมีฤทธิ์ลดความดันโลหิต สารแอลคาลอยด์ demethylcoclaurine จากส่วนต้นมีฤทธิ์คลายกล้ามเนื้อเรียบ สาร แอลคาลอยด์ methylcoclaurine มีฤทธิ์ขยายหลอดเลือดที่ไปเลี้ยงหัวใจ (coronary dilator action) (สถาบันวิจัยสมุนไพร, 2547) สาร neferine มีฤทธิ์ลดความดันโลหิต และต้านการเต้นของหัวใจที่ผิดปกติ โดยมีผลต่อการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด (คณะกรรมการแห่งชาติด้านยา, 2551)

ฤทธิ์ต้านจุลชีพ

ฤทธิ์ต้านเชื้อที่ก่อเกิดฝีหนอง เชื้อก่อเกิดโรคท้องร่วง และสารสกัดแอลกอฮอล์จากต้นมีฤทธิ์ต้านเชื้อ β -*Streptococcus* group A (นพมาศ สุนทรเจริญนนท์และ นงลักษณ์ เรืองวิเศษ, 2551)

ฤทธิ์ทำให้อนหลับ

สารแอลกอฮอล์ที่พบในบัว มีผลทำให้หนูนอนหลับ สารสกัดเมทานอลจาก ส่วนเหง้าบัว ทำให้ลดพฤติกรรมและกิจกรรมต่างๆ ในสัตว์ โดยเพิ่มการเกิด pentobarbitone-induced sleeping time ในหนู (ถนอมศรี วงศ์รัตนาสถิต, 2538)

ฤทธิ์ลดปวดและต้านการอักเสบ

สารแอลคาลอยด์ที่พบในบัวมีฤทธิ์ลดอาการปวดและแก้อักเสบ (ถนอมศรี วงศ์รัตนาสถิต, 2538) สารสกัดเมทานอลจากส่วนเหง้าในขนาด 200 มก./กก. และ 400 มก./กก. ลดการอักเสบในหนูโดยมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับ phenylbutazone และ dexamethasone ทั้งการทดสอบในหลอดทดลอง และสัตว์ทดลอง¹⁸ สารสกัดเอทานอลของก้านใบในขนาด 200 มก./กก. มีฤทธิ์ลดไข้ในสัตว์ทดลอง โดยลดอุณหภูมิในร่างกายสัตว์ทดลองใน model yeast induced fever โดยมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับยาพาราเซตามอล (Sinha, *et al.*, 2000)

ฤทธิ์ต้านเชื้อ HIV

มีรายงานสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากบัว มีฤทธิ์ยับยั้ง HIV คือ สาร (+)-1(R)-coclaurine และ 1(S)-norcoclaurine ยับยั้งเชื้อ HIV ในหลอดทดลอง โดยมีค่า EC_{50} = 0.8 และ น้อยกว่า 0.8 $\mu\text{g/ml}$ โดยไม่มี

ค่า Therapeutic index มากกว่า 125 และ มากกว่า 25 ตามลำดับสาร linsinine และ isoliensinine ยับยั้งเชื้อ HIV ในหลอดทดลอง โดยมีค่า EC_{50} น้อยกว่า 0.8 ก./ไมโครลิตร โดยมีค่า Therapeutic index มากกว่า 9.9 และ มากกว่า 6.5 ตามลำดับสาร nuciferine ยับยั้งเชื้อ HIV ในหลอดทดลอง โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 0.8 ก./ไมโครลิตร โดยมีค่า Therapeutic index เท่ากับ 36 (Kashiwada, *et al.*, 2005)

การศึกษาทางพิษวิทยา

เกสรบัวหลวงก่อเกิดการแพ้ได้ในบางคน สารสกัดแอลกอฮอล์ของเกสรบัวหลวงขนาด 10 กรัม/กิโลกรัม โดยการป้อน หรือฉีดใต้ผิวหนังหุ้บจักร ไม่ก่อเกิดความเป็นพิษ (นพมาศ สุนทรเจริญนนท์และ นงลักษณ์ เรืองวิเศษ, 2551)

2.4 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คือการนำส่วนใดส่วนหนึ่งของพืชไม่ว่าจะเป็นส่วนเนื้อเยื่ออวัยวะต่าง ๆ ของพืชหรือเซลล์มาเลี้ยงในสภาพที่ปลอดเชื้อจุลินทรีย์โดยการควบคุมสภาพแวดล้อม เช่น อุณหภูมิแสงความชื้นส่วนต่างๆ ของพืชเหล่านี้จะสามารถเจริญเติบโตพัฒนาเป็นต้นใหม่โดยที่พืชทุกต้นจะมีลักษณะเหมือนกัน การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจึงมีประโยชน์อย่างกว้างขวางในหลายสาขา วิชา เช่นทางด้านการเกษตรทำให้สามารถขยายพันธุ์ได้จำนวนมากในเวลาอันรวดเร็ว หรือสามารถผลิตต้นพันธุ์ที่ปลอดเชื้อได้จำนวนมากและยังสามารถสร้างพันธุ์ใหม่ๆได้โดยการเพาะเลี้ยงคัพภะ (Embryo) อับละอองเกสร (Anther Culture) นอกจากนี้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชยังมีความสำคัญสำหรับการเก็บรักษาพันธุ์พืชในสภาพปลอดเชื้อได้

2.4.1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบัวหลวง

ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบัวหลวง คือการเตรียมชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเจริญของบัวหลวง และการฟอกฆ่าเชื้อ ประกอบด้วยขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้

2.4.1.1 การเลือกชิ้นส่วนของบัวหลวงที่จะนำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ชิ้นส่วนเลือกมาทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อให้สามารถพัฒนาไปเป็นต้นบัวหลวง ชิ้นส่วนของบัวหลวงที่นำมาเลี้ยงควรเป็น หน่อใบอ่อนและคัพภะเนื่องจากจะสามารถชักนำยอดได้จำนวนมาก

2.4.1.2 การฟอกฆ่าเชื้อบริเวณผิวบัวหลวงเพื่อให้ชิ้นส่วนบัวหลวงปลอดโรคเป็นการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ที่ติดมากับชิ้นส่วนพืชไม่ให้มีผลยับยั้งการเจริญ และพัฒนาการของชิ้น ของบัวหลวง ส่วนของบัวหลวงที่จะนำมาใช้ในการขยายพันธุ์ ได้แก่ หน่อใบอ่อน และคัพภะ เป็นต้น ตัดแต่งชิ้นส่วนบัวหลวงให้มีความยาวที่เหมาะสม นำมาทำการล้างทำความสะอาดโดยการฟอกฆ่าเชื้อ ที่ผิวของเนื้อเยื่อเพื่อให้ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ทำได้หลายวิธีขึ้นอยู่กับลักษณะของเนื้อเยื่อบัวหลวง เช่น เนื้อเยื่อบัวหลวงที่อ่อนนุ่ม และบาง โดยทำด้วยความระมัดระวังโดยแช่เนื้อเยื่อบัวหลวงลงในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaOCl) ความเข้มข้น 0.5% หรือคลอรีน 10 % เป็นเวลา 10-15 นาทีเมื่อครบกำหนดเวลาให้ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3

ครั้ง สำหรับเนื้อเยื่อบัวหลวงที่ผิวนอกแข็ง ให้นำเนื้อเยื่อไปล้างทำความสะอาดด้วยน้ำยาซักฟอก และน้ำกลั่น ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว แล้วจุ่มเนื้อเยื่อลงใน 95% เอทิลแอลกอฮอล์ และลนไฟ ส่วนเนื้อเยื่อบัวหลวงที่มีสารประเภท ขี้ผึ้งหรือขนปกคลุม โดยจุ่มเนื้อเยื่อลงใน 70-95% เอทิลแอลกอฮอล์นาน 30 วินาทีถึง 1 นาทีแล้วจึงนำไปแช่ ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaOCl) ความเข้มข้น 0.5% หรือคลอรีน 10 % เป็นเวลา 10-15 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง

2.4.2 การตัดชิ้นส่วนของบัวหลวง

การตัดชิ้นส่วนของบัวหลวงที่จะนำมาเลี้ยงเริ่มจากต้องนำชิ้นส่วนพืชมาล้างน้ำให้สะอาดและตัดส่วนที่ไม่ต้องการให้ออกให้มากที่สุด นำชิ้นส่วนบัวหลวงที่ล้างแล้วมาตัดเป็นท่อนใหญ่ๆ พอประมาณแล้วนำมาฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวตามขั้นตอน ต่อจากนั้นจึงตัดเนื้อเยื่อออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ ให้มีขนาดตามต้องการแล้วจึงนำไปเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อการตัดเนื้อเยื่อให้ใช้มีดผ่าตัดที่คม และทำความสะอาดโดยการจุ่มแอลกอฮอล์ลนไฟฆ่าเชื้อที่ผิวรอให้ใบมีดเย็นก่อนทำการตัดเนื้อเยื่อขนาดและรูปร่างของเนื้อเยื่อที่นำมาเลี้ยง โดยตัดเนื้อเยื่อชิ้นไม่เล็กไม่ใหญ่เกินไปเพื่อให้เนื้อเยื่อมีโอกาสรอดชีวิต และ มีโอกาสปนเปื้อนน้อย

2.4.3 การย้ายเนื้อเยื่อก่อนนำเนื้อเยื่อที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วลงในอาหารเลี้ยง

การย้ายเนื้อเยื่อ บัวหลวง ก่อนนำเนื้อเยื่อ บัวหลวงที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วลงในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ ทำการเช็ดขวดอาหารเพื่อฆ่าเชื้อด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 70 % ก่อนนำเข้าตู้ตัดเนื้อเยื่อเมื่อจะย้ายเนื้อเยื่อลงขวดให้เปิดฝา และลนไฟที่คอขวดจากนั้นใช้ปากคีบที่ลนไฟฆ่าเชื้อและทิ้งให้เย็นแล้วคีบเนื้อเยื่อใส่ขวดควรกดเนื้อเยื่อให้จมลงในอาหารเล็กน้อยแล้วจึงปิดฝาทตามเดิม

2.4.4 การเพิ่มปริมาณต้นบัวหลวง

การเพิ่มปริมาณต้นบัวหลวง มีเทคนิคในการเพิ่มปริมาณต้นบัวหลวง โดยการชักนำให้เกิดยอดจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต่างๆ ของ บัวหลวง เช่น หน่อใบอ่อน และเอ็มบริโอ นั้น ชิ้นส่วนเหล่านี้สามารถจะชักนำให้เกิดจุดกำเนิดยอดและพัฒนาเป็นต้นได้โดยตรงหรือเกิดยอดผ่านแคลล์สวิธีการเพิ่มปริมาณยอดพืชสามารถทำได้หลายวิธีดังนี้

2.4.4.1 การเพิ่มปริมาณยอดโดยการชักนำให้เกิดตาข้างปกติการใช้ฮอร์โมนไซโตไคนินจะมีผลกระทบต่อการแตกตาข้างเมื่อนำส่วนของปลายยอดหรือเนื้อเยื่อเจริญมาเลี้ยงในอาหารซึ่งระยะแรกจะใช้ความเข้มข้นของไซโตไคนินอย่างเดียวหรือร่วมกับออกซินในปริมาณต่ำ ่างๆเมื่อยอดเริ่มมีการพัฒนาย้ายมาเลี้ยงในอาหารสูตรใหม่ที่เพิ่มความเข้มข้นของ BAP และทดลองหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ BAP ในการชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากและแข็งแรงในระยะเวลาที่ความเข้มข้นของออกซินจะค่อย ๆ ลดลงหรือไม่เติมออกซินลงในอาหารเนื่องจากออกซินจะมีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลล์สที่ฐานของรอยตัดเมื่อเพิ่มปริมาณได้ต้นจำนวนมากสามารถชักนำให้ออกรากได้โดยการย้ายยอดที่ได้มาเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมฮอร์โมนเป็นต้น

2.4.4.2 การเพิ่มยอดโดยการชักนำให้เกิด adventitious shoots การนำเอาชิ้นส่วนของใบ ลำต้น ราก มาเลี้ยงในอาหารยอดที่เกิดขึ้นจะพัฒนามาจาก adventitious shoots สามารถนำเอาวิธีนี้มาใช้ประโยชน์ในการขยายพันธุ์พืชโดยวิธีการตัดชำการตอนใช้ได้กับพืชหลายชนิด

2.4.4.3 การชักนำให้เกิดยอดจากแคลลัส โดยปกติแล้วแคลลัสจะเกิดจากรอยแผลหรือรอยตัดของชิ้นส่วนหรือในอาหารที่มีออกซินหรือออกซินร่วมกับไซโตไคนิน การชักนำให้เกิดยอดจากแคลลัสจะสามารถชักนำได้โดยการเลี้ยงในอาหารที่มีระดับไซโตไคนินในระดับที่สูงกว่าออกซิน เมื่อพิจารณาถึงระดับฮอร์โมน ออกซิน:ไซโตไคนิน พบว่าถ้าสัดส่วนของออกซินต่ำกว่าไซโตไคนินแคลลัสจะพัฒนาเป็นยอดหรือเอ็มบริโอ ซึ่งจะสามารถพัฒนาเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ต่อไป การชักนำให้เกิดยอดจากแคลลัสจะมีข้อจำกัดคือ หลังจากย้ายเนื้อเยื่อไปนานๆความสามารถในการชักนำให้เกิดเป็นต้นจะลดลงและโอกาสที่จะเกิดการกลายพันธุ์หรือการเปลี่ยนแปลงของยีนภายในเซลล์บางครั้งทำให้ต้นพืชที่พัฒนาขึ้นมามีลักษณะทางพันธุกรรมแตกต่างไปจากต้นพ่อแม่ สภาวะที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อบัวหลวงโดย แหล่งของแสงที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพืชคือ หลอดฟลูออเรสเซนต์สีขาวจะให้แสงสีขาวมีความเข้มของแสงอยู่ประมาณ 1,000-5,000 ลักซ์ปกติ พืชต้องการช่วงแสงประมาณ 8-16 ชั่วโมงอุณหภูมิโดยทั่วไปอยู่ในช่วง 20-28 องศาเซลเซียส ที่เหมาะสมสำหรับพืชความชื้นสัมพัทธ์ที่เหมาะสมอยู่ประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์

2.5 การศึกษาวิจัยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชวงศ์บัว

สุเมธธัญญารณ (2537) และ ภณทิลา อุดร (2551) นำชิ้นส่วนตาของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกมาเลี้ยงในอาหารเหลวบนอาหารแข็งสูตร $\frac{1}{2}$ MS โดยทดสอบผลของ NAA ร่วมกับ BA และ indole-3-acetic acid (IAA) ร่วมกับ Nisopentenylaminopurine (2iP) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆเป็นเวลา 20 สัปดาห์พบว่าชิ้นส่วนเจริญเติบโตได้ดีที่สุดในอาหารที่เติม IAA 3 ไมโครโมลาร์ร่วมกับ 2iP 10 ไมโครโมลาร์โดยเกิดยอด 9.65 ยอดต่อชิ้นส่วนมีใบเกิดขึ้น 10.93 ใบต่อชิ้นส่วนและทำให้เกิดรากมากที่สุด 31.56 ราก

ศิริศักดิ์สุนทรยาตร (2537) และ ภณทิลา อุดร (2551) เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบัวหลวงพันธุ์สัตตบุษย์โดยใช้ชิ้นส่วนตาที่ไหลแล้วนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวบนอาหารแข็งสูตร $\frac{1}{2}$ MS โดยเติมที่ระดับความเข้มข้น IAA 0, 3 และ 6 ไมโครโมลาร์ร่วมกับ 2iP ที่ระดับความเข้มข้น 0, 5, 10, 15 และ 20 ไมโครโมลาร์พบว่าอาหารที่เติม IAA 3 ไมโครโมลาร์ร่วมกับ 2iP 15 ไมโครโมลาร์สามารถชักนำให้เกิดตายอดได้มากที่สุดคือ 0.78 ตามีจำนวนใบเฉลี่ย 0.93 ใบและความยาวรากเฉลี่ย 0.85 เซนติเมตรหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 สัปดาห์

ณรรุณ ปิยโชติสกุลชัย (2539) และ ภณทิลา อุดร (2551) เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบัวหลวงโดยใช้ยอดอ่อนเหนือใบเลี้ยงมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตต่างๆพบว่าอาหารที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถชักนำให้เกิดยอดมากที่สุดคือ 11.1 ยอดและในอาหารที่เติม NAA 5 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ 40 เปอร์เซ็นต์ลักษณะของแคลลัสที่ได้มีสีน้ำตาลเมื่อนำเมล็ดมาเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ thidiazuron (TDZ) 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตรนาน 8 สัปดาห์

พบว่าเมล็ดเกิดแคลลัส 100 เปอร์เซ็นต์แคลลัสที่ได้มีลักษณะใสฉ่ำน้ำน้ำตาลเขียวและเมื่อนำยอดที่ได้มาชก
น้ำให้เกิดรากพบว่าอาหารที่เติม NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตรชักนำให้เกิดรากได้มากที่สุด 3.3 รากรากมีลักษณะ
หนาและมีแขนงมาก

วิชัย ฤทธิปัญญวานิช (2543)และภณทิลา อุดร (2551)เพาะเลี้ยงเอ็มบริโอของบัวหลวง 2 ชนิดคือ
Nelumbonucifera Gaertn. และ *N. lutea* Pers. บนอาหารสูตร MS ในสภาพอาหารแข็งที่เททับด้วยอาหาร
เหลวอีกชั้นเติม BA และ 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) ความเข้มข้น 0, 1, 2, 3 และ 4
มิลลิกรัมต่อลิตรพบว่าเอ็มบริโอทั้ง 2 ชนิดมีการเจริญเติบโตและพัฒนาได้ดีที่สุดบนอาหารที่ไม่เติมสารควบคุม
การเจริญเติบโตใดๆซึ่งสามารถชักนำให้เกิดยอดและรากได้ดีแต่ในอาหารที่เติม 2,4-D 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อ
ลิตรสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้แต่ไม่สามารถชักนำให้เกิดยอดและรากได้และเมื่อย้ายยอดอ่อนที่ไม่มีรากลง
บนอาหารที่เติม NAA ความเข้มข้น 0, 1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตรพบว่า NAA ไม่สามารถกระตุ้นให้ยอดอ่อน
เกิดรากได้เมื่อย้ายปลูกในวัสดุปลูก 3 ชนิดเป็นเวลา 4 สัปดาห์พบว่าบัวหลวงเจริญได้ดีในดินเหนียวเจริญได้ไม่ดี
ในดินเหนียวปนทรายและไม่สามารถเจริญได้ในทราย

มนทิรา ไชยตะยากร (2545)และภณทิลา อุดร (2551)ศึกษาการเกิดแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์
สัตตบงกชโดยนำส่วนเนื้อใบเลี้ยงตาใบเลี้ยงและใบอ่อนมาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D 0 4
6 8 และ 10 ไมโครโมลาร์ร่วมกับ BA 0 0.5 และ 1 ไมโครโมลาร์นาน 16 สัปดาห์พบว่าส่วนเนื้อใบเลี้ยงเกิด
แคลลัสได้ดีที่สุดคือ 100 เปอร์เซ็นต์อาหารที่เติม 2,4-D 10 ไมโครโมลาร์ร่วมกับ BA 0.5 ไมโครโมลาร์เมื่ออายุ
4 สัปดาห์ส่วนตาให้ลักษณะแคลลัสที่ดีที่สุดในอาหารที่เติม 2,4-D 4 ไมโครโมลาร์ร่วมกับ BA 1 ไมโครโมลาร์
เมื่ออายุ 12 สัปดาห์ส่วนใบเลี้ยงเกิดแคลลัสน้อยที่สุดและเป็นแคลลัสที่ไม่สามารถพัฒนาเป็นไซมาติกเอ็มบริโอ
ได้สำหรับชิ้นส่วนใบอ่อนให้น้ำหนักดีที่สุดคือ 0.46 กรัมเมื่ออายุ 12 สัปดาห์หลังจากนั้นย้ายแคลลัสที่ได้จาก
การเลี้ยงบนอาหารที่มี 2,4-D 0 4 6 8 และ 10 ร่วมกับ BA 1 ไมโครโมลาร์มาเลี้ยงในอาหารที่มี 2,4-D 0 2 3
4 และ 5 ไมโครโมลาร์ร่วมกับ BA 0 และ 0.5 ไมโครโมลาร์พบว่าแคลลัสที่เคยเลี้ยงบนอาหารที่มี 2,4-D 4 ไม
โครโมลาร์ร่วมกับ BA 1 ไมโครโมลาร์แล้วย้ายลงอาหารที่มี 2,4-D 2 ไมโครโมลาร์ร่วมกับ BA 0.5 ไมโครโมลาร์
เกิดไซมาติกเอ็มบริโอได้ดีที่สุดคือ 33.33% เมื่ออายุ 12 สัปดาห์ส่วนแคลลัสที่ย้ายจากอาหารที่เติม 2,4-D 6
ไมโครโมลาร์ร่วมกับ BA 1 ไมโครโมลาร์ลงอาหารที่มี 2,4-D 4 ไมโครโมลาร์ร่วมกับ BA 0.5 ไมโครโมลาร์ให้ไซ
มาติกเอ็มบริโอที่มีลักษณะดีที่สุดคือ 2.44 คะแนนในสัปดาห์ที่ 8 และให้น้ำหนักสดดีที่สุดคือ 0.55 กรัมใน
สัปดาห์ที่ 12

Kane et al. (1988) และภณทิลา อุดร (2551)เพาะเลี้ยงเอ็มบริโอของ *Nelumbolutea* ในอาหารที่มีธาตุ
อาหารครึ่งหนึ่งของสูตร MS เติม BA ความเข้มข้น 0, 0.44, 1.32, 4.4, 13.2 และ 44 ไมโครโมลาร์ zeatin
ความเข้มข้น 0, 0.46, 1.38, 4.6 และ 46 ไมโครโมลาร์ Gibberellic acid (GA3) ความเข้มข้น 0, 0.29, 2.9,
29 และ 290 ไมโครโมลาร์และ abscisic acid (ABA) ความเข้มข้น 0, 0.038, 0.38, 3.8 และ 38 ไมโครโมลาร์

หลังจากเลี้ยงได้ 28 วันพบว่าเอ็มบริโอที่เลี้ยงบนอาหารยังมีชีวิตอยู่แต่ไม่มีการพัฒนาและเจริญเติบโตส่วนที่เลี้ยงในอาหารเหลวมีการยืดยาวอย่างรวดเร็วภายใน 3 สัปดาห์เอ็มบริโอมีการเจริญมีข้อเกิดขึ้น 3-4 ข้อเมื่อตัดแยกส่วนยอดไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรต่างๆพบว่า GA3 ส่งเสริมการยืดยาวของปล้องจำนวนข้อเพิ่มขึ้นเมื่อระดับความเข้มข้นเพิ่มขึ้นการยืดของใบตอบสนองต่อ GA3 2.9 และ 29 ไมโครโมลาร์ขึ้นส่วนไม่ตอบสนองต่อ BA และ zeatin ส่วน ABA ยับยั้งการเจริญของลำต้นโดยความยาวของก้านใบและจำนวนข้อลดลงเมื่อระดับความเข้มข้นของ ABA เพิ่มขึ้น

Yamamoto และ Mutsumoto (1990) และ ภัณฑิลา อุดร (2551) ศึกษาผลของปริมาณน้ำตาลซูโครสในอาหารต่อการเจริญของบัวหลวง (*Nelumbonucifera*) โดยเฉพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลายยอดบนอาหารที่เติมซูโครสความเข้มข้น 2-8 เปอร์เซ็นต์พบว่าถ้าปริมาณน้ำตาลเพิ่มขึ้นจะทำให้จำนวนใบและยอดลดลง แต่ถ้าปริมาณน้ำตาลน้อยจะทำให้อัตราการรอดชีวิตในการย้ายปลูกลดลงซึ่งปริมาณน้ำตาล 8 เปอร์เซ็นต์สามารถทำให้มีอัตราการรอดชีวิตเพิ่มขึ้นต้นที่ได้มีการเจริญเติบโตมีลักษณะใบและลำต้นปกติ

Jenks *et al.* (1990) และ ภัณฑิลา อุดร (2551) ใช้ส่วนของต้นอ่อนบนใบ (epiphyllous plantlet) ของ *Nymphaea "Daubeniana"* โดยนำต้นอ่อนไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติมซูโครส 87.6 มิลลิโมลาร์ myoinositol 0.56 มิลลิโมลาร์ thiamine-HCL 1.2 ไมโครโมลาร์ 2iP 10 ไมโครโมลาร์ และ IAA 3 ไมโครโมลาร์เลี้ยงนาน 5 สัปดาห์พบว่าต้นอ่อนมีการเจริญเติบโตโดยใบที่เจริญขึ้นมาไม่มีตาเกิดขึ้นหลังจากนั้นย้ายลงเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งเป็นเวลา 4 สัปดาห์ยังคงให้ผลเช่นเดิมจึงนำต้นอ่อนย้ายลงในอาหารเหลวที่เติม TDZ 3 ไมโครโมลาร์เป็นเวลา 5 สัปดาห์พบว่าใบที่เจริญขึ้นมาใหม่มีตาบนใบตามปกติ

Lakshmanan (1994) และ ภัณฑิลา อุดร (2551) เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ *Nymphaea* ลูกผสมพันธุ์ "James Brydon" จากชิ้นส่วนยอดของเหง้าบนอาหารสูตร MS ที่เติม IAA, NAA, 2,4-D, BA และ 2iP ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกันพบว่าการใช้ BA 11.1 ไมโครโมลาร์, 2iP 32 ไมโครโมลาร์ และ NAA 4.0 ไมโครโมลาร์ร่วมกันทำให้เกิดยอดจำนวน 2.8 ยอดต่อชิ้นส่วนในเวลา 45 วัน

2.6 การสกัดพืชสมุนไพร

การสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compound) จากพืชสมุนไพร (herbal extraction) ทำได้หลายวิธีขึ้นอยู่กับชนิดของสาร ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ คุณสมบัติของสาร ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ในการทนต่อความร้อน ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ แต่ละวิธีมีข้อดีและข้อจำกัดวิธีเหล่านี้ได้แก่

- การสกัดแบบมาเชอเรชัน (Maceration) เป็นวิธีการสกัดสารสำคัญจากพืชโดยวิธีหมักสมุนไพรกับตัวทำละลายในภาชนะที่ปิดเช่นขวดปากกว้าง ขวดรูปชมพู่ หรือ โถ เป็นต้น ทิ้งไว้ 3 วัน หมั่นเขย่าหรือคนบ่อยๆ เมื่อครบกำหนดเวลาจึงค่อยๆ รินเอาสารสกัดออก พยายามบีบสารละลายออกจากกาก (Marc) ให้มากที่สุด

รวมสารสกัดที่ได้นำไปกรอง การสกัดถ้าจะสกัดให้หมด (Exhausted) อาจจำเป็นต้องสกัดหลายๆ ครั้ง วิธีนี้มีข้อดีที่สารไม่ถูกความร้อนแต่เป็นวิธีที่สิ้นเปลืองตัวทำละลายมาก

- การสกัดแบบเพอร์โคเลชัน (Percolation) เป็นวิธีสกัดสารสำคัญแบบต่อเนื่อง แบบไม่ใช้ความร้อน โดยใช้เครื่องมือที่เรียกว่า Percolation โดยนำสมุนไพรมาหั่นกับตัวทำละลายพอชื้น ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมงเพื่อให้พองตัวเต็มที่แล้วค่อยๆ บรรจุผงยาที่ละเอียดเป็นชั้นลงใน Percolator เติมตัวทำละลายลงไปให้ระดับตัวทำละลายสูงเหนือสมุนไพรประมาณ 0.5 เซนติเมตร ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง จึงเริ่มไขสารสกัดออกโดยค่อยเติมตัวทำละลายเหนือสมุนไพรไว้อย่าให้แห้ง เก็บสารสกัดจนการสกัดสมบูรณ์บีบกากเอาสารสกัดออกให้มากที่สุด นำสารสกัดที่เก็บได้ทั้งหมดรวมกัน แล้วนำไปกรอง

- การสกัดแบบซอกซ์เลต (Soxhlet extraction) เป็นวิธีการสกัดอย่างต่อเนื่อง แบบใช้ความร้อนโดยใช้ตัวทำละลายที่มีจุดเดือดต่ำ การสกัดทำได้โดยใช้ความร้อนทำให้ตัวละลายใน Flask ระเหยขึ้นไป แล้วกลั่นตัวลงมาใน Thimble ซึ่งบรรจุสมุนไพรไว้

- การสกัดแบบลิควิด - ลิควิด (Liquid - liquid Extraction) เป็นการสกัดสารจากสารละลายซึ่งเป็นของเหลวลงในตัวทำละลายอีกชนิดหนึ่ง ซึ่งไม่ผสมกับตัวทำละลายชนิดแรกแบ่งเป็น 2 ชนิดคือ

Extractant lighter คือตัวทำละลายที่ใช้สกัดเบากว่าตัวทำละลายที่ใช้ละลายสาร

Raffinate lighter คือตัวทำละลายที่ใช้สกัดหนักกว่าตัวทำละลายที่ใช้ละลายสาร

- การสกัดแบบ Extraction by thermomicrodistillation เป็นการสกัดสารโดยใช้เครื่องมือ ThermomicroAnalysis and Separation Ovens (TAS Oven) เป็นการสกัดสารที่มีจำนวนน้อยมากๆ

- การสกัดแบบด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (sonication)

- การกลั่นด้วยไอน้ำ (steam distillation)

- การสกัดของแข็งด้วยของเหลว (solid-liquid extraction) เป็นต้น