

บทที่ 3

วัสดุ และวิธีการวิจัย

3.1 วัสดุที่ใช้ในงานวิจัย

1. พืชสมุนไพร

- 1) เนื้อเยื่อเจริญ และส่วนต่างๆของบัวหลวง (*Nelumbo nucifera* Gaertn.)

2. สารเคมี

- 1) เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ (95 % ethanol)
- 2) เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ (70 % ethanol)
- 3) ผงวุ้น (agar)
- 4) เดรกโทส (dextrose)
- 5) เพปโตน (peptone)
- 6) สารสกัดจากเนื้อ (beef extract)
- 7) กลีเซอรอล (glycerol)
- 8) คลอโรฟอร์ม (Chloroform (บริษัทพี.ไ., ประเทศไทย)
- 9) เอทิล อะซิเตต (Ethyl acetate (บริษัทพี.ไ., ประเทศไทย)
- 10) เมทานอล (Methanol (บริษัทพี.ไ., ประเทศไทย)
- 11) Gallic acid (Sigma, USA),

อุปกรณ์

- 1) ตู้บ่มเชื้อ (incubator)
- 2) หม้อนึ่งอัดไอน้ำ (autoclave)
- 3) เครื่องชั่งสารทศนิยม 2 ตำแหน่ง (2-decimal balance)
- 4) เครื่องชั่งสารทศนิยม 3 ตำแหน่ง (3-decimal balance)
- 5) ตู้เย็น (refrigerator)
- 6) เตาแม่เหล็กไฟฟ้า (hot plate)
- 7) ตู้อบอุณหภูมิสูง (hot air oven)
- 8) ตู้เขี่ยเชื้อ (laminar air flow hood)
- 9) ปากคีบ (forcep)
- 10) เครื่องระเหยสุญญากาศ (rotary evaporator)
- 11) เข็มเย็บเชื้อ (needle)

- 12) ห่วงถ่ายเชื้อ (loop)
- 13) กระบอกฉีดพ่น (foggy sprayer)
- 14) เครื่องปั่นผลไม้(blender)
- 15) กล้องถ่ายรูป (camera)
- 16) กล้องจุลทรรศน์(compound microscope)
- 17) มีดผ่าตัด (scalpel)
- 18) เครื่องเขย่า (shaker)
- 19) อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
- 20) ไมโครเวฟ (microwave)
- 21) กระดาษกรองเบอร์ 1 (whatman No.1)
- 22) คอร์กโบเรอ (cork borer)
- 23) ฮีมาไซโตมิเตอร์ (hemacytometer)
- 24) ช้อนตักสาร (spatula)
- 25) ช้อนตักสารสแตนเลส (spatula stainless steel)
- 28) ดิจิตอลเวอร์เนีย (digital vernier caliper)
- 29) เครื่องเขย่า (shaker)
- 30) เครื่องผสมสาร (vortex mixer)
- 31) เครื่องระเหยตัวทำละลาย (Rotary vacuum evaporator (EYELA, Japan)
- 32) TLC silica gel 60GF 254 (precoated plate) (Merck, Germany)
- 33) เครื่องชั่ง สารทศนิยม 5 ตำแหน่ง (KERNALT 100-5AM, Germany)

เครื่องแก้ว

- 1) จานเพาะเลี้ยง (petri dish)
- 2) หลอดทดลอง (test tube)
- 3) กระบอกตวง (graduated cylinder) ขนาด 250, 500, 1000 มิลลิลิตร
- 4) ปีกเกอร์ (beaker) ขนาด 250, 500, 1000 มิลลิลิตร
- 5) แท่งแก้วคนสาร (stirrer)
- 6) ปิเปต (pipette) ขนาด 1, 5, 10 มิลลิลิตร
- 7) ไมโครปิเปต (micropipette) ขนาด 20, 100, 1000 ไมโครลิตร
- 8) แท่งแก้วรูปตัววี และ แท่งแก้วรูปตัว L (spreader)
- 9) ขวดเก็บสารก้นกลม (round bottom flask)
- 10) ขวดระเหยสารรูปหยดน้ำ

- 11) ขวดรูปชมพู่ (flask) ขนาด 250, 500, 1000 มิลลิลิตร
- 12) ขวดเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ (duran)
- 13) กรวยแยก(separatory funnel)
- 14) หลอดหยดสาร (dropper)

อุปกรณ์อื่นๆ

- 1) ถุงพลาสติก(plastic bag)
- 2) ส้าลี (cotton wool)
- 3) ยางรัด(rubber band)
- 4) ทิชชู(paper)
- 5) สไลด์ และกระจกปิดสไลด์ (slide and cover slide)
- 6) ผ้าขาวบาง (linin clothes)
- 7) ถุงมือ (nitrile gloves blue)

3.2 การเตรียมชิ้นส่วนเซลล์เนื้อเยื่อเจริญของบัวหลวง

การเตรียมชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเจริญของบัวหลวง และการฟอกฆ่าเชื้อ ประกอบด้วยขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้

3.2.1 การเลือกชิ้นส่วนของบัวหลวงที่จะนำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ชิ้นส่วนเลือกมาทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อให้สามารถพัฒนาไปเป็นต้นบัวหลวง ชิ้นส่วนของบัวหลวงที่นำมาเลี้ยงควรเป็นหน่อใบอ่อน และเอ็มบริโอ เนื่องจากจะสามารถชักนำยอดได้จำนวนมาก

3.2.2 การฟอกฆ่าเชื้อบริเวณผิวบัวหลวงเพื่อให้ชิ้นส่วนบัวหลวงปลอดโรคเป็นการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ที่ติดมากับชิ้นส่วนพืชไม่ให้น้ำมีผลยับยั้งการเจริญ และพัฒนาการของชิ้นส่วนของบัวหลวงที่จะนำมาใช้ในการขยายพันธุ์ ได้แก่ หน่อใบอ่อน และเอ็มบริโอ เป็นต้น ตัดแต่งชิ้นส่วนบัวหลวงให้มีความยาวที่เหมาะสม นำมาทำการล้างทำความสะอาดโดยการฟอกฆ่าเชื้อ ที่ผิวของเนื้อเยื่อเพื่อให้ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ทำได้หลายวิธีขึ้นอยู่กับลักษณะของเนื้อเยื่อบัวหลวง เช่น เนื้อเยื่อบัวหลวงที่อ่อนนุ่ม และบาง โดยทำด้วยความระมัดระวังโดยแช่เนื้อเยื่อบัวหลวงลงในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaOCl) ความเข้มข้น 0.5% หรือคลอรีน 10 % เป็นเวลา 10-15 นาทีเมื่อครบกำหนดเวลาให้ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง สำหรับเนื้อเยื่อบัวหลวงที่ผิวนอกแข็ง ให้นำเนื้อเยื่อไปล้างทำความสะอาดด้วยน้ำยาซักฟอก และน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว แล้วจุ่มเนื้อเยื่อลงใน 95% เอทิลแอลกอฮอล์ และลนไฟ ส่วนเนื้อเยื่อบัวหลวงที่มีสารประเภทขี้ผึ้งหรือขนปกคลุม โดยจุ่มเนื้อเยื่อลงใน 70-95% เอทิลแอลกอฮอล์นาน 30 วินาทีถึง 1 นาทีแล้วจึงนำไปแช่ใน

สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaOCl) ความเข้มข้น 0.5% หรือคลอรีน 10 % เป็นเวลา 10-15 นาทีเมื่อครบกำหนดเวลาดำยด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง

3.3 การตัดชิ้นส่วนของบวหลวง

การตัดชิ้นส่วนของบวหลวงที่จะนำมาเลี้ยงเริ่มจากต้องนำชิ้นส่วนพีชมาล้างน้ำให้สะอาดและตัดส่วนที่ไม่ต้องการให้ออกให้มากที่สุด นำชิ้นส่วนบวหลวงที่ล้างแล้วมาตัดเป็นท่อนใหญ่ๆ พอประมาณแล้วนำมาฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวตามขั้นตอน ต่อจากนั้นจึงตัดเนื้อเยื่อออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ ให้มีขนาดตามต้องการ แล้วจึงนำไปเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อการตัดเนื้อเยื่อให้ใช้มีดผ่าตัดที่คม และทำความสะอาดโดยการจุ่มแอลกอฮอล์ลงไฟฆ่าเชื้อที่ผิวรอให้ใบมีดเย็นก่อนทำการตัดเนื้อเยื่อขนาด และรูปร่างของเนื้อเยื่อนำมาเลี้ยง โดยตัดเนื้อเยื่อชิ้น ไม่เล็กไม่ใหญ่เกินไปเพื่อให้เนื้อเยื่อมีโอกาสรอดชีวิต และมีโอกาสปนเปื้อนน้อย

3.4 การย้ายเนื้อเยื่อก่อนนำเนื้อเยื่อที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วลงในอาหารเลี้ยง

การย้ายเนื้อเยื่อ บวหลวง ก่อนนำเนื้อเยื่อ บวหลวงที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วลงในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ ทำการเช็ดขวดอาหารเพื่อฆ่าเชื้อด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 70 % ก่อนนำเข้าตู้ตัดเนื้อเยื่อเมื่อจะย้ายเนื้อเยื่อลงขวดให้เปิดฝาและ ลนไฟที่คอขวดจากนั้นใช้ปากคีบที่ลนไฟฆ่าเชื้อและทิ้งให้เย็นแล้วคีบเนื้อเยื่อใส่ขวด ควรกดเนื้อเยื่อให้จมลงในอาหารเล็กน้อยแล้วจึงปิดฝาตามเดิม

3.5 การเพิ่มปริมาณต้นบวหลวง

การเพิ่มปริมาณต้นบวหลวง มีเทคนิคในการเพิ่มปริมาณต้นบวหลวง โดยการชักนำให้เกิดยอดจากการเพาะเลี้ยงชิ้น ส่วนต่างๆ ของบวหลวง เช่น หน่อใบอ่อน และเอ็มบริโอ นั้น ชิ้นส่วนเหล่านี้สามารถจะชักนำให้เกิดจุดกำเนิดยอด และพัฒนาเป็นต้นได้โดยตรงหรือเกิดยอดผ่านแคลล์สวิธีการเพิ่มปริมาณยอดพืชสามารถทำได้หลายวิธีดังนี้

3.5.1 การเพิ่มปริมาณยอดโดยการชักนำให้เกิดตาข้างปกติการใช้ฮอร์โมนไซโตไคนินจะมีผลกระตุ้นการแตกตาข้างเมื่อนำส่วนของปลายยอดหรือเนื้อเยื่อเจริญมาเลี้ยงในอาหารซึ่งระยะแรกจะใช้ความเข้มข้นของไซโตไคนินอย่างเดียวหรือร่วมกับออกซินในปริมาณต่ำ ่างๆเมื่อยอดเริ่มมีการพัฒนา

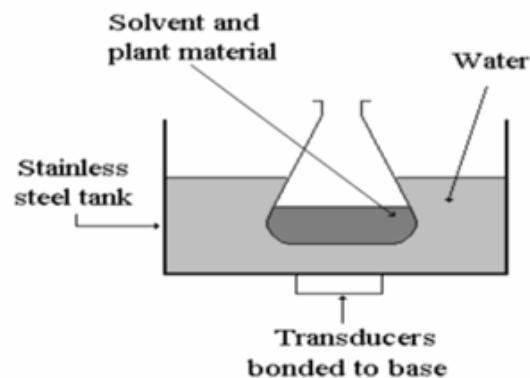
ย้ายมาเลี้ยงในอาหารสูตรใหม่ที่เพิ่มความเข้มข้นของ BAP และทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ BAP ในการชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากและแข็งแรงในระยะเวลาที่ความเข้มข้นของออกซินจะค่อย ๆ ลดลงหรือไม่เดิมออกซินลงในอาหารเนื่องจากออกซินจะมีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสที่ฐานของ รอยตัดเมื่อเพิ่มปริมาณได้ต้นจำนวนมาก สามารถชักนำให้ออกรากได้โดยการย้ายยอดที่ได้มาเลี้ยงใน อาหารที่ไม่เติมฮอร์โมน เป็นต้น

3.5.2 การเพิ่มยอดโดยการชักนำให้เกิด adventitious shoots การนำเอาชิ้นส่วนของใบลำต้น ราก มาเลี้ยงในอาหารยอดที่เกิดขึ้นจะพัฒนามาจาก adventitious shoots สามารถนำเอาวิธีนี้มาใช้ ประโยชน์ในการขยายพันธุ์พืชโดยวิธีการตัดชำการตอนใช้ได้กับพืชหลายชนิด

3.5.3 การชักนำให้เกิดยอดจากแคลลัส โดยปกติแล้วแคลลัสจะเกิดจากรอยแผลหรือรอยตัด ของชิ้นส่วนหรือในอาหารที่มีออกซินหรือออกซินร่วมกับไซโตไคนิน การชักนำให้เกิดยอดจากแคลลัส จะสามารถชักนำได้โดยการเลี้ยงในอาหารที่มีระดับไซโตไคนินในระดับที่สูงกว่าออกซิน เมื่อ 19 พิจารณาถึงระดับฮอร์โมน ออกซิน:ไซโตไคนิน พบว่าถ้าสัดส่วนของออกซินต่ำกว่าไซโตไคนินแคลลัส จะพัฒนาเป็นยอด หรือเอมบริโอ ซึ่งจะสามารถพัฒนาเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ต่อไป การชักนำให้เกิด ยอดจากแคลลัสจะมีข้อจำกัดคือ หลังจากย้ายเนื้อเยื่อไปนานๆความสามารถในการชักนำให้เกิดเป็น ต้นจะลดลงและโอกาสที่จะเกิดการกลายพันธุ์หรือการเปลี่ยนแปลงของยีนภายในเซลล์บางครั้งทำให ้ ต้นพืชที่พัฒนาขึ้นมาจะมีลักษณะทางพันธุกรรมแตกต่างไปจากต้นพ่อแม่ สภาวะที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อ บัว หลวงโดย แสงของแสงที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพืชคือ หลอดฟลูออเรสเซนต์สีขาวจะให้ แสงสีขาวมี ความเข้มของแสงอยู่ประมาณ 1,000-5,000 ลักซ์ปกติพืชต้องการช่วงแสงประมาณ 8-16 ชั่วโมง อุณหภูมิโดยทั่วไปอยู่ในช่วง 20-28 องศาเซลเซียส ที่เหมาะสมสำหรับพืช ความชื้นสัมพัทธ์ที่ เหมาะสมอยู่ประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์

3.6 การเตรียมสารสกัดเซลล์ต้นกำเนิดบัวหลวง

นำตัวอย่างเนื้อเยื่อเจริญบัวหลวง และนำส่วนตัวอย่างเนื้อเยื่อเจริญบัวหลวง ที่ผ่านการวิเคราะห์ทาง พฤษศาสตร์มาอบที่อุณหภูมิ 60 ° C และทำการบดเนื้อเยื่อเจริญบัวหลวงแห้งด้วยเครื่องบดพืชสมุนไพร แล้ว ผ่านตะแกรงแรงมาตรฐานขนาด 20 mesh หลังจากนั้นนำเนื้อเยื่อเจริญบัวหลวง ผงมาสกัดด้วยตัวทำละลาย เมทานอลโดยอัลตราซาวนด์โดยอาศัยตัวกลางเช่น น้ำในการส่งผ่านคลื่นเสียง ดังแสดงในภาพที่ 1 นำสารสกัด ที่สกัดได้มาระเหยตัวทำละลายโดยเครื่อง evaporator เก็บสารสกัดไว้ที่อุณหภูมิ 4° C เพื่อนำมาทดสอบ ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา และการตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดต่อไป



ภาพที่ 3.1 การสกัดสารเนื้อเยื่อเจริญบัวหลวงโดยอัลตราซาวนด์โดยอาศัยตัวกลางใช้น้ำในการส่งผ่านคลื่นเสียง (สุเมธ บุญเกิด, 2556)

3.7 การทดสอบหากลุ่มสารประกอบทางเคมีชั้นเบื้องต้น

วิธีการทดสอบหากลุ่มสารประกอบทางเคมีชั้นเบื้องต้น ของเนื้อเยื่อเจริญบัวหลวง ทำตามวิธีของ Professor Farnsworth ซึ่งเป็นการศึกษาทดสอบหาสารประกอบทางเคมีที่มีอยู่ในพืชโดยอาศัยปฏิกิริยาสีหรือตะกอน วิธีทดสอบนี้เป็นวิธีที่ทำได้อย่างรวดเร็ว ง่าย และใช้เครื่องมือน้อย เป็นการตรวจสอบหากลุ่มสารประกอบทางเคมี ได้แก่ กลุ่มสารแอลคาลอยด์ (alkaloids), แอนทราควิโนน (anthraquinones), คาร์ดิแอกกลัยโคไซด์ (cardiac glycosides), ไสยาโนจินิกกลัยโคไซด์ (cyanogenic glycosides), ฟลาโวนอยด์ (flavonoids),

แลคโตนกลัยโคไซด์ (lactone glycosides), ซาโปนิน (saponins), และแทนนิน (tannins) (นพมาศ สุนทรเจริญนนท์, นงลักษณ์ เรืองวิเศษ, 2551; สุนีย์ จันทรสกา, 2543; อัมบุญ ล้วนรัตน์, 2536)

การเตรียมสารสกัดเพื่อทดสอบหาส่วนผสมสารประกอบทางเคมีขึ้นเบื้องต้น

ชั่งผงตัวอย่างเนื้อเยื่อเจริญบัวหลวง 30 กรัม ใส่ในขวดชมพู เติมแอลกอฮอล์ 80% ปริมาตร 30 มิลลิลิตร แล้วเขย่าให้แอลกอฮอล์แทรกซึมทั่วผงตัวอย่างเครื่องยา ปิดปากขวดชมพูด้วยแผ่นพาราฟิล์ม นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 72 ชั่วโมง กรอง แล้วปรับปริมาตรให้ได้อัตราส่วน ผงตัวอย่างเครื่องยา : สารสกัดแอลกอฮอล์ เท่ากับ 1 : 1 สารสกัดแอลกอฮอล์นี้拿去ทดสอบหาส่วนผสมสารประกอบทางเคมีต่อไป

วิธีทดสอบหาสารกลุ่มแอลคาลอยด์

ตวงสารสกัดแอลกอฮอล์ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ในภาชนะระเหยแห้ง ตั้งบนหม้ออังไอน้ำ ระเหยให้แห้ง แล้วเติมสารละลายกรดกำมะถันเจือจาง ปริมาตร 5 มิลลิลิตร กรอง แบ่งสารที่กรองได้เป็นส่วน ส่วนที่ 1 (ปริมาตร 1 มิลลิลิตร) นำไปหยดบนแผ่นสไลด์จำนวน 7 แผ่น แล้วหยดน้ำยา Dragendorff's, Hager's, Marme's, Mayer's, Tannic acid, และ Wagner's อย่างละ 1 หยด ลงบนสารทดสอบ สังเกตตะกอนที่เกิดขึ้น ซึ่งผลบวกจะได้ตะกอนสีส้ม, เหลือง, ขาวขุ่น, ขาวขุ่น, ขาวขุ่น, ขาวขุ่น และน้ำตาล ตามลำดับ นำสารที่กรองได้ส่วนที่ 2 (ปริมาตร 4 มิลลิลิตร) ทำให้สภาพเป็นด่าง โดยเติมแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น ทีละ 1 หยด จนมีสภาพเป็นด่าง (ตรวจสอบด้วยกระดาษลิตมัสสีแดง ซึ่งเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน) หลังจากนั้นสกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน นำสารสกัดไดคลอโรมีเทนที่ได้หยดบนกระดาษกรอง 1 หยด แล้วหยดน้ำยา Dragendorff's spray reagent ผลบวกจะได้สีส้ม

วิธีทดสอบหาสารกลุ่มแอนทราควิโนน (วิธี Modified Borntrager's)

ชั่งผงเนื้อเยื่อเจริญบัวหลวง 500 มิลลิกรัม เติม 0.5N KOH ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 1 มิลลิลิตร นำไปตั้งบนหม้ออังไอน้ำ นาน 10 นาที หลังจากนั้น กรอง นำสารที่กรองได้ปรับสภาพให้เป็นกรดด้วยกรดน้ำส้มเข้มข้น สกัดแยกด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำสารสกัดไดคลอโรมีเทนที่ได้เติมน้ำยาแอมโมเนียมเข้มข้น 1-2 มิลลิลิตร ผลบวกจะได้สีแดง หรือสีชมพูในชั้นต่าง

วิธีทดสอบหาสารกลุ่มคาร์ดิแอกกลัยโคไซด์

โครงสร้างทางเคมีของสารกลุ่มคาร์ดิแอกกลัยโคไซด์ ประกอบด้วยโครงสร้างส่วนสเตอรอยด์ (steroidal moiety) โครงสร้างส่วนแลคโตนที่ไม่อิ่มตัว (unsaturated lactone ring moiety) และโครงสร้างส่วนน้ำตาลชนิดหายาก (rare sugar moiety) ฉะนั้นการตรวจสอบกลุ่มคาร์ดิแอกกลัยโคไซด์จึงเป็นการตรวจสอบโครงสร้างทั้งสามส่วนดังกล่าว ดังนี้

การเตรียมตัวอย่าง : ตวงสารสกัดแอลกอฮอล์ ของเนื้อเยื่อเจริญบัวหลวง ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติม lend acetate ความเข้มข้น 10% ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ต้มน้ำหม้ออังไอน้ำ นาน 15 นาที กรองผ่านกระดาษกรอง นำสารที่กรองได้ไปสกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำซ้ำ 3 ครั้ง เติมน้ำกรด ความเข้มข้น 1% เติมน้ำกลั่นเพื่อสกัดไดคลอโรมีเทนที่ได้แบ่งออกเป็น 3 ส่วน

การตรวจสอบโครงสร้างส่วนสเตอรอยด์ : ใช้วิธี Liebermann-Burcnard's ตวงสารสกัดไดคลอโรมีเทน ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในภาชนะระเหยแห้ง แล้วหยดน้ำยา acetic anhydride 3 หยด และหยดกรด กำมะถันเข้มข้น 1 หยด ผลบวก คือ เกิดสีน้ำเงินหรือเขียว ทันที

การตรวจสอบโครงสร้างส่วนแลคโตนที่ไม่อิ่มตัว : ใช้วิธี Kedde's ตวงสารสกัดไดคลอโรมีเทน ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในภาชนะระเหยแห้ง แล้วหยดน้ำยา Kedde's 2-3 หยด และหยดน้ำยา 1N NaOH 1-2 หยด ผลบวกของปฏิกิริยาการเกิดสี คือ สีม่วงชมพู หรือม่วงน้ำเงิน

การตรวจสอบโครงสร้างส่วนน้ำตาลชนิดหายาก : ใช้วิธี Keller-Killiani's ตวงสารสกัดไดคลอโรมีเทน ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง หยดสารละลาย ferric chloride-glacial acetic acid ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วค่อยๆ หยดกำมะถันเข้มข้น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงข้างในหลอดทดลอง ผลบวกของปฏิกิริยาการเกิดสี คือ สีที่เกิดขึ้นระหว่าง รอยต่อของชั้นเป็นสีม่วงแดง แล้วสีจะแพร่เข้าไปในชั้นกรด กำมะถันเข้มข้น

วิธีทดสอบหาสารกลุ่มไซยาโนจีนิกกลัยโคไซด์

ชั่งตัวอย่างสด ปริมาตร 2-3 กรัม ใส่ในขวดชมพู เติมน้ำกลั่นให้ท่วมตัวอย่าง หยดไดคลอโรมีเทน 1-2 หยด รีบ ปิดปากขวดด้วยจุกคอร์กที่แขวนแผ่นกระดาษกรองที่ชุบน้ำยาอิ่มตัวของกรดพิคริก (picric acid) และ 5% sodium carbonate นำขวดไปตั้งบนหม้ออังไอน้ำ สังเกตการณ์เปลี่ยนสีของกระดาษกรอง จากสีเหลืองเป็นสี ส้มอิฐ

การตรวจสอบสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (วิธี Shinoda's)

ดวงสารสกัดแอลกอฮอล์เนื้อเยื่อเจริญบัวหลวง ปริมาตร 3 มิลลิลิตร หยดกรดเกลือเข้มข้นปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วเติม magnesium ribbon 5-8 ชิ้น เมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุด การเกิดสีที่ให้ผลบวกคือ สีส้ม

การตรวจสอบสารกลุ่มแลคโตนกลัยโคไซด์

ชั่งผงเนื้อเยื่อเจริญบัวหลวง 500 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดทดลอง ปิดปากหลอดทดลองด้วยแผ่นกระดาษกรองที่ชุบน้ำยา 20% sodium hydroxide แล้วปิดทับด้วยแผ่นอะลูมิเนียม นำหลอดทดลองไปจุ่มในหม้ออังไอน้ำ นานประมาณ 5 นาที นำกระดาษกรองมาส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร ผลบวกจะเห็นการเรืองแสงสีเขียว หรือสีน้ำเงิน

การตรวจสอบสารกลุ่มซาโปนิน

การตรวจสอบสารกลุ่มซาโปนิน จะทำการทดสอบการเกิดฟอง และการทำปฏิกิริยากับ Libermann-Burchard's test ซึ่งเป็นการตรวจสอบโครงสร้างหลักของสารกลุ่มซาโปนินว่าเป็นแบบ steroidal หรือ triterpenoidal saponins

การทดสอบการเกิดฟอง : ชั่งผงเนื้อเยื่อเจริญบัวหลวง 500 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดทดลอง แล้วเติมน้ำร้อน ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าหลอดทดลองขึ้นลง นาน 10 นาที สังเกตฟองที่เกิดขึ้น วัดความสูงของฟอง หลังจากนั้นหยดกรดเกลือเจือจาง 1 หยด สังเกตฟอง ถ้าฟองยังคงอยู่ แสดงว่าอาจจะมีสารซาโปนิน

การทดสอบตามวิธี Liebermann-Burchard's: ดวงสารสกัดแอลกอฮอล์ 5 มิลลิลิตร ใส่ภาชนะระเหยแห้ง แล้วหยดน้ำยา acetic anhydride แล้วหยดน้ำยากัดกำมะถันเข้มข้น 1 หยด

สรุปผลการทดสอบ ถ้าให้ผลบวกกับการทดสอบฟอง และให้สีน้ำเงินเขียวกับน้ำยา Libermann-Burchard's แสดงว่าอาจจะมีสาร steroidal saponins แต่ถ้าให้ผลบวกกับการทดสอบฟอง และให้สีแดงชมพูหรือสีม่วงแดง กับน้ำยา Liebermann-Burchard's แสดงว่าอาจจะมีสาร triterpenoidal saponins

วิธีทดสอบหาสารกลุ่มแทนนิน

ดวงสารสกัดแอลกอฮอล์ 5 มิลลิลิตร แบ่งออกเป็น 2 ส่วน

ส่วนที่1(ปริมาตร 1 มิลลิลิตร) ระเหยให้แห้ง เติมน้ำ 3 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายเกลือแกง ความเข้มข้น 10% ปริมาตร 2-3 หยด ถ้ามีตะกอนเกิดขึ้น ให้กรอง เอาตะกอนทิ้ง สารละลายที่กรองได้ แบ่งเป็น 3 หลอด

หลอดที่ 1 เติมน้ำยา 1% gelatin หลอดที่ 2 เติมน้ำยา gelatin salt ส่วนหลอดที่ 3 เป็นหลอดควบคุมผลบวกของการทดลองนี้จะได้ตะกอนทั้งหลอดที่ 1 และ 2

ส่วนที่ 2 (ปริมาตร 4 มิลลิลิตร) แบ่งเป็น 5 ส่วน

หลอดที่ 1 เป็นหลอดควบคุม

หลอดที่ 2 หยดน้ำยา 1% ferric chloride ผลบวกจะได้สีน้ำเงิน หรือสีเขียว

หลอดที่ 3 หยดน้ำยา bromine water ผลบวกจะได้ตะกอนเบา สีส้ม

หลอดที่ 4 หยดน้ำยา formalin-HCl แล้วต้มน้ำ 2 นาที ผลบวกจะได้ตะกอนสีแดง

หลอดที่ 5 หยดน้ำยา lime water ผลบวกจะได้ตะกอนสีเทา เหลือๆ

การสรุปผลการทดลอง

1. ให้ผลลบกับน้ำยา gelatin และ gelatin salt ไม่ให้สีกับ ferric chloride แสดงว่าไม่มีสารกลุ่มแทนนิน
2. ให้ผลลบกับน้ำยา gelatin และ gelatin salt ให้สีเขียวกับน้ำยา ferric chloride ให้ผลบวกกับ bromine water, formalin-HCl และให้ผลลบกับน้ำยา lime water แสดงว่ามีสารกลุ่มแทนนินชนิด condensed tannins
3. ให้ผลลบกับน้ำยา gelatin และ gelatin salt ให้สีน้ำเงินหรือสีน้ำเงินดำกับน้ำยา ferric chloride ให้ผลบวกกับน้ำยา lime water ให้ผลลบกับน้ำยา bromine water, formalin-HCl แสดงว่ามีสารกลุ่มแทนนินชนิด hydrolysable tannins

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์เนื้อเยื่อเจริญด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (TLC chromatogram)

การเตรียมสารสกัดเซลล์เนื้อเยื่อเจริญของบัวหลวง

การเตรียมวัตถุดิบ

นำเนื้อเยื่อเจริญของบัวหลวงมาล้างน้ำให้สะอาด ผึ่งให้แห้ง แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำมาบดให้ละเอียด แล้วบรรจุใส่ถุงพร้อมปิดผนึกแบบสุญญากาศ และเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

การเตรียมสารสกัด

ชั่งตัวอย่างเนื้อเยื่อส่วนที่เจริญของบัวหลวง 1 กรัม เติมตัวทำละลายเมทานอล 10 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่อง Shaking water bath 25 °C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไป Centrifuge ที่ 3000 g 3 นาที 4 °C เก็บส่วนใสโดยกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 แล้วนำตะกอนที่เหลือไปสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง ปริมาตรส่วนใสให้ครบ 50 มิลลิลิตร จากนั้นบีบตัวอย่าง 2 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลอง แล้วนำไปทำให้แห้งด้วย Freeze dryer และ Vacuum dryer แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

วิธีการทำเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (TLC chromatogram)

1. นำสารสกัดเนื้อเยื่อเจริญของบัวหลวง ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ไปหยดบนแผ่นวัสดุภาคคงที่ชนิด silica gel GF₂₅₄ ที่ได้เตรียมแผ่นที่แอลซีพร้อมใช้ขนาดความสูง 6.5 เซนติเมตร ความยาวขึ้นอยู่กับจำนวนตัวอย่าง โดยเว้นระยะจากปลายด้านล่าง 1 เซนติเมตร เว้นด้านข้างแผ่นทั้งสองด้านด้านละ 1 เซนติเมตร และเว้นระยะระหว่างแถบ 0.6 เซนติเมตร

2. นำแผ่นที่แอลซีที่ได้หยดสารตัวอย่างแล้ว ไปจุ่มใส่ในภาชนะที่ใส่น้ำยาวิฆาณเคลื่อนคือ benzene:chloroform:ethyl acetate (50:30:20) ระยะทางที่ใช้เท่ากับ 7 cm ซึ่งหลังจากที่เอาแผ่น TLC ออกจากภาชนะแก้วที่มีฝาปิด ที่จนกระทั่งน้ำยาวิฆาณเคลื่อนที่ได้เคลื่อนที่ไปเกือบสุดปลายของแผ่นที่แอลซี นำแผ่นที่แอลซีโครมาโทแกรมที่ได้ไปเป่าให้แห้ง
3. ส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร และ 366 นาโนเมตร และสเปรย์ด้วยสารละลาย 10% sulfuric acid ใน ethanol แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 110 °C เป็นเวลา 10 min ตรวจสอบตำแหน่งของสารบนแผ่น TLC ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร และ 366 นาโนเมตร และสเปรย์ด้วยสารละลาย
4. บันทึกข้อมูลของโครมาโทแกรมด้วยกล้องดิจิทัล

วิธีการเตรียมน้ำยาพ่น

น้ำยาพ่น anisaldehyde/ H₂SO₄: ละลาย anisaldehyde 0.5 มิลลิลิตร ในกรดกำมะถันเข้มข้น 10 มิลลิลิตร เติมนีทานอล 85 มิลลิลิตร ก่อนนำไปพ่นให้เติมกรดกำมะถันเข้มข้น 5 มิลลิลิตร หลังจากนั้นอบที่ 105 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

น้ำยาพ่น phosphomolybdic acid: ละลาย phosphomolybdic acid 20 กรัม ในเอทานอล 95% ปริมาตร 100 มิลลิลิตร หลังจากการพ่นน้ำยาแล้ว นำไปอบที่ 105 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที