บทที่ 3

ผลการวิจัย

การศึกษา hairy root ของลำโพงกาสลัก (Datura metel Linn.)ที่เกิดจากการย้ายยีนจาก Agrobacterium rhizogenes แบ่งการรายงานผลออกเป็น 3 ส่วน ดังนี้

1. การปรับปรุงเทคนิคเบื้องต้นบางประการที่ใช้ในงานวิจัย
2. การชักนำให้เกิด hairy root
3. การเจริญของ hairy root
4. การตรวจหา และวิเคราะห์หาปริมาณ tropane alkaloid

1. การปรับปรุงเทคนิคเบื้องต้นบางประการที่ใช้ในงานวิจัย

ในการศึกษานี้พบว่ามีบางขั้นตอนต้องอาศัยเทคนิคบางประการ ที่ต่างออกไปจากวิธีทั่ว ๆ ไป เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ให้เหมาะกับงานวิจัย ซึ่งได้แก่ เทคนิคการเพาะเมล็ดลำโพงกาสลัก และเทคนิคการฆ่าเชื้อ A. rhizogenes บน hairy root

1.1 เทคนิคการเพาะเมล็ดลำโพงกาสลัก

เมล็ดลำโพงกาสลักเป็นเมล็ดที่มีเปลือกหุ้มเมล็ดหนา และแข็งมาก ซึ่งเป็นอุปสรรคสำคัญต่อการงอกของเอมบริโอ ทำให้การเพาะเมล็ดในระยะแรกด้วยวิธีธรรมดา คือ เพาะเมล็ดที่มีทั้งเปลือกหุ้มเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อไม่ได้ผล แม้ว่าจะเลือกเมล็ดที่อายุต่างกันทั้งอ่อน และแก่ มาแช่ในน้ำอุณหภูมิต่าง ๆ กัน คือ ที่ 30° C 50° C และ 70° C เป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำไปเพาะลงในอาหารทั้งที่เป็นอาหารแข็ง และอาหารเหลวแล้วก็ตาม ก็ยังพบว่าไม่ได้ผล มีเพียง 2-3 เปอร์เซนต์เท่านั้นที่งอกในสัปดาห์ที่ 8 และเป็นต้นที่ไม่ได้สัดส่วน ลักษณะลำต้นคดงอ และแคระเกร็น ไม่เหมาะสำหรับใช้เป็นพืชทดลอง และเมื่อเปลี่ยนมาเพาะเมล็ดโดย การแกะเปลือกหุ้มเมล็ดออกก่อน โดยลักษณะของการแกะต้องใช้มีดผ่าตัดกรีดให้เปลือกหุ้มเมล็ดแยกออกจากกัน แล้วจึงใช้ forcep คีบเมล็ดภายในออกมาเพาะในอาหารแข็งสูตร A พบว่าเริ่มเห็นการเปลี่ยนแปลงของเมล็ดในวันที่ 3 จากเดิมเมล็ดภายในมีสีขาว เริ่มเปลี่ยนเป็น

สีม่วงอ่อน และในสัปดาห์ที่ 1 เมล็ดเกือบทุกเมล็ดจึงงอกได้ มีลำต้นตั้งตรงสูงประมาณ 1 เซนติเมตร พร้อมด้วยใบเลี้ยง 1 คู่ จนกระทั่งในสัปดาห์ที่ 4 จึงได้ต้นกล้าที่มีความสูงประมาณ 4 เซนติเมตร มีใบแท้ 2 คู่ มีลักษณะแข็งแรงเหมาะสำหรับใช้เป็นพืชทดลอง จึงเลือกวิธีนี้มาใช้ในการเพาะเมล็ดโดยตลอด ซึ่งแม้ว่าจะสิ้นเปลืองแรงงาน และเวลาในการเพาะ แต่ให้ผลที่ดี และคุ้มค่ากว่า อย่างไรก็ดีการเลือกผลที่ไม่อ่อน หรือแก่เกินไปก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่จะทำให้การแกะเปลือกหุ้มเมล็ดง่ายขึ้น คือไม่อ่อนจนทำให้เอมบริโอถูกทำลายได้ง่าย และไม่แก่จนทำให้เปลือกหุ้มเมล็ดแข็งยากต่อการแกะ เมื่อได้ต้นกล้าตามต้องการแล้วจึงนำไปเป็น explant สำหรับชักนำให้เกิด hairy rootในขั้นต่อไป โดยสามารถใช้ได้ทั้งส่วนของลำต้น และ ใบ

1.2 เทคนิคการฆ่าเชื้อ A. rhizogenes บน hairy root

หลังจากที่ทำ co-culture แล้ว มีเซลล์ส่วนหนึ่งที่เกิด transformation และเจริญให้ hairy root แต่ยังมีเชื้อ A. rhizogenes ที่ติดมากับ hairy root ซึ่งเป็นอุปสรรคสำคัญต่อการเจริญของ hairy root ที่ถูกแยกมาเลี้ยง ซึ่งอาจกำจัดได้โดย 2 วิธี คือ 1. การตัดเฉพาะส่วนปลายของ hairy root มาเลี้ยง ซึ่งไม่สามารถทำได้ใน hairy root ที่เจริญบนชิ้นใบ เนื่องจากเชื้ออยู่ทั่วไปเป็นบริเวณกว้าง และลงไปถึงอาหารจากการจุ่มชิ้นใบลงใน bacterial solution ส่วนใน hairy root ที่เจริญบนลำต้นนั้น ถ้า hairy root มีความยาวพอก็สามารถทำได้ โดยพยายามตัดบริเวณปลายรากให้มีความยาวไม่เกิน 1 เซนติเมตรจากปลายราก แต่เนื่องจาก hairy root ที่เจริญบนรอยตัดของลำต้นมีลักษณะเป็นเส้นสั้น ความยาวเฉลี่ย เพียง 1 เซนติเมตร เมื่อตัดมาเลี้ยงใหม่พบว่ายังมีเชื้อติดมา และเมื่อตัดให้สั้นเกินไป hairy root ก็มีโอกาสรอดน้อย จึงเปลี่ยนมาใช้วิธีที่ 2 คือ การฆ่าเชื้อโดยใช้ antibiotic ซึ่งในงานวิจัยนี้เลือกใช้ carbenicillin เนื่องจากพบว่างานวิจัยส่วนใหญ่ที่เกี่ยวกับการฆ่าเชื้อบน hairy root เลือกใช้ตัวยานี้ โดยตัด hairy root มาเลี้ยงในอาหารแข็งซึ่งใส่ carbenicillin ตั้งแต่ 0.5 - 1.0 กรัม/ลิตร (Kamada และคณะ, 1986 ; Guerche และคณะ, 1987 และ Mugnier, 1988) เมื่อทดลองตามวิธีดังกล่าวนี้ โดยใช้อาหารแข็งสูตร C (modified B5) ใส่ carbenicillin ตั้งแต่ 0.5 -1.0 กรัม/ลิตร และ subculture ใหม่ทุก 3 วัน เป็นเวลา 2 สัปดาห์พบว่าไม่ได้ผล จึงเปลี่ยนวิธีมาเป็นการล้างในอาหารเหลวสูตร C ใส่ carbenicillin 1 กรัม/ลิตร โดยแช่ทิ้งไว้ 15 นาที แล้วจึงนำ hairy root ที่ล้างสะอาดแล้วลงเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร C ใส่ carbenicillin 0.5 กรัม/ลิตร ต่อไปอีก 2 สัปดาห์ จึงย้าย hairy root ลงในอาหารที่

ไม่ใส่ carbenicillinต่อไป พบว่าส่วนใหญ่สามารถอยู่รอดได้โดยปราศจากเชื้อจนถึงสัปดาห์ที่ 4 และเริ่มปรากฏการเจริญของเชื้ออีกใน hairy root บางส่วน ในสัปดาห์ที่ 7-10 และในส่วนที่เหลือ hairy root สามารถเจริญต่อไปได้ในสภาพปลอดเชื้อในที่สุด

2. การชักนำให้เกิด hairy root

การทดลองนี้เลือกใช้ explant 2 ชนิดคือ ลำต้น และชิ้นใบ ซึ่งปรากฏผลดังนี้

2.1 ผลการชักนำให้เกิด hairy rootบนรอยตัดลำต้น(decapitate stem)

ผลการชักนำให้เกิด hairy root บนรอยตัดของลำต้น ของต้นกล้าลำโพงกาสลักอายุ 4 สัปดาห์ ที่ได้จากการเพาะในสภาพปลอดเชื้อโดย A. rhizogenes สี่สายพันธุ์ คือ A4 8196 R1000 และ 15834 พบ hairy rootเกิดบนรอยตัดของลำต้นหลังการรับเชื้อแล้ว 4 สัปดาห์ มีเปอร์เซนต์การเกิด hairy root ดังในตารางที่ 1

ผลการเปรียบเทียบเปอร์เซนต์เฉลี่ยของการเกิด hairy root จาก A. rhizogenes สี่สายพันธุ์ โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยทางสถิติดังตารางที่ 1 พบว่า เปอร์เซนต์การเกิด hairy root จาก A. rhizogenes สายพันธุ์ A4 และ 8196 จัดอยู่ในอันดับเดียวกัน โดยมีเปอร์เซนต์การเกิด 27.2 และ 24.0 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าสายพันธุ์ R1000 ที่มีเปอร์เซนต์การเกิด hairy root 10.5 เปอร์เซนต์ และมากยิ่งกว่าสายพันธุ์ 15834 ซึ่งมีเปอร์เซนต์การเกิด hairy root เพียง 2.6 เปอร์เซนต์จากผลการทดลองนี้จึงเห็นได้ว่า การชักนำให้เกิด hairy root บนรอยตัดของลำต้น โดย A. rhizogenes สายพันธุ์ A4 และ 1896 ได้ผลดีกว่าสายพันธุ์ R1000 และ 15834

2.2 ผลการชักนำให้เกิด hairy root บนชิ้นใบ (leaf disc)

ผลการชักนำให้เกิด hairy root บนชิ้นใบของต้นกล้าลำโพงกาสลักจากการชักนำโดย A. rhizogenes สี่สายพันธุ์ คือ A4 8196 R1000 และ 15834 พบ hairy rootเกิดขึ้นบริเวณรอยตัดหลังการได้รับเชื้อ 3 สัปดาห์ มีเปอร์เซนต์การเกิด hairy root ดังในตารางที่ 2

ผลการเปรียบเทียบเปอร์เซนต์เฉลี่ยของการเกิด hairy root จาก A. rhizogenes สี่สายพันธุ์ โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยทางสถิติดังตารางที่ 2 พบว่า เปอร์เซนต์การเกิด hairy root จาก A. rhizogenes สายพันธุ์ A4 และ R1000 จัดอยู่ในอันดับเดียวกัน โดยมีเปอร์เซนต์การเกิด 95.7 และ 98.5 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ มากกว่า

ตารางที่ 1 ผลการชักนำให้เกิด hairy root บนรอยตัดของลำต้น โดย A. rhizogenes 4 สายพันธุ์ วัดผลในสัปดาห์ที่ 4 และเปรียบเทียบผลโดยวิธี DMRT

สายพันธุ์	ซ้ำที่ 1			ซ้ำที่ 2			ซ้ำที่ 3			% HR เฉลี่ย	DMRT
	n	HR	% HR	n	HR	% HR	n	HR	% HR		
A4	128	33	25.8	136	36	26.5	140	41	29.3	27.2	a
8196	124	32	25.8	144	37	25.7	156	32	20.5	24.0	a
R1000	120	8	6.7	152	17	11.2	148	20	13.5	10.5	b
15834	152	4	2.6	140	5	3.6	136	2	1.5	2.6	c

n = จำนวน explant

HR = จำนวน explant ที่เกิด hairy root

ตารางที่ 2 ผลการชักนำให้เกิด hairy root บนชิ้นใบ โดย A. rhizogenes 4 สายพันธุ์ วัดผลในสัปดาห์ที่ 4 และเปรียบเทียบผลโดยวิธี DMRT

สายพันธุ์	ซ้ำที่ 1			ซ้ำที่ 2			ซ้ำที่ 3			% HR เฉลี่ย	DMRT
	n	HR	% HR	n	HR	% HR	n	HR	% HR		
A4	74	67	90.5	81	80	98.8	96	94	97.9	95.7	a
8196	80	58	72.6	92	72	78.3	95	74	77.9	76.2	b
R1000	82	80	97.6	94	92	97.9	92	92	100.0	98.5	a
15834	75	22	29.3	84	28	33.3	89	34	38.2	33.6	c

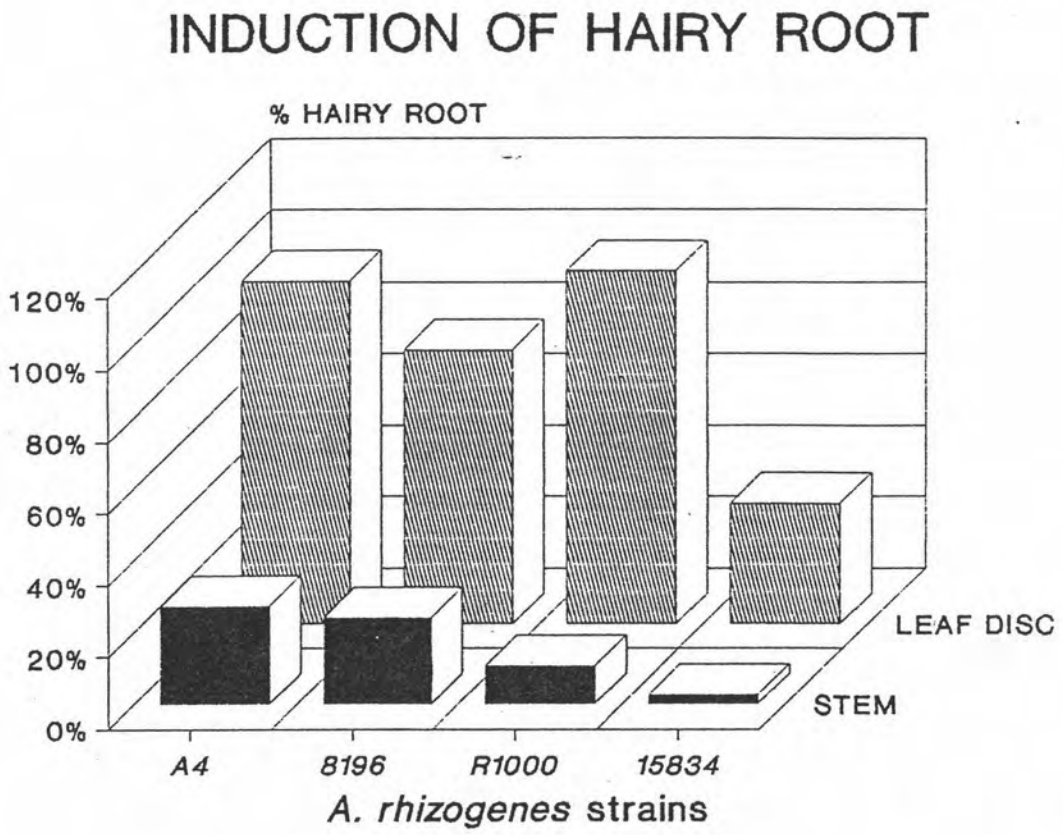
ตารางที่ 3 เปรียบเทียบเปอร์เซนต์การเกิด hairy root บนรอยตัดของลำต้นและชิ้นใบ โดยวิธี T-test ผลที่ได้เฉลี่ยมาจากการทดลอง 3 ซ้ำ

ลำต้น ซ้ำละ 120-156 ตัวอย่าง

ชิ้นใบ ซ้ำละ 74-96 ตัวอย่าง

explant	A4	8196	R1000	15834
ลำต้น	27.2	24.0	10.5	2.6
ชิ้นใบ	95.2	76.2	98.5	33.6
Diff	-68.5**	-52.2**	-88.0**	-31.0**

** แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %



แผนภาพที่ 3 ผลการชักนำให้เกิด hairy root

จากสายพันธุ์ 8196 ซึ่งมีเปอร์เซนต์การเกิด hairy root 76.2 เปอร์เซนต์ และ มากกว่าจากสายพันธุ์ 15834 ซึ่งมีเปอร์เซนต์การเกิด hairy rootเพียง 33.6 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ จากผลการทดลองนี้จึงเห็นได้ว่า การชักนำให้เกิด hairy root บนชิ้นใบโดย A. rhizogenes สายพันธุ์ R1000 A4 และ 8196 ได้ผลดีกว่าสายพันธุ์ 15834

เมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซนต์การเกิด hairy root บนรอยตัดของลำต้นและชิ้นใบที่เกิดจาก A. rhizogenes ทั้งสี่สายพันธุ์ดังกล่าว โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยทางสถิติ ดังตารางที่ 3 พบว่าเปอร์เซนต์การเกิด hairy root บนชิ้นใบมีมากกว่าบนรอยตัดของลำต้นอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทุกคู่สายพันธุ์ ดังนั้นการชักนำให้เกิด hairy root บนชิ้นใบจึงให้ผลดีกว่าการชักนำให้เกิด hairy root บนรอยตัดของลำต้น

3. การเจริญของ hairy root

3.1 ผลการเจริญของ hairy root บน explant

การศึกษาการเจริญของ hairy root บน explant มีวัตถุประสงค์เพื่อต้องการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของ hairy root ที่เพิ่งเริ่มเกิด เพื่อให้ได้ hairy root ที่มีลักษณะแข็งแรง เหมาะสำหรับการแยกมาเลี้ยงในอาหารในขั้นตอนต่อไป

เพื่อความชัดเจน และความเข้าใจได้ง่ายขึ้น จึงใช้สัญลักษณ์ ดังนี้ :

hairy root A4 หมายถึง hairy root ที่เกิดจาก A. rhizogenes สายพันธุ์ A4

hairy root 8196 หมายถึง hairy root ที่เกิดจาก A. rhizogenes สายพันธุ์ 8196

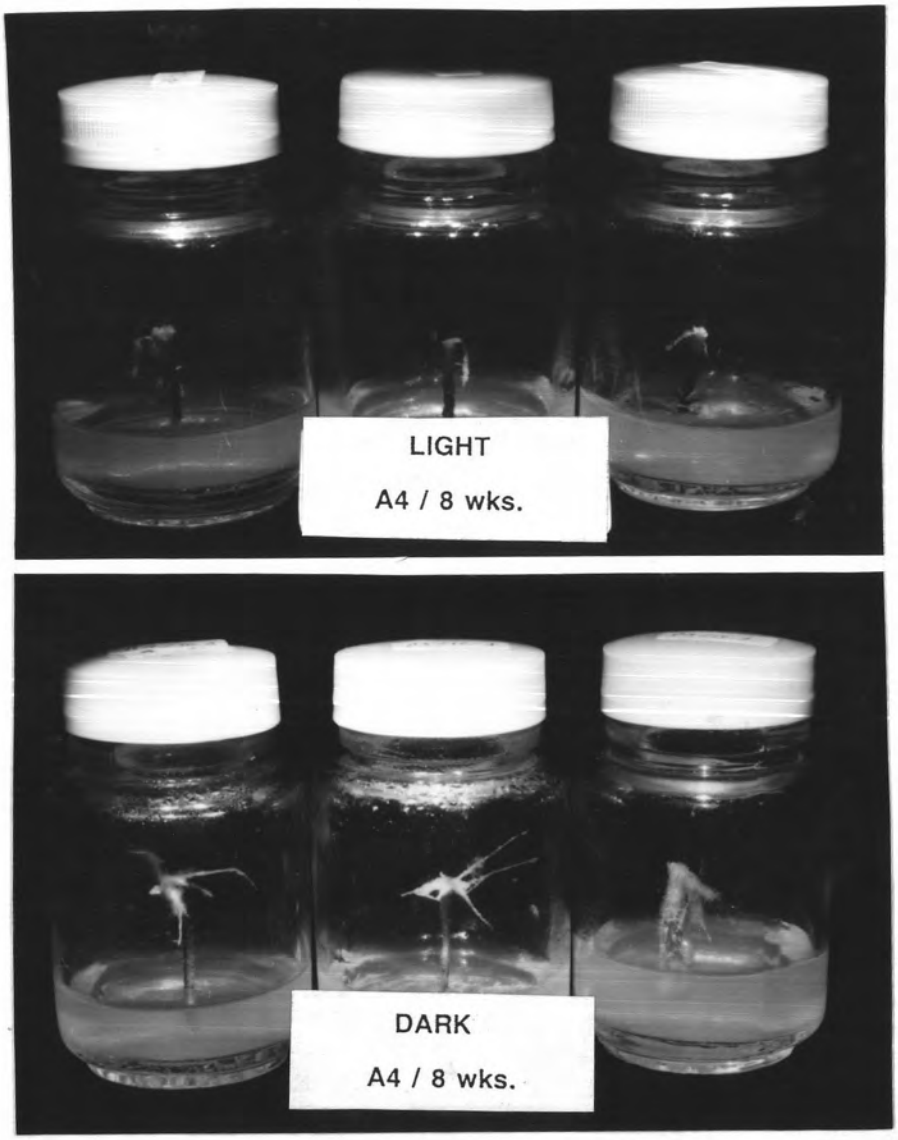
hairy root R1000 หมายถึง hairy root ที่เกิดจาก A. rhizogenes สายพันธุ์ R1000

hairy root 15834 หมายถึง hairy root ที่เกิดจาก A. rhizogenes สายพันธุ์ 15834

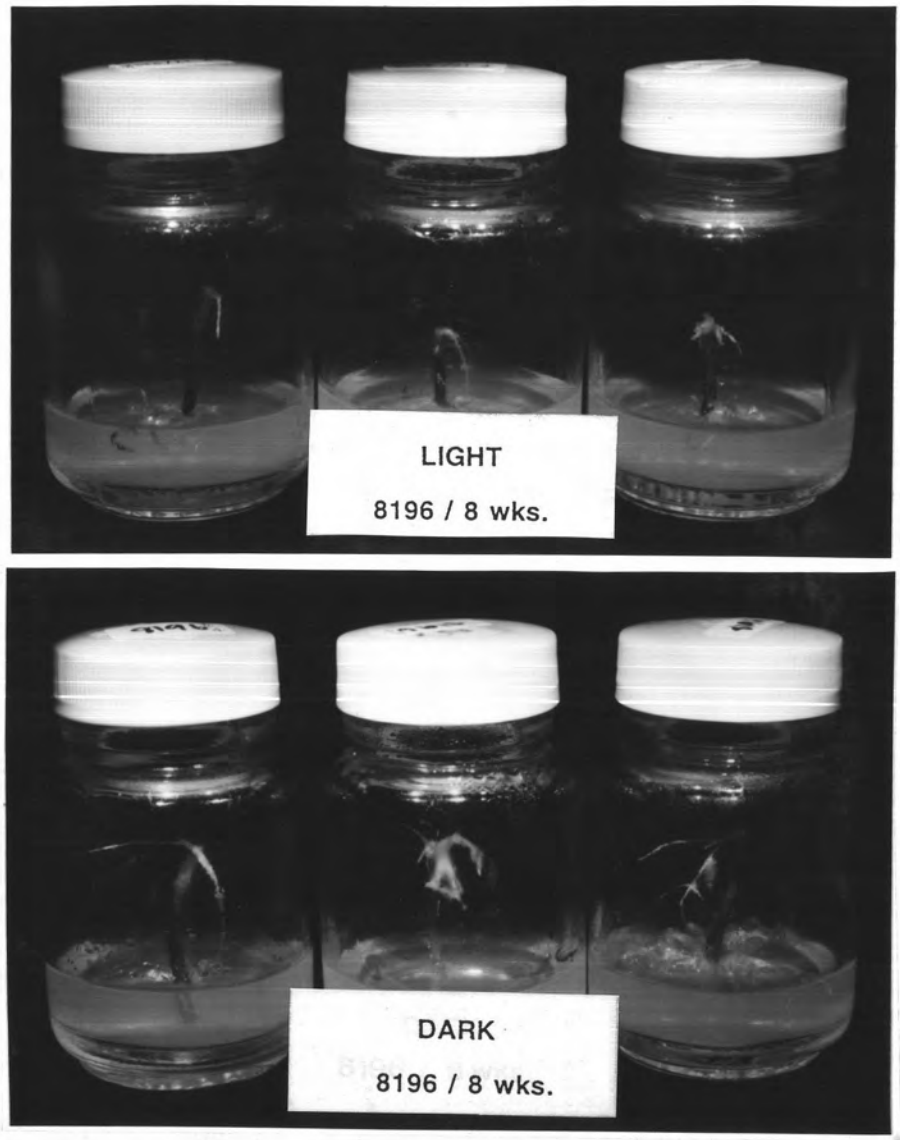
3.1.1 ผลการเจริญของ hairy root บนรอยตัดของลำต้น

การศึกษาการเจริญของ hairy root บนรอยตัดของลำต้นทำการศึกษาใน hairy root A4 hairy root 8196 และ hairy root R1000 เท่านั้น เนื่องจาก hairy root 15834 มีจำนวนน้อยไม่เพียงพอต่อการศึกษาในขั้นนี้ โดยทำการศึกษาการเจริญในที่สว่าง และที่มืด แล้วเปรียบเทียบวัดผลโดยการให้คะแนนในสัปดาห์ที่ 8 (ภาพที่ 6 และ 7) นับจากเริ่มเกิดhairy root ดังในตารางที่ 4 5 และ 6 ซึ่งได้ผลดังนี้

ผลการเปรียบเทียบการเจริญของ hairy root ทั้งสามเบอร์บนรอยตัดของลำต้นโดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยทางสถิติ ดังตารางที่ 7 พบว่า hairy root



ภาพที่ 6 Hairy root บนรอยตัดของลำต้นที่เกิดจาก A. rhizogenes สายพันธุ์ A4 เมื่อเลี้ยงในที่สว่าง และมืด อายุ 8 สัปดาห์



ภาพที่ 7 Hairy root บนรอยตัดของลำต้นที่เกิดจาก A. rhizogenes สายพันธุ์ 8196 เมื่อเลี้ยงในที่สว่าง และมืด อายุ 8 สัปดาห์

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 ผลการเจริญของ hairy root A4 บนรอยตัดของลำต้น เมื่ออายุ 8 สัปดาห์

สภาวะ	การทดลองซ้ำที่	n	* ระดับคะแนนของการเจริญ					คะแนนเฉลี่ยแต่ละซ้ำ	คะแนนเฉลี่ยรวม3ซ้ำ
			0	1	2	3	4		
สว่าง	1	17	4	8	5	0	0	1.1	1.2
	2	18	3	10	3	2	0	1.2	
	3	20	5	7	7	1	0	1.2	
มืด	1	16	0	4	5	4	3	2.4	2.5
	2	18	0	4	4	4	6	2.7	
	3	21	0	6	5	3	7	2.5	

ตารางที่ 5 ผลการเจริญของ hairy root 8196 บนรอยตัดของลำต้น เมื่ออายุ 8 สัปดาห์

สภาวะ	การทดลองซ้ำที่	n	* ระดับคะแนนของการเจริญ					คะแนนเฉลี่ยแต่ละซ้ำ	คะแนนเฉลี่ยรวม3ซ้ำ
			0	1	2	3	4		
สว่าง	1	16	4	6	4	2	0	1.3	1.1
	2	18	5	8	4	1	0	1.1	
	3	16	5	7	3	1	0	1.0	
มืด	1	16	0	4	8	3	1	2.1	2.2
	2	19	0	5	7	4	3	2.3	
	3	16	0	5	5	3	3	2.3	

n = จำนวน explant

* ระดับคะแนนมีตั้งแต่ 0 (ตาย) ถึง 16 (เจริญดีที่สุด)

ตารางที่ 6 ผลการเจริญของ hairy root R1000 บนรอยตัดของลำต้น เมื่ออายุ 8 สัปดาห์

สภาวะ	การทดลองซ้ำที่	n	* ระดับคะแนนของการเจริญ					คะแนนเฉลี่ยแต่ละซ้ำ	คะแนนเฉลี่ยรวม3ซ้ำ
			0	1	2	3	4		
สว่าง	1	4	4	0	0	0	0	0	0.2
	2	8	6	2	0	0	0	0.3	
	3	10	6	4	0	0	0	0.4	
มืด	1	4	4	0	0	0	0	0	0.3
	2	9	5	4	0	0	0	0.4	
	3	10	5	5	0	0	0	0.5	

n = จำนวน explant

* ระดับคะแนนมีตั้งแต่ 0 (ตาย) ถึง 16 (เจริญดีที่สุด)

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบผลการเจริญของ hairy root บนรอยตัดของลำต้นในสภาวะสว่าง และมืด โดยวิธีทางสถิติ DMRT และ T-test

hairy root แสง	A4	8196	R1000
สว่าง	1.2^{a}	1.1^{a}	0.2^{b}
มืด	2.5^{a}	2.2^{a}	0.3^{b}
Diff	-1.3^{**}	-1.1^{**}	-0.1^{ns}

หมายเหตุ 1. เปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์ A4 8196 และ R1000 ใช้วิธี DMRT แสดงการเปรียบเทียบโดยใช้สัญญลักษณ์ a และ b โดย a มีค่ามากกว่า b

2. เปรียบเทียบระหว่างที่สว่างและที่มืด ใช้วิธี T-test

** แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %

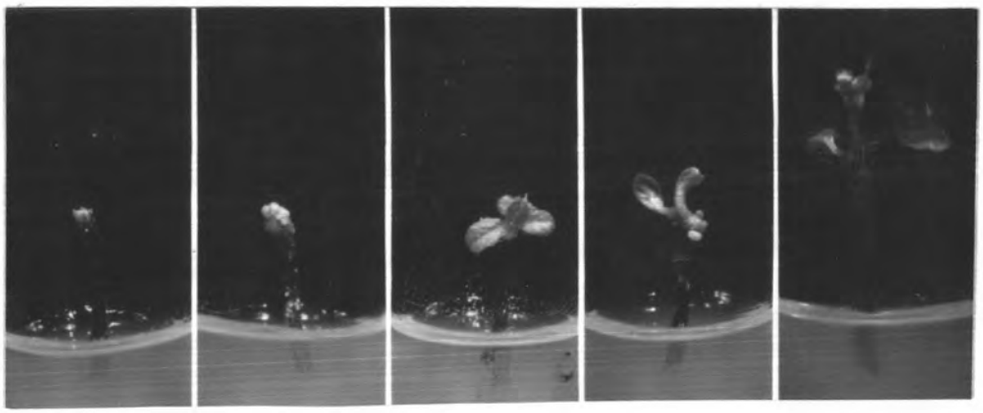
ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

3. ผลที่ได้เฉลี่ยมาจากการทดลอง 3 ซ้ำ

A4 ซ้ำละ 16-21 ตัวอย่าง

8196 ซ้ำละ 16-19 ตัวอย่าง

R1000 ซ้ำละ 4-10 ตัวอย่าง



ภาพที่ 8 ต้นกล้าลำโพงกาสลักตั้งแต่เริ่มใส่เชื้อ และเลี้ยงต่อมาเป็นเวลา 4 สัปดาห์ แต่ไม่เกิด hairy root

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 9 ต้นกล้าลำโพงกาสลักที่ถูกตัดยอดไปแต่ไม่ได้รับเชื้อ หลังจากเลี้ยงไป 4 สัปดาห์

ภาพที่ 10 ชิ้นใบของลำโพงกาสลักที่ไม่ได้รับเชื้อ หลังจากเลี้ยงไป 4 สัปดาห์

A4 และ hairy root 8196 มีการเจริญไม่แตกต่างกัน ทั้งที่เจริญในที่สว่าง และที่มืด แต่ต่างจาก hairy root R1000 โดยมีการเจริญดีกว่า hairy root R1000 ทั้งในที่สว่างและที่มืด ซึ่งจากการสังเกตก็พบว่า hairy root R1000 ที่เจริญบนรอยตัดของลำต้นมีการเจริญของเชื้อบริเวณรอยตัดลำต้นเป็นอย่างมาก อันอาจมีผลเสียต่อการเจริญของ hairy root ดังกล่าวและจากการเปรียบเทียบการเจริญในที่สว่าง และที่มืด โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยทางสถิติในตารางเดียวกัน พบว่าใน hairy root A4 และ hairy root 8196 มีการเจริญในที่มืด ดีกว่าในที่สว่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ส่วนใน hairy root R1000 พบว่าไม่มีความแตกต่าง ระหว่างการเจริญในที่สว่าง และที่มืด จากการทดลองนี้ จึงเห็นได้ว่าหากไม่มีปัจจัยอื่นใดมารบกวนการเจริญของ hairy root บนรอยตัดลำต้นแล้ว hairy root บนรอยตัดของลำต้นจะเจริญในที่มืดได้ดีกว่าในที่สว่าง

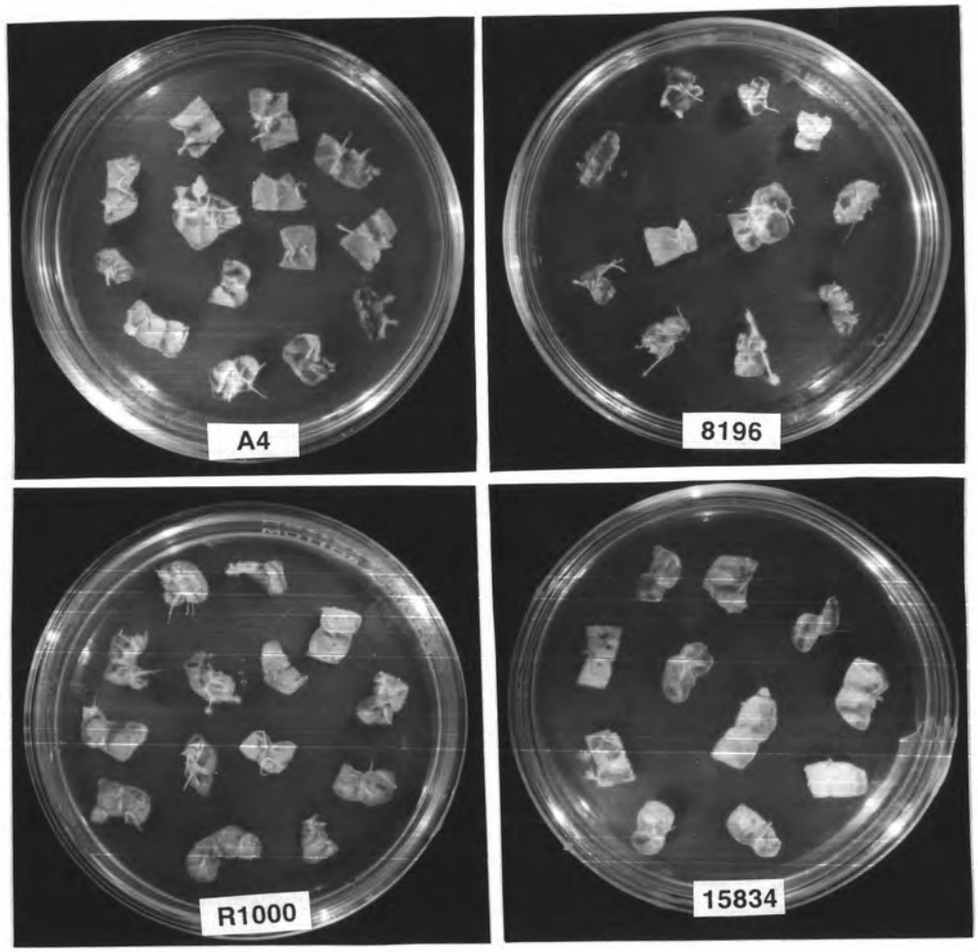
3.1.2 ผลการเจริญของ hairy root บนชิ้นใบ

การศึกษาการเจริญของ hairy root บนชิ้นใบ ทำการศึกษาใน hairy root A4 hairy root 8196 hairy root R1000 และ hairy root 15834 โดยการศึกษาการเจริญในที่สว่าง และที่มืด แล้วเปรียบเทียบวัดผลโดยการให้คะแนนในสัปดาห์ที่ 8(ภาพที่ 12) นับจากเริ่มเกิด hairy root ดังในตารางที่ 8 9 10 และ 11 ซึ่งได้ผลดังนี้

ผลการเปรียบเทียบการเจริญของ hairy root ทั้งสี่เบอร์บนชิ้นใบ โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยทางสถิติ ดังตารางที่ 12 พบว่าในที่สว่าง hairy root R1000 มีการเจริญดีกว่า hairy root A4 และ hairy root 8196 และดีกว่าhairy root 15834 ตามลำดับ ส่วนในที่มืด hairy root A4 hairy root 8196 และ hairy root R1000 มีการเจริญไม่แตกต่างกัน โดยมีการเจริญดีกว่า hairy root 15834 และจากการเปรียบเทียบการเจริญในที่สว่าง และ ที่มืด โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยทางสถิติในตารางเดียวกันพบว่า hairy root ที่เจริญบนชิ้นใบทั้งสี่เบอร์ มีการเจริญในที่มืด ดีกว่าในที่สว่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง จากการทดลองนี้จึงเห็นได้ว่า hairy root บนชิ้นใบในที่มืด ได้ดีกว่าในที่สว่าง เช่นเดียวกับ hairy root บนรอยตัดลำต้น

3.1.3 ผลความแตกต่างระหว่างการเจริญของ hairy root บนรอยตัดของลำต้น และบนชิ้นใบ

ผลการเปรียบเทียบการเจริญของ hairy rootบนรอยตัดของ



ภาพที่ 11 Hairy root ที่เพิ่งเริ่มเกิดบนชิ้นใบ ที่เกิดจาก A. rhizogenes สายพันธุ์ A4 8196 R1000 และ 15834 หลังการรับเชื้อ 3 สัปดาห์

ภาพที่ 12 Hairy root บนชิ้นใบเมื่อเลี้ยงในที่สว่าง และมืด อายุ 8 สัปดาห์

ตารางที่ 8 ผลการเจริญของ hairy root A4 บนชิ้นใบ เมื่ออายุ 8 สัปดาห์

สภาวะ	การทดลองซ้ำที่	n	* ระดับคะแนนของการเจริญ					คะแนนเฉลี่ยแต่ละซ้ำ	คะแนนเฉลี่ยรวม3ซ้ำ
			0	4	8	12	16		
สว่าง	1	26	5	6	14	1	0	5.7	5.9
	2	25	6	5	10	4	0	5.9	
	3	30	4	10	13	3	0	6.0	
มืด	1	26	0	4	6	10	6	10.7	10.6
	2	25	0	6	7	7	5	9.8	
	3	30	0	4	6	12	8	11.2	

ตารางที่ 9 ผลการเจริญของ hairy root 8196 บนชิ้นใบ เมื่ออายุ 8 สัปดาห์

สภาวะ	การทดลองซ้ำที่	n	* ระดับคะแนนของการเจริญ					คะแนนเฉลี่ยแต่ละซ้ำ	คะแนนเฉลี่ยรวม3ซ้ำ
			0	4	8	12	16		
สว่าง	1	18	2	8	8	0	0	5.3	6.2
	2	22	1	9	10	2	0	6.4	
	3	31	0	12	16	2	1	7.0	
มืด	1	18	0	4	6	4	4	9.8	10.3
	2	23	0	3	7	8	5	10.6	
	3	32	0	6	8	10	8	10.5	

n = จำนวน explant

* ระดับคะแนนมีตั้งแต่ 0 (ตาย) ถึง 16 (เจริญดีที่สุด)

ตารางที่ 10 ผลการเจริญของ hairy root R1000 บนชิ้นใบ เมื่ออายุ 8 สัปดาห์

สภาวะ	การทดลองซ้ำที่	n	* ระดับคะแนนของการเจริญ					คะแนนเฉลี่ยแต่ละซ้ำ	คะแนนเฉลี่ยรวม3ซ้ำ
			0	4	8	12	16		
สว่าง	1	33	4	7	14	6	2	7.4	8.0
	2	38	3	6	18	8	3	8.2	
	3	40	4	8	10	15	3	8.5	
มืด	1	34	0	4	10	12	8	10.8	11.2
	2	38	0	3	11	14	10	11.3	
	3	40	0	9	7	17	11	11.4	

ตารางที่ 11 ผลการเจริญของ hairy root 15834 บนชิ้นใบ เมื่ออายุ 8 สัปดาห์

สภาวะ	การทดลองซ้ำที่	n	* ระดับคะแนนของการเจริญ					คะแนนเฉลี่ยแต่ละซ้ำ	คะแนนเฉลี่ยรวม3ซ้ำ
			0	4	8	12	16		
สว่าง	1	6	3	2	1	0	0	2.7	2.4
	2	9	5	4	0	0	0	1.8	
	3	14	7	4	3	0	0	2.8	
มืด	1	7	0	2	4	1	0	7.4	8.4
	2	10	0	3	4	3	0	8.0	
	3	14	0	3	4	5	2	9.7	

n = จำนวน explant

* ระดับคะแนนมีตั้งแต่ 0 (ตาย) ถึง 16 (เจริญดีที่สุด)

ตารางที่ 12 เปรียบเทียบผลการเจริญของ hairy root บนชิ้นใบในสภาวะสว่างและมืด โดยวิธีทางสถิติ DMRT และ T-test

hairy root แสง	A4	8196	R1000	15834
สว่าง	5.9^{b}	6.2^{b}	8.0^{a}	2.4^{c}
มืด	10.6^{a}	10.3^{a}	11.2^{a}	8.4^{b}
Diff	-4.7^{**}	-4.1^{**}	-3.2^{**}	-6.0^{**}

หมายเหตุ 1. เปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์ A4 8196 R1000 และ 15834ใช้วิธี DMRT แสดงการเปรียบเทียบโดยใช้สัญญลักษณ์ a b และ c โดย a มีค่ามากกว่า b และ b มากกว่า c

2. เปรียบเทียบระหว่างที่สว่างและที่มืด ใช้วิธี T-test

** แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %

3. ผลที่ได้เฉลี่ยมาจากการทดลอง 3 ซ้ำ

A4 ซ้ำละ 25-30 ตัวอย่าง

8196 ซ้ำละ 18-33 ตัวอย่าง

R1000 ซ้ำละ 33-40 ตัวอย่าง

15834 ซ้ำละ 6-14 ตัวอย่าง

ตารางที่ 13 เปรียบเทียบผลการเจริญของ hairy root บนชิ้นใบ และบนรอยตัดของลำต้น ที่เจริญในที่สว่าง โดยวิธี T-test ผลที่ได้เฉลี่ยมาจากการทดลอง 3 ซ้ำ

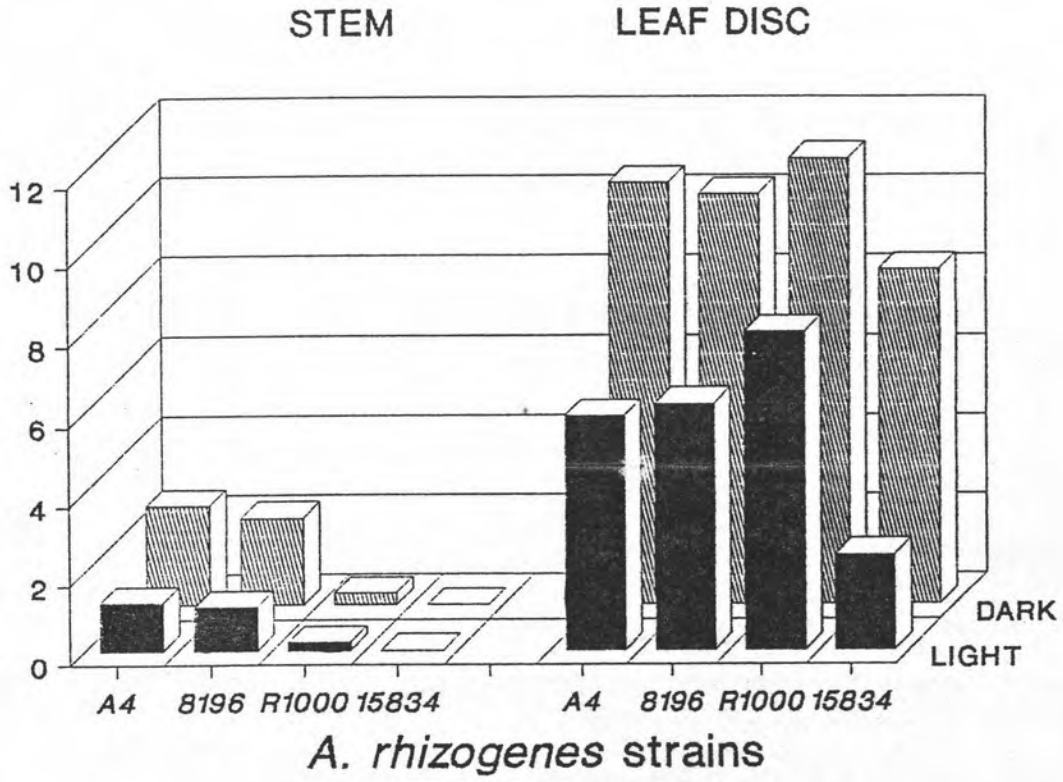
explant	A4	8196	R1000
ชิ้นใบ	5.9	6.2	8.0
ลำต้น	1.2	1.1	0.2
Diff	4.7**	5.1**	7.8**

** แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %

ตารางที่ 14 เปรียบเทียบผลการเจริญของ hairy root บนชิ้นใบ และบนรอยตัดของลำต้น ที่เจริญในที่มืด โดยวิธี T-test ผลที่ได้เฉลี่ยมาจากการทดลอง 3 ซ้ำ

explant	A4	8196	R1000
ชิ้นใบ	10.6	10.3	11.2
ลำต้น	2.5	2.2	0.3
Diff	8.1**	8.1**	10.9**

** แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %



แผนภาพที่ 4 ผลการเจริญของ hairy root บน explant

ลำต้น และชิ้นใบ โดยการวิเคราะห์เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยทางสถิติในตารางที่ 13 และ 14 พบว่า hairy root บนชิ้นใบมีการเจริญดีกว่า hairy root บนรอยตัดของลำต้นอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ใน hairy root ทั้งสี่เบอร์ และทั้งในที่สว่าง และที่มืด

3.2 ผลการเจริญของ hairy root ที่แยกมาเลี้ยง

Hairy root ที่นำมาศึกษาในขั้นนี้ คือ hairy root A4 จำนวน 3 เบอร์ ได้แก่ hairy root A4(1), A4(2) และ A4(3) และ hairy root R1000 จำนวน 3 เบอร์ ได้แก่ hairy root R1000(1), R1000(2) และ R1000(3) โดยแต่ละเบอร์มาจาก explant แต่ละต้น

3.2.1 ผลการเจริญของ hairy root ในอาหารแข็ง

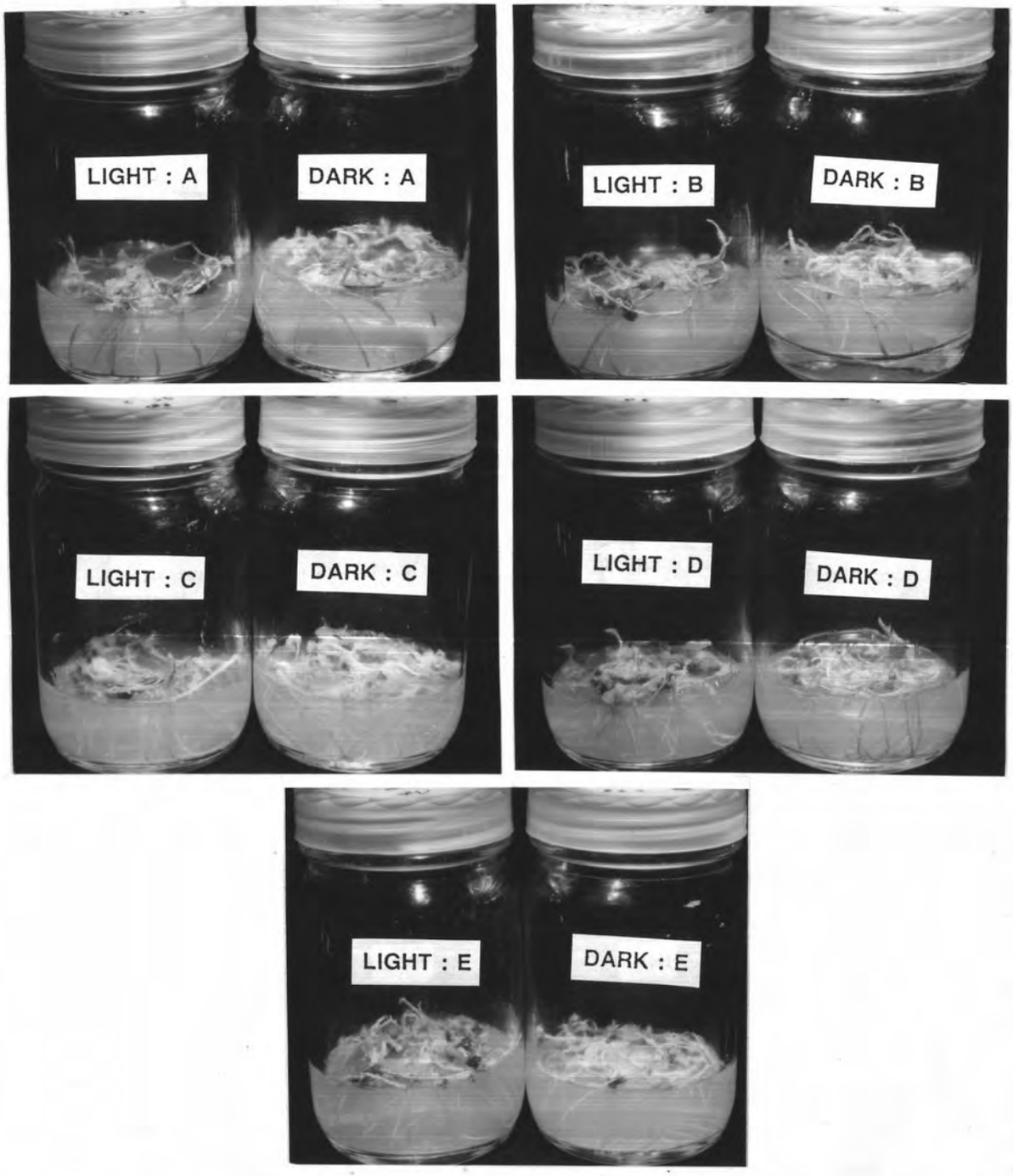
3.2.1.1 ผลการศึกษาการเจริญของ hairy rootในอาหารแข็งสูตรต่างๆ

ทำการศึกษาในอาหารสูตร A (modified MS) สูตร B (modified 1/2 MS) สูตร C (modified B5) สูตร D (modified 1/2 B5) และสูตร E (modified White) ซึ่งมีส่วนประกอบดังแสดงไว้ในบทที่ 2 โดยเลือก hairy root A4 (1) และ hairy root R1000 (1) เป็นตัวแทนการศึกษา

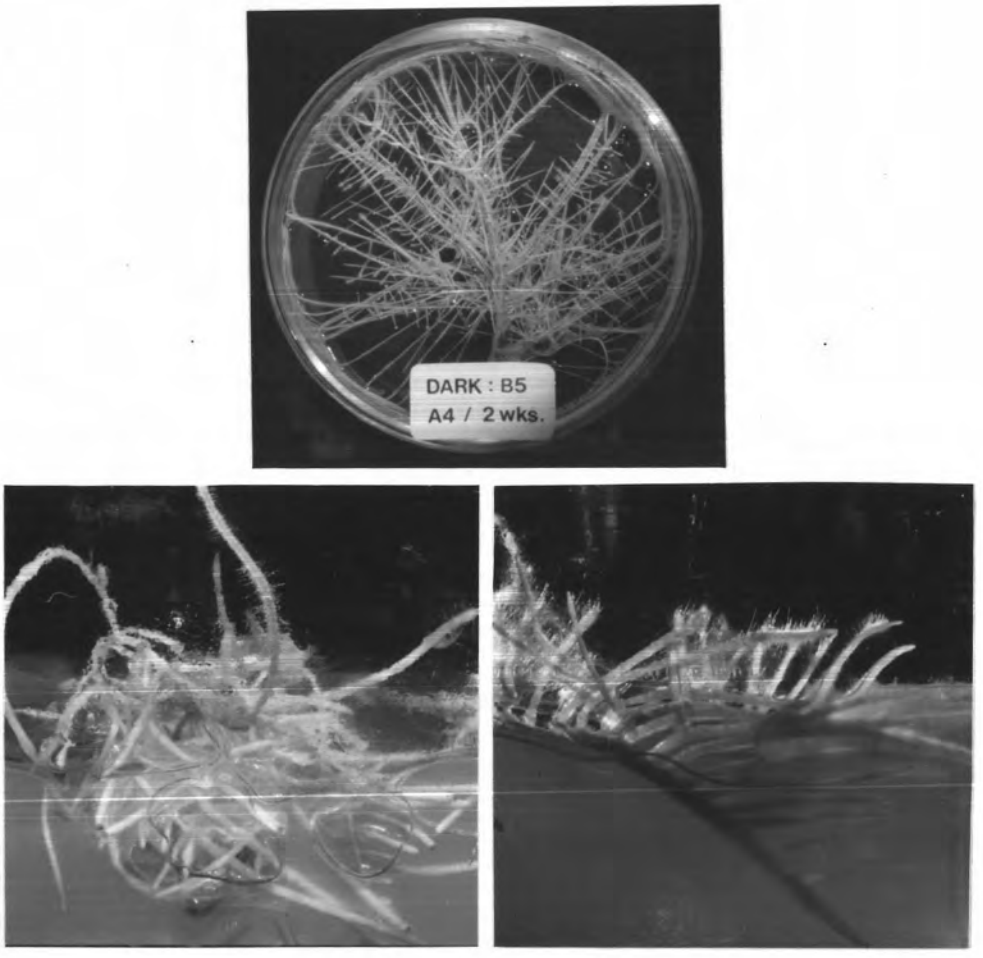
ผลการศึกษาการเจริญของ hairy root A4(1) และ hairy root R1000(1) ที่เลี้ยงในอาหารแข็งทั้ง 5 สูตร เทียบกับ in vitro root (ภาพที่ 13 และ 14) พบว่ามีการเจริญอย่างรวดเร็วกว่า in vitro root มาก มีการแตกสาขามาก และไม่มีทิศทางการเจริญที่แน่นอน (ภาพที่ 15) โดยเจริญได้ดีที่สุดในอาหารสูตร C แม้ว่ามีการ subculture ไปนานๆ ก็ไม่มีการกลายไปเป็นแคลลัสเหมือนอาหารสูตร A (ภาพที่ 16) และสีของ hairy root ที่ได้มีสีขาว ไม่เปลี่ยนไปเป็นสีน้ำตาลอ่อนภายหลังเหมือนในอาหารสูตร B ส่วนในสูตร D hairy root มีลักษณะสีขาว แต่เจริญได้ช้ากว่าสูตร C และในสูตร E เป็นอาหารสูตรที่ hairy root เจริญได้ช้ากว่าสูตร ๆ อย่างเห็นได้ชัดเจน และเมื่อเปรียบเทียบการเจริญของ in vitro rootในอาหารทั้ง 5 สูตร พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน โดยมีการเจริญน้อยมาก และแทบไม่มีการแตกสาขาใหม่

โดยทั่วไปแล้ว hairy root A4(1) และ hairy root R1000 (1) มีการมีการเจริญไม่แตกต่างกัน แต่พบว่า hairy root A4(1) เกิด differentiation เป็นแคลลัสในอาหารสูตร A ได้เร็วกว่า hairy root R1000(1)

ภาพที่ 13 Hairy root เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร A B C D และ E ในที่สว่างและมืด



ภาพที่ 14 In vitro root เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร A B C D และ E ในที่สว่าง/มืด



ภาพที่ 15 ลักษณะการเจริญของ hairy root ที่มีการแตกสาขามาก

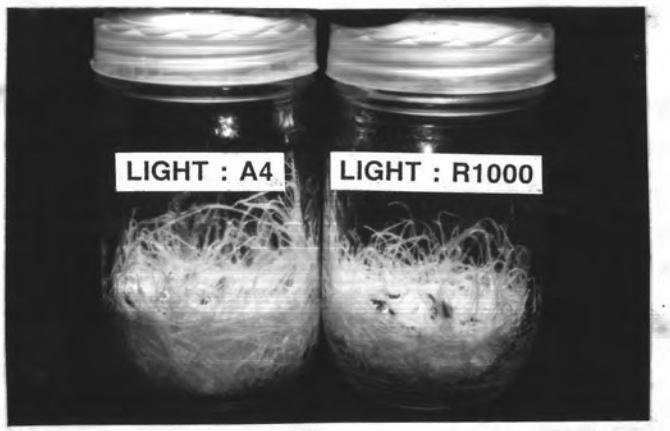
ภาพที่ 16 แคลลัสที่เกิดจาก hairy root A4 ที่เลี้ยงในอาหารสูตร A

ประมาณ 2 เท่า และเมื่อนำแคลลัสที่ได้จาก hairy root มาเลี้ยงต่อในอาหารสูตร A พบว่าแคลลัสสามารถเจริญต่อไปได้อย่างรวดเร็ว เมื่อแยกแคลลัสมาเลี้ยงในที่สว่าง และที่มืด พบว่าแคลลัสที่เจริญในที่สว่างมีสีขาวใส ส่วนแคลลัสที่เจริญในที่มืดมีสีน้ำตาลอ่อน(ภาพที่ 16)

3.2.1.2 ผลการเจริญของ hairy root A4(1) และ hairy root R1000(1) ในที่สว่าง และที่มืด ในอาหารแข็งทั้ง 5 สูตร

ประมาณได้ว่า hairy root ที่เจริญในที่มืดมีการเจริญดีกว่าในที่สว่างเฉพาะในอาหารสูตร C ส่วนในสูตร A B D และ E ไม่สามารถสังเกตเห็นความแตกต่างที่ชัดเจนได้ และเมื่อเลี้ยง hairy root ทั้งสองในอาหารสูตร C ไประยะหนึ่งในที่สว่าง พบว่ามี plant regeneration เกิดขึ้น (ภาพที่ 17 ก.)โดยเฉพาะ hairy root R1000(1) พบว่าสามารถเกิด regeneration ได้ง่ายกว่า hairy root A4 ส่วนในที่มืดก็มีโอกาสเกิด regeneration ได้เช่นกัน แต่น้อยกว่าในที่สว่าง และยอดที่ได้ มีสีเหลือง (ภาพที่ 17 ข.) แต่เมื่อย้ายยอดดังกล่าวมาเลี้ยงในที่มีแสงก็สามารถเจริญให้สีเขียวได้เช่นกัน เมื่อนำยอดที่ได้มาเลี้ยงในอาหารสูตร C พบว่า ส่วนใหญ่สามารถเจริญไปได้เพียง 1-2 สัปดาห์ มีเพียง 3 ต้นที่สามารถเจริญต่อไปได้จนอายุ 4 สัปดาห์ ซึ่งต้น regenerated plant มีลำต้นเตี้ย ข้อปล้องสั้น ใบเป็นคลื่น ขอบใบม้วน และรากที่เกิดไม่มีทิศทางการเจริญที่แน่นอน (ภาพที่ 19)

ผลการทดลองดังกล่าวในข้อ 3.2.1.1 และ 3.2.1.2 ซึ่งสรุปได้ว่าอาหารสูตร C เป็นสูตรที่เหมาะในการเลี้ยง hairy root และการเลี้ยงในที่มืดให้ผลดีกว่าในที่สว่าง การทดลองนี้จึงเลือกใช้อาหารสูตร C และสภาวะมืด เพื่อทำการขยายปริมาณ hairy root ในอาหารแข็งก่อนการเลี้ยงในอาหารเหลวซึ่งจะทำการศึกษาในขั้นต่อไป hairy root ที่นำมาขยายปริมาณ ได้แก่ hairy root ทั้ง 6 เบอร์ คือ hairy root A4 (1) hairy root A4(2) และ hairy root A4(3) (ภาพที่ 20) hairy root R1000 (1) hairy root R1000 (2) และ hairy root R1000 (3) (ภาพที่ 21) และนำ hairy root ที่เลี้ยงครบ 3 สัปดาห์ไปศึกษา และขยายปริมาณในอาหารเหลวต่อไป เพื่อเก็บตัวอย่างวิเคราะห์แอลคาลอยด์ และเนื่องจากอาหารสูตร A ทำให้ hairy root เกิดแคลลัส จึงนำ hairy root A4 (1) ซึ่งกลายเป็นแคลลัส มาขยายปริมาณแคลลัสต่อในอาหารแข็งสูตร A ในสภาวะสว่าง และมืด และเก็บตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์เมื่อเลี้ยงครบ 1 และ 2 สัปดาห์



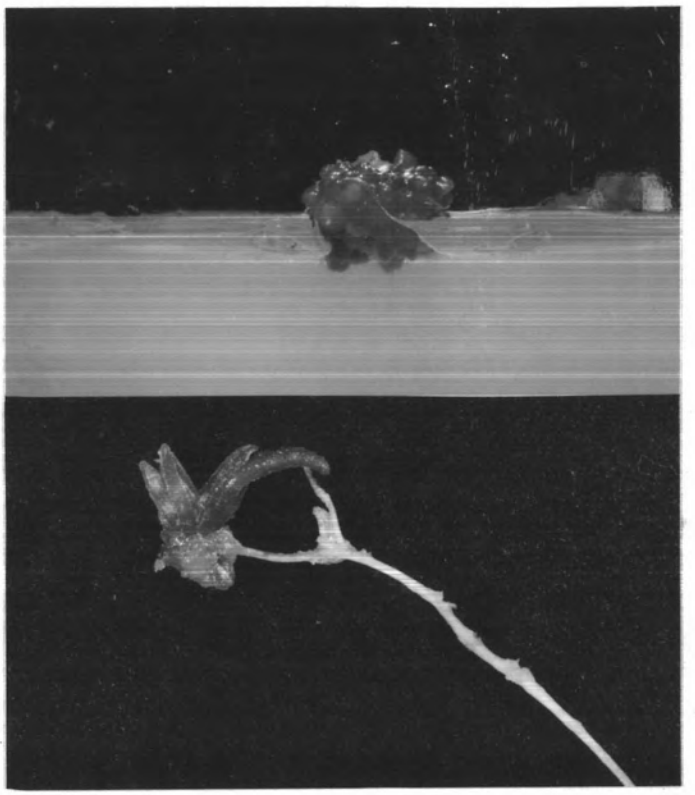
ก

ข

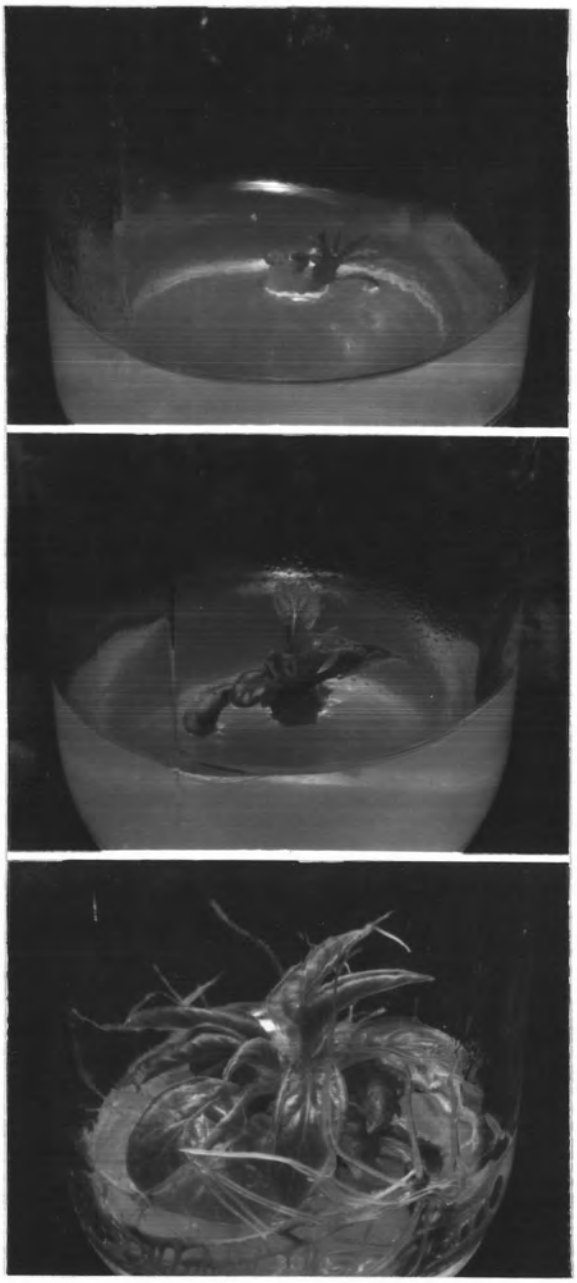
ภาพที่ 17 Hairy root ที่เกิด regeneration

ก. hairy root A4 และ R1000 ในอาหารสูตร C สภาวะสว่าง

ข. hairy root A4 และ R1000 ในอาหารสูตร C สภาวะมืด



ภาพที่ 18 ลักษณะการเกิด regenerated plant



ภาพที่ 19 Regenerated plant จาก hairy root

ภาพที่ 20 Hairy root A4(1) A4(2) และ A4(3) ที่เจริญในอาหารสูตร C

ภาพที่ 21 Hairy root R1000(1) R1000(2) และ R1000(3) ที่เจริญในอาหารสูตร C

3.2.2 ผลการเจริญของ hairy root ในอาหารเหลว

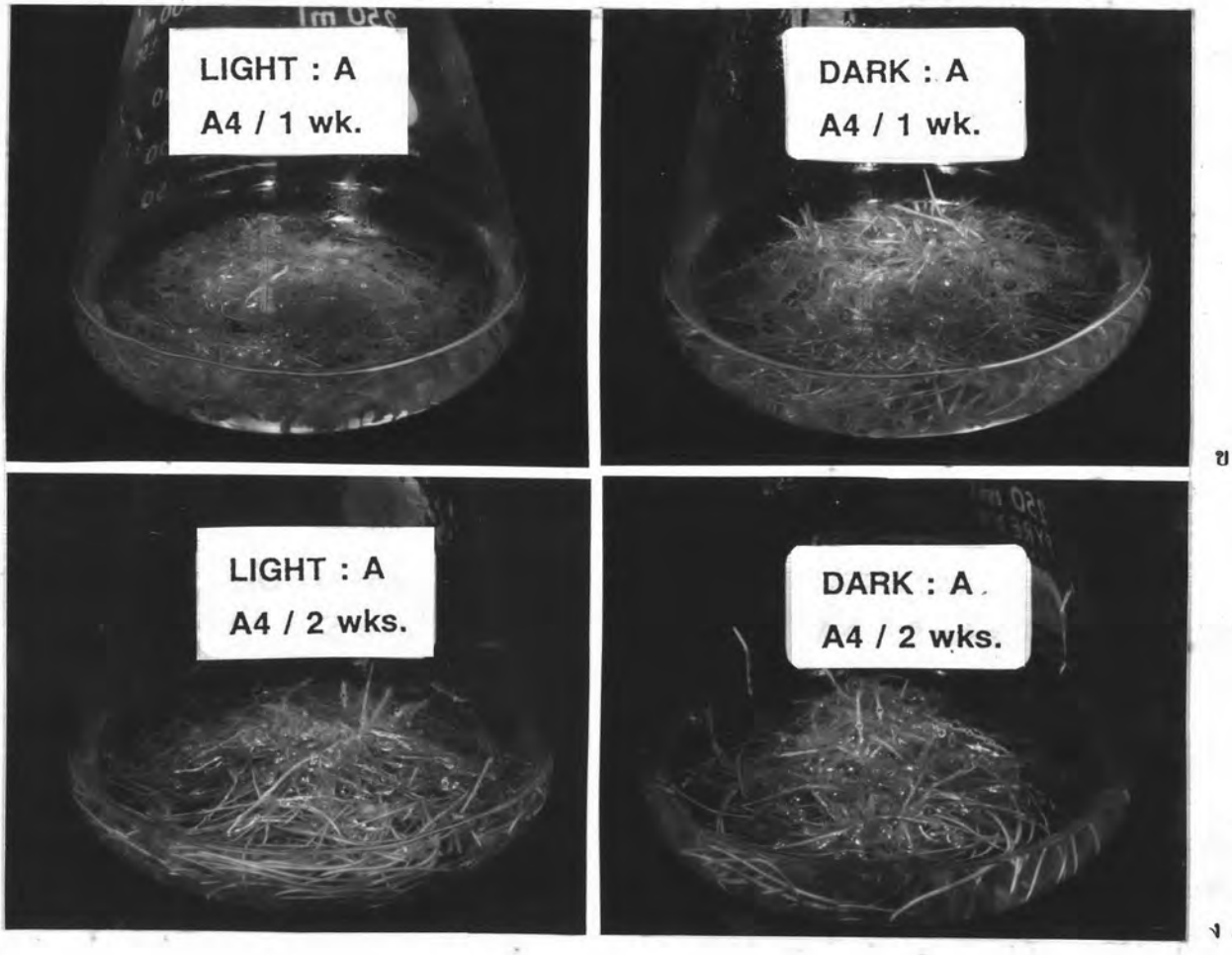
การศึกษาการเจริญของ hairy root ในอาหารเหลวทำการศึกษาในอาหารสูตร A สูตร B และสูตร C ในสภาวะสว่าง และมืด โดยเลือก hairy root A4(1) และ hairy root R1000 (1) เป็นตัวแทนการศึกษา (ภาพที่ 22 23 24 25 26 และ 27) ทำการวัดผลโดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยจาก growth index ของน้ำหนักสด ด้วยวิธีทางสถิติ ซึ่งได้ผลดังนี้

3.2.2.1 ผลการเจริญของ hairy root A4 (1) และ hairy root R1000 (1)

ผลการเจริญของ hairy root A4 (1) และ hairy root R1000 (1) โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยทางสถิติ ดังในตารางที่ 15 ซึ่งพบว่าในสัปดาห์ที่ 1 ในอาหารสูตร A hairy root A4(1) มีการเจริญดีกว่า hairy root R1000(1) อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ทั้งในที่สว่าง และที่มืด แต่ไม่พบความแตกต่างของการเจริญของ hairy root ทั้งสอง ที่เลี้ยงในอาหารสูตร B และ C ทั้งในที่สว่าง และที่มืด และในสัปดาห์ที่ 2 พบว่า hairy root A4 (1) มีการเจริญดีกว่า hairy root R1000(1) อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร A และสูตร C ทั้งในที่สว่างและที่มืด ส่วนในอาหารสูตร B นั้น พบว่า hairy root A4 (1) เจริญดีกว่า hairy root R1000 (1) อย่างมีนัยสำคัญในที่มืด และอย่างไม่มีนัยสำคัญในที่สว่าง จากการทดลองดังกล่าวจึงเห็นได้ว่า hairy A4(1) มีการเจริญดีกว่า hairy root R1000(1) โดยสามารถเห็นความแตกต่างของการเจริญได้ดีที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร C ในสภาวะมืด เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์

3.2.2.2 ผลการเจริญของ hairy root ในอาหารสูตร A สูตร B และสูตร C

ผลการเปรียบเทียบการเจริญของ hairy root ในอาหารสูตร A สูตร B และสูตร C โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยทางสถิติ ดังในตารางที่ 16 ซึ่งพบว่า ในสัปดาห์ที่ 1 ในที่สว่าง ไม่พบความแตกต่างระหว่างการเจริญของ hairy root A4 (1) ในอาหารทั้ง 3 สูตร แต่พบว่า hairy root R1000 (1) ที่เจริญในสูตร C มีการเจริญดีกว่า สูตร A และสูตร B ส่วนในที่มืดพบว่า hairy root A4 (1) ที่เจริญในอาหารสูตร A มีการเจริญดีกว่า สูตร B และสูตร C และ hairy root R1000 (1) ที่เจริญในอาหารสูตร C มีการเจริญดีกว่าสูตร A และสูตร B และในสัปดาห์ที่ 2 พบว่าใน



ภาพที่ 22 Hairy root A4 ที่เจริญในอาหารเหลวสูตร A

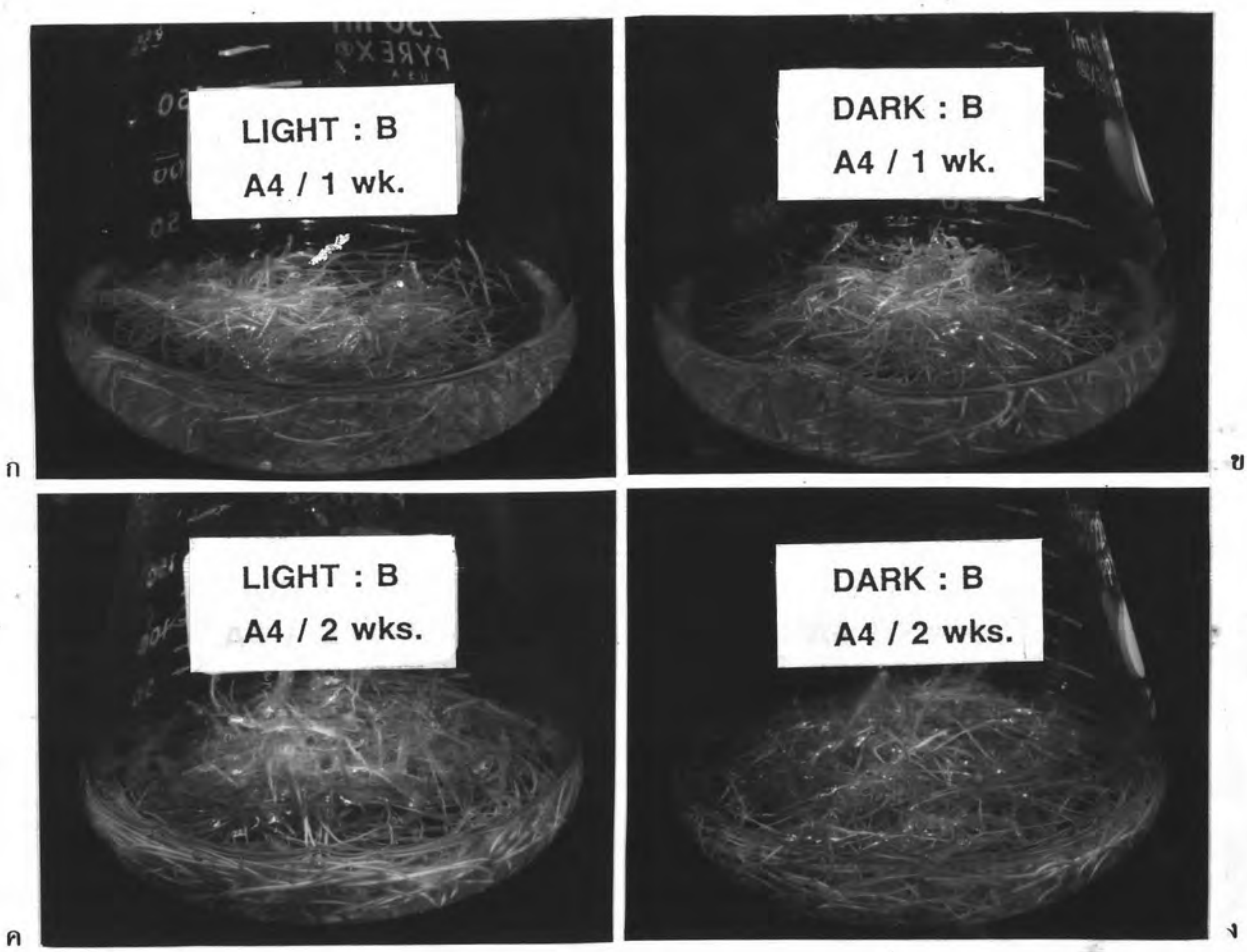
ก. สภาวะสว่าง / 1 สัปดาห์

ข. สภาวะมืด / 1 สัปดาห์

ค. สภาวะสว่าง / 2 สัปดาห์

ง. สภาวะมืด / 2 สัปดาห์

พอลุเทคกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



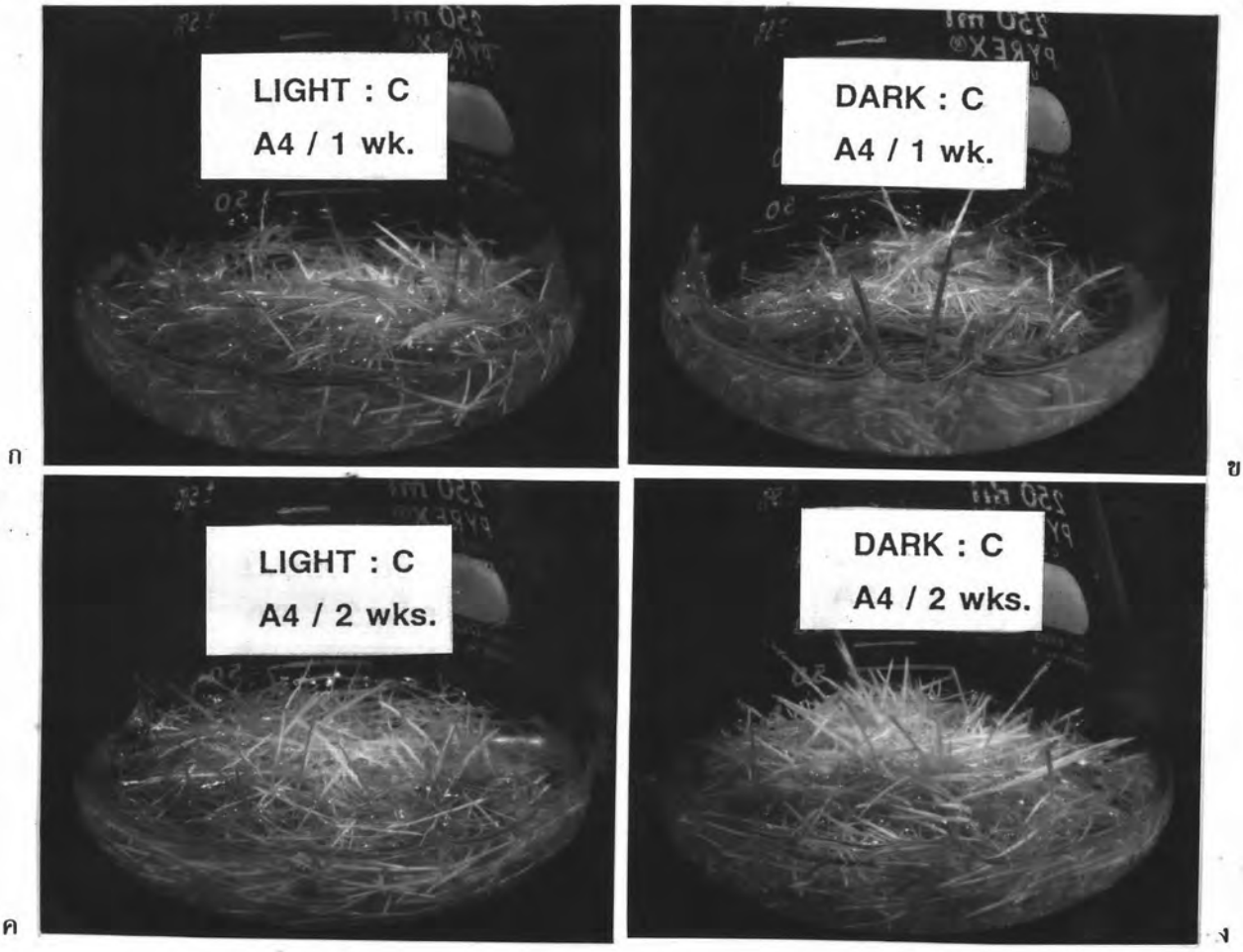
ภาพที่ 23 Hairy root A4 ที่เจริญในอาหารเหลวสูตร B

ก. สภาวะสว่าง / 1 สัปดาห์

ข. สภาวะมืด / 1 สัปดาห์

ค. สภาวะสว่าง / 2 สัปดาห์

ง. สภาวะมืด / 2 สัปดาห์



ก ข ค ง

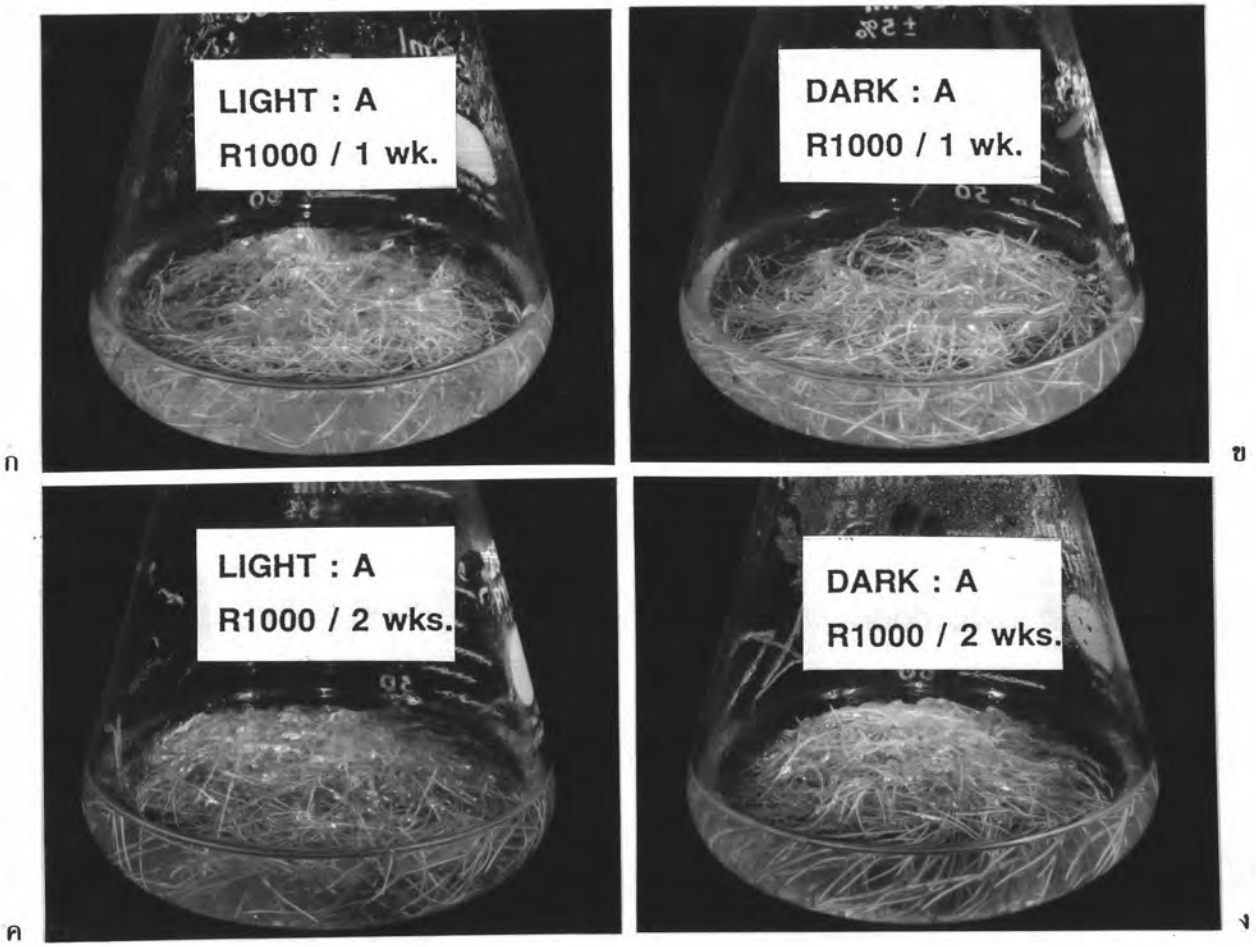
ภาพที่ 24 Hairy root A4 ที่เจริญในอาหารเหลวสูตร C

ก. สภาวะสว่าง / 1 สัปดาห์

ข. สภาวะมืด / 1 สัปดาห์

ค. สภาวะสว่าง / 2 สัปดาห์

ง. สภาวะมืด / 2 สัปดาห์



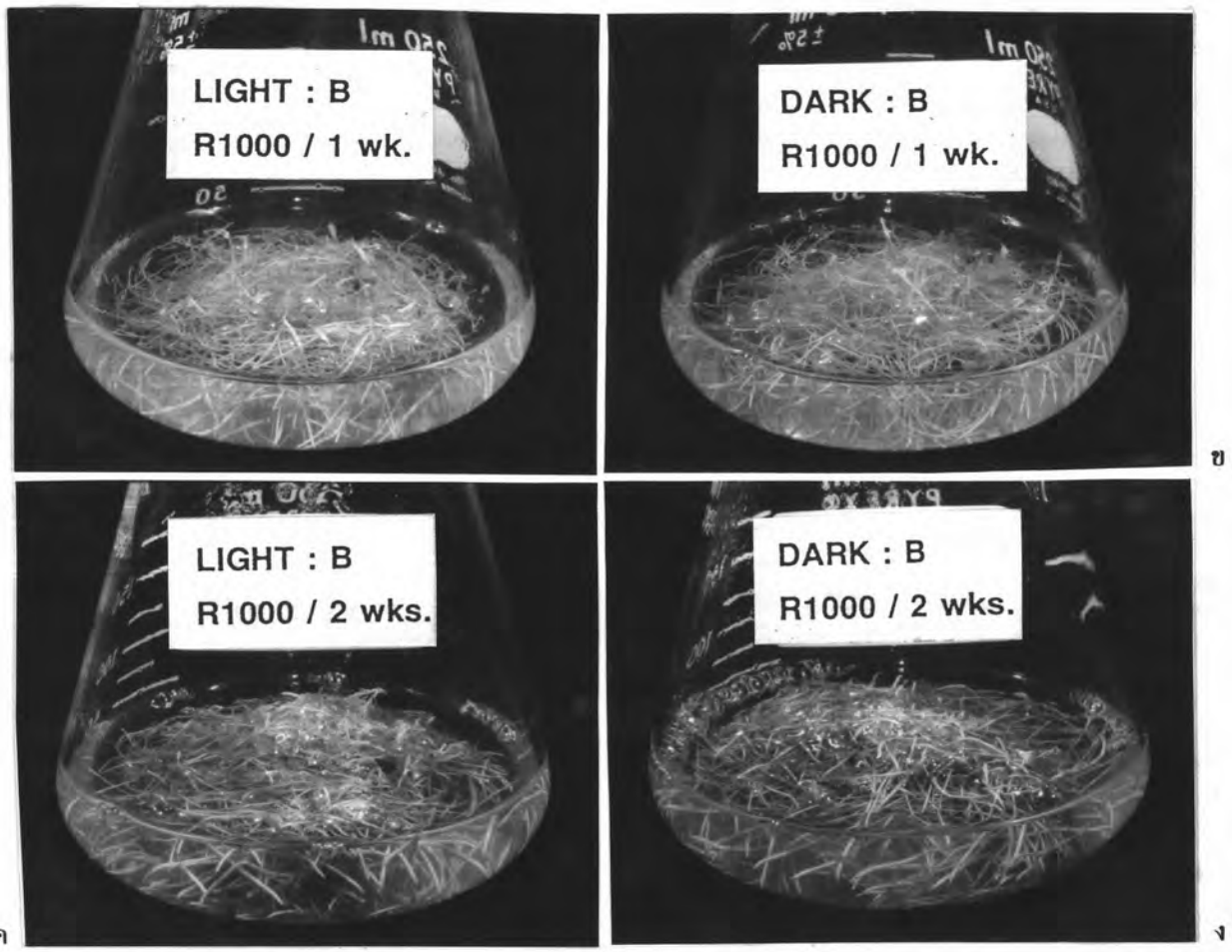
ภาพที่ 25 Hairy root R1000 ที่เจริญในอาหารเหลวสูตร A

ก. สภาวะสว่าง / 1 สัปดาห์

ข. สภาวะมืด / 1 สัปดาห์

ค. สภาวะสว่าง / 2 สัปดาห์

ง. สภาวะมืด / 2 สัปดาห์



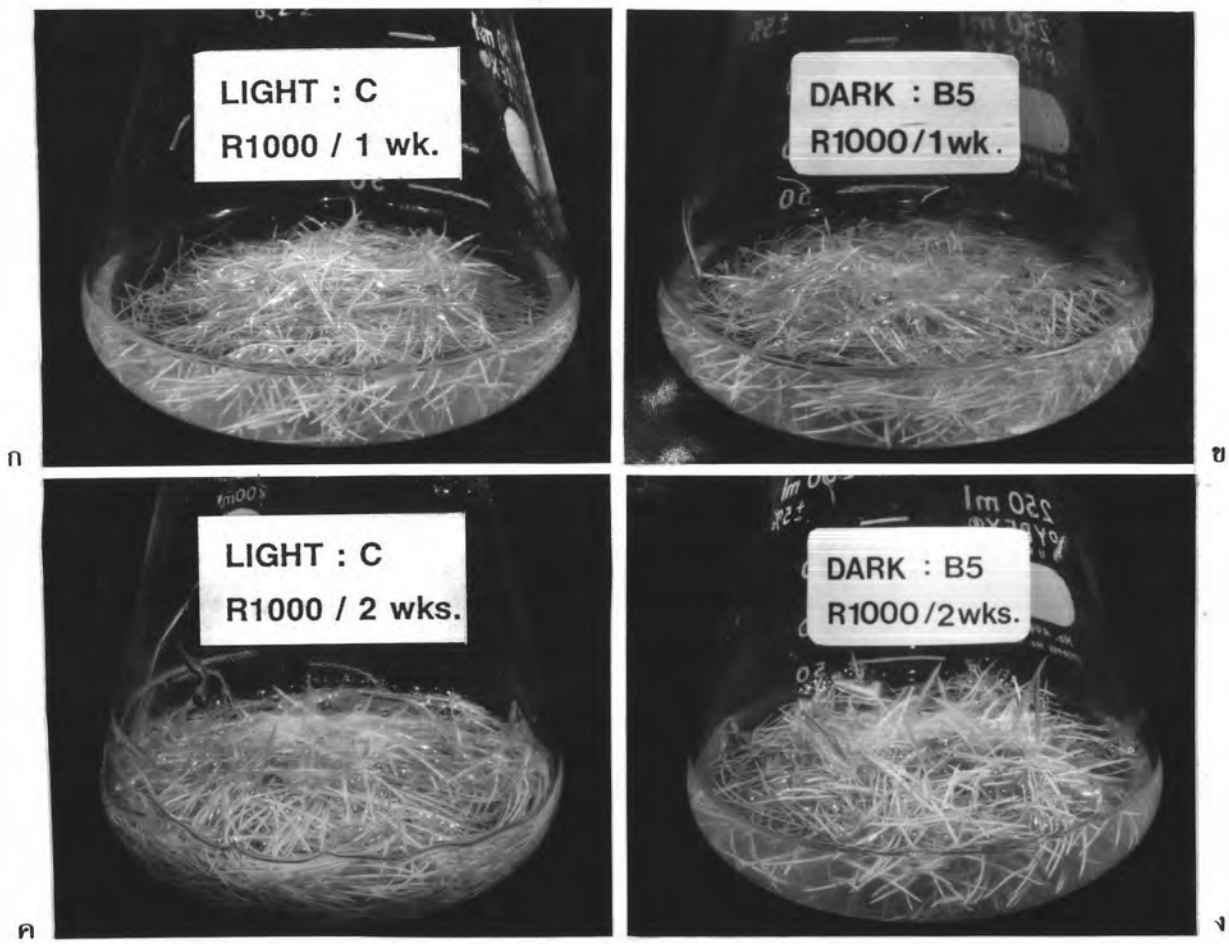
ภาพที่ 26 Hairy root R1000 ที่เจริญในอาหารเหลวสูตร B

ก. สภาวะสว่าง / 1 สัปดาห์

ข. สภาวะมืด / 1 สัปดาห์

ค. สภาวะสว่าง / 2 สัปดาห์

ง. สภาวะมืด / 2 สัปดาห์



ก ข ค ง

ภาพที่ 27 Hairy root R1000 ที่เจริญในอาหารเหลวสูตร C

ก. สภาวะสว่าง / 1 สัปดาห์

ข. สภาวะมืด / 1 สัปดาห์

ค. สภาวะสว่าง / 2 สัปดาห์

ง. สภาวะมืด / 2 สัปดาห์

ตารางที่ 15 เปรียบเทียบผลการเจริญของ hairy root A4 และ R1000 ที่เจริญในอาหาร สูตร A B และ C ในสภาวะสว่างและมืด ในสัปดาห์ที่ 1 และ 2 โดยวิธี T-test ผลที่ได้เฉลี่ยมาจากค่า growth index ของน้ำหนักสด 6 ตัวอย่าง

สายพันธุ์	สัปดาห์ที่ 1						สัปดาห์ที่ 2					
	สว่าง			มืด			สว่าง			มืด		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
A4 (1)	3.59	3.41	3.42	3.59	3.32	3.30	5.17	4.87	7.34	5.17	4.80	8.36
R1000(1)	3.05	3.26	3.70	3.01	3.14	3.51	4.05	4.66	5.86	4.08	4.29	5.99
Diff	0.54^{**}	0.15^{ns}	-0.28^{ns}	0.58^{**}	0.18^{ns}	-0.21^{ns}	1.12^{**}	0.21^{ns}	1.48^{**}	1.09^{**}	0.51^{*}	2.37^{**}

** แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ตารางที่ 16 เปรียบเทียบผลของอาหารสูตร A B และ C ที่มีต่อการเจริญของ hairy root A4 และ hairy root R1000 ในสภาวะที่สว่างและมืด ในสัปดาห์ที่ 1 และ 2 โดยวิธี DMRT ผลที่ได้เฉลี่ยมาจากค่า growth index ของน้ำหนักสด 6 ตัวอย่าง

อาหาร	สัปดาห์ที่ 1				สัปดาห์ที่ 2			
	สว่าง		มืด		สว่าง		มืด	
	A4(1)	R1000(1	A4(1)	R1000(1	A4(1)	R1000(1	A4(1)	R1000(1
A	3.59[a]	3.05[b]	3.59[a]	3.01[b]	5.17[b]	4.05[c]	5.17[b]	4.08[b]
B	3.41[a]	3.26[b]	3.32[b]	3.14[b]	4.87[b]	4.66[b]	4.80[b]	4.29[b]
C	3.42[a]	3.70[a]	3.30[b]	3.51[a]	7.34[a]	5.86[a]	8.36[a]	5.99[a]

สัญญลักษณ์ a b และ c แสดงความแตกต่างทางสถิติ

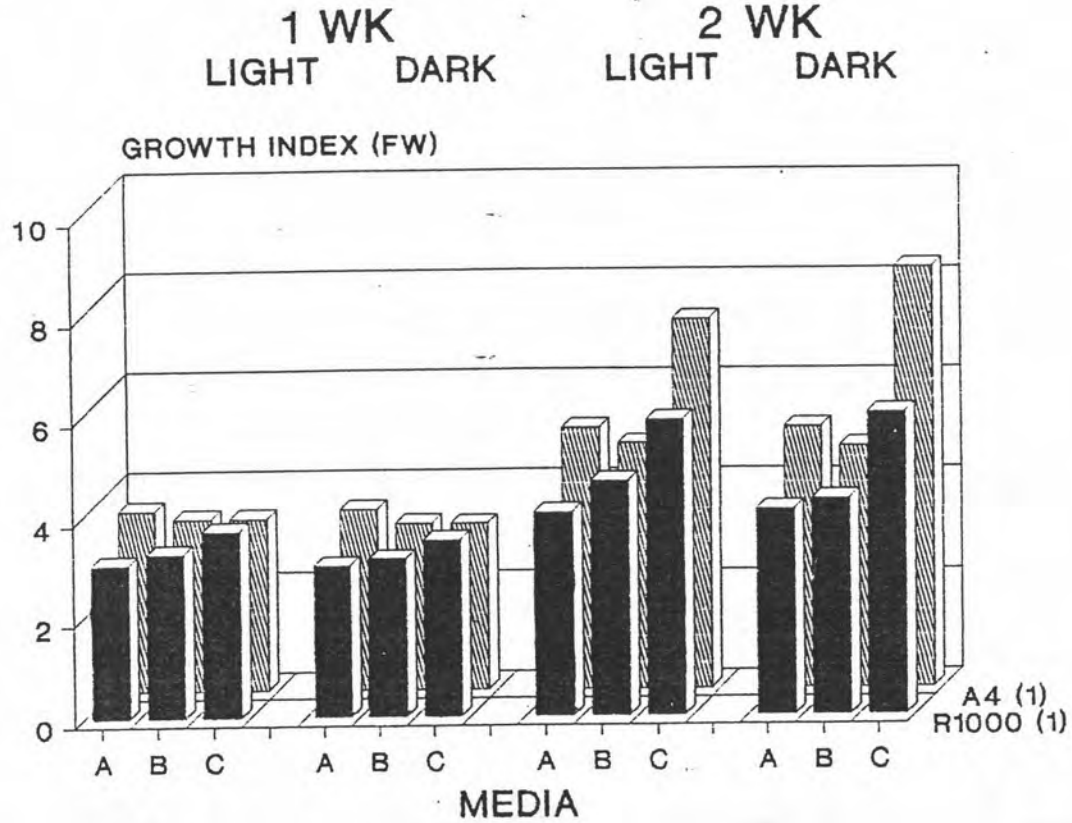
โดย a มีค่ามากกว่า b และ b มีค่ามากกว่า c

ตารางที่ 17 เปรียบเทียบผลของสภาวะที่สว่างและมืด ที่มีผลต่อการเจริญของ hairy root A4 และ hairy root R1000 ในอาหารสูตร A B และ C ในสัปดาห์ที่ 1 และ 2 โดยวิธี T-test ผลที่ได้เฉลี่ยมาจากค่า growth index ของน้ำหนักสด 6 ตัวอย่าง

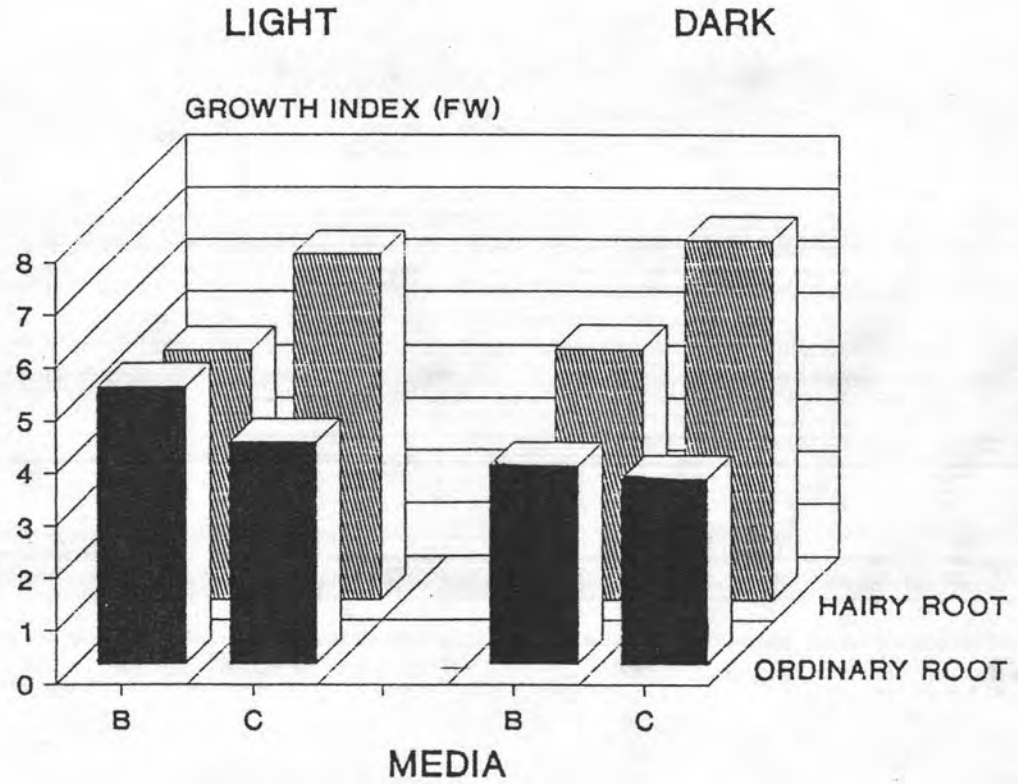
สภาวะ	สัปดาห์ที่ 1						สัปดาห์ที่ 2					
	A		B		C		A		B		C	
	A4(1)	R1000(1	A4(1)	R1000(1	A4(1)	R1000(1	A4(1)	R1000(1	A4(1)	R1000(1	A4(1)	R1000(1
สว่าง	3.59	3.05	3.41	3.26	3.42	3.70	5.17	4.05	4.87	4.66	7.34	5.86
มืด	3.59	3.01	3.32	3.14	3.30	3.51	5.18	4.08	4.80	4.29	8.36	5.99
Diff	0.00^{ns}	0.04^{ns}	0.09^{ns}	0.12^{ns}	0.12^{ns}	0.19^{ns}	-0.01^{ns}	-0.03^{ns}	0.07^{ns}	0.37^{ns}	-1.02^{**}	-0.13^{ns}

** แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

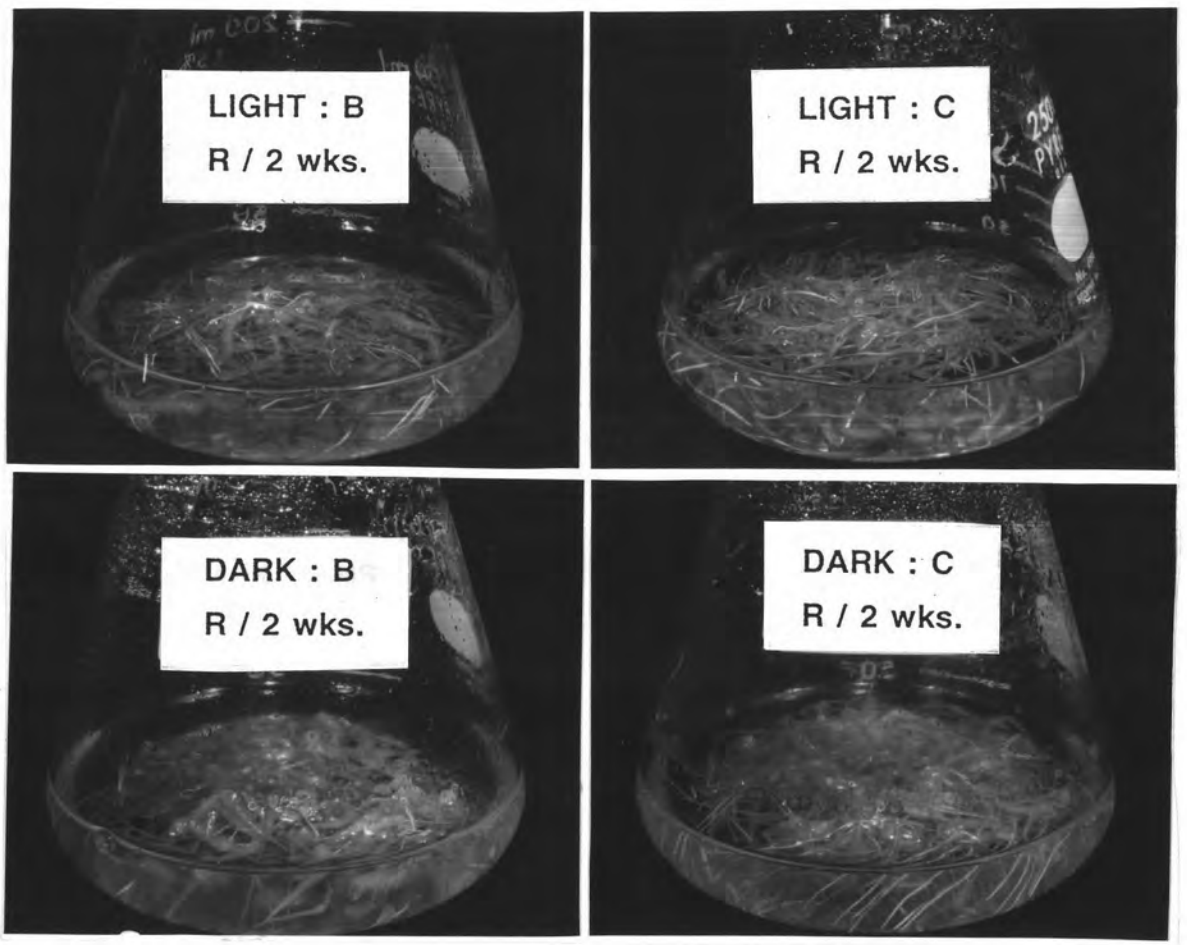
ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ



แผนภาพที่ 5 ผลการเจริญของ hairy root ในอาหารเหลว



แผนภาพที่ 6 ผลการเจริญของ in vitro root เทียบกับ hairy root ในอาหารเหลว



ภาพที่ 28 In vitro root ที่เจริญในอาหารสูตร B และ C

ก. สภาวะสว่าง / 2 สัปดาห์

ข. สภาวะมืด / 2 สัปดาห์

hairy root A4 (1) และ hairy root R1000 (1) มีการเจริญในอาหารสูตร C ดีกว่าสูตร A และสูตร B เหมือนกัน ทั้งในที่สว่าง และที่มืด จากผลการทดลองดังกล่าวจึงเห็นได้ว่า hairy root ทั้งสองมีการเจริญได้ดีที่สุดในอาหารสูตร C โดยสามารถเห็นความแตกต่างของการเจริญได้ดีที่สุดใน hairy root A4(1) เมื่อเลี้ยงในสภาวะมืด เป็นเวลา 2 สัปดาห์

3.2.2.3 ผลการเจริญของ hairy root ในสภาวะสว่างและมืด

ผลการเปรียบเทียบการเจริญของ hairy root ในสภาวะสว่าง และมืด โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยทางสถิติ ดังในตารางที่ 17 ซึ่งพบว่าโดยส่วนใหญ่แล้ว ไม่พบความแตกต่างของการเจริญของ hairy root ที่เจริญในที่สว่าง และที่เจริญในที่มืด ในhairy root ทั้งสองที่เจริญในอาหารทั้ง 3 สูตร และทั้ง 2 สัปดาห์ ยกเว้น hairy root A4 (1) ที่เจริญในอาหารสูตร C ในสัปดาห์ที่ 2 เพียงคู่เดียวที่พบว่ามีการเจริญในที่สว่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง จากผลการทดลองดังกล่าวจึงเห็นได้ว่าโดยส่วนใหญ่แล้ว แสงไม่มีผลต่อการเจริญของ hairy root แต่เมื่อนำ hairy root A4(1) ที่มีการเจริญดีมาเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสมคือสูตร C เป็นเวลา 2 สัปดาห์ซึ่งทำให้ hairy root สามารถเจริญได้เต็มที่แล้วจะสามารถเห็นความแตกต่างของการเจริญของ hairy root ในที่สว่าง และที่มืดได้ โดยพบว่า hairy root สามารถเจริญในที่มืดได้ดีกว่า ในที่สว่าง

จากผลการทดลอง ข้อ 3.2.2.2 ซึ่งทราบว่าสูตร C เป็นสูตรที่มีการเจริญดีที่สุด และลักษณะของ hairy root ที่เจริญในอาหารมีสีขาว ไม่มีสีน้ำตาลเหมือน hairy root ที่เจริญในอาหารสูตร A และสูตร B และลักษณะรากยังคงเป็นเส้นไม่บวมคล้ายกับจะกลายเป็นแคลลัสเหมือน hairy root ที่เจริญในอาหารสูตร A (ภาพที่ 29) จึงเลือกใช้อาหารสูตร C สำหรับเลี้ยง hairy root เบอร์อื่น ๆ ต่อไปคือ hairy root A4 (2) hairy root A4 (3) hairy root R1000 (2) และ hairy root R1000 (3) เพื่อนำไปวิเคราะห์แอลคาลอยด์ต่อไป และในส่วนของ hairy root A4 (1) และ hairy root R1000 (1) ที่ได้จากการทดลองที่ผ่านมานี้ได้ถูกนำมาเก็บแห้ง เพื่อวิเคราะห์แอลคาลอยด์ เช่นกัน (ภาพที่ 30)

3.2.3 ผลการเจริญของ in vitro root ในอาหารเหลว

ผลการเจริญของ in vitro root ในอาหารเหลว ทำการศึกษาในอาหารสูตร B และสูตร C ในสภาวะสว่าง และมืด เก็บผลในสัปดาห์ที่ 2 โดยใช้ราก

ตารางที่ 18 ผลการเจริญของ in vitro root ที่เลี้ยงในอาหารเหลวเป็นเวลา 2 สัปดาห์

ก. เปรียบเทียบผลการเจริญของ in vitro root กับ hairy root ในอาหารสูตร B และ C ในสภาวะสว่างและมืด โดยวิธี T-test

ข. เปรียบเทียบผลของอาหารสูตร B และC ที่มีต่อการเจริญของ in vitro root เทียบกับ hairy root ในสภาวะสว่าง และมืด โดยวิธี T-test

ค. เปรียบเทียบผลของสภาวะสว่าง และมืดที่มีต่อการเจริญของ in vitro root เทียบกับ hairy root ในอาหารสูตร B และ C โดยวิธี T-test

ผลที่ได้เฉลี่ยมาจากค่า growth index ของน้ำหนักสด 3 ตัวอย่าง

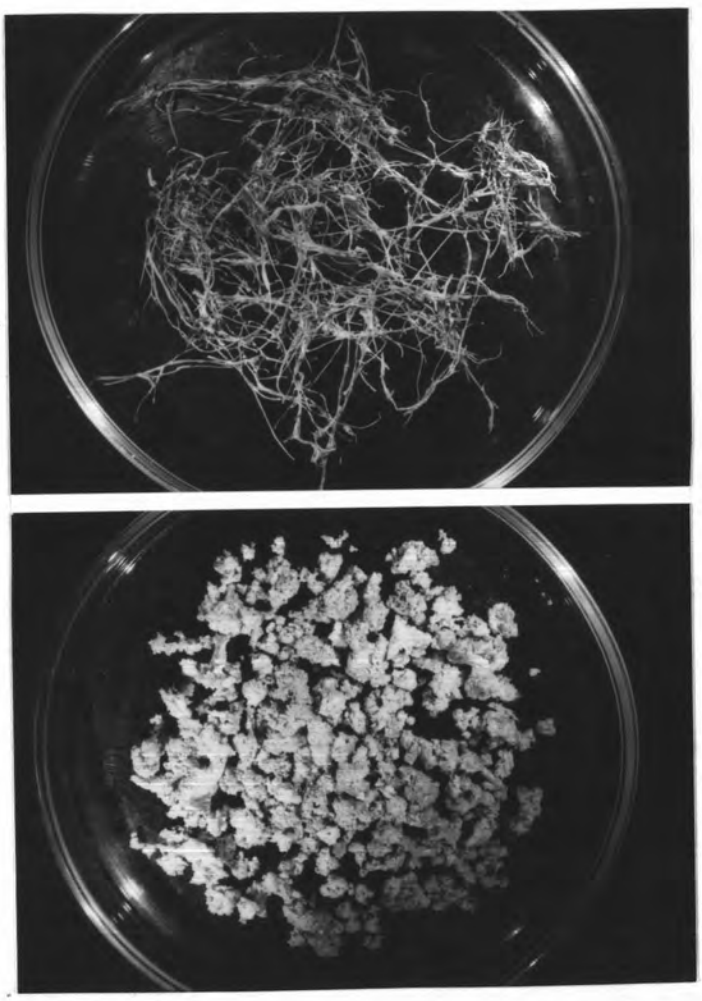
ชนิดราก	สว่าง		มืด	
	B	C	B	C
HR	4.73	6.55	4.67	6.83
IR	5.25	4.20	3.75	3.51
Diff	-0.52^{ns}	2.35**	0.92^{ns}	3.32**

อาหาร	สว่าง		มืด	
	HR	IR	HR	IR
B	4.73	5.25	4.67	3.75
C	6.55	4.20	6.83	3.51
Diff	-1.82**	1.05^{ns}	-2.16**	0.24^{ns}

สภาวะ	B		C	
	HR	IR	HR	IR
สว่าง	4.73	5.25	6.55	4.20
มืด	4.67	3.75	6.83	3.51
Diff	0.06^{ns}	1.5*	-0.28^{ns}	0.69*

HR = hairy root IR = in vitro root

ภาพที่ 29 ลักษณะ hairy root A4 ที่กลายเป็นแคลลัสเมื่อเจริญในเหลวสูตร A เป็นเวลา 2 สัปดาห์



ก

ข

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 30 ลักษณะตัวอย่างเนื้อเยื่อแห้งที่นำไปวิเคราะห์แอลคาลอยด์

ก. เนื้อเยื่อ hairy root

ข. เนื้อเยื่อแคลลัส

จากต้นกล้าลำโพง (ภาพที่ 28) ทำการวัดผลโดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยจาก growth index ของน้ำหนักสดด้วยวิธีทางสถิติ ซึ่งได้ผลดังนี้

3.2.3.1 ผลการเจริญของ in vitro root เทียบกับ hairy root

ผลการเปรียบเทียบการเจริญของ in vitro root และ hairy root (ใช้ค่าเฉลี่ยจาก hairy root A4 (1) และ hairy root R1000 (1)) โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยทางสถิติ ดังตารางที่ 18 ก. พบว่า ในอาหารสูตร B นั้นไม่พบความแตกต่างระหว่างการเจริญของรากทั้ง 2 ชนิด แต่พบว่าในอาหารสูตร C hairy root เจริญดีกว่า in vitro root อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทั้งในที่สว่าง และที่มืด

3.2.3.2 ผลการเจริญของ in vitro root ในอาหารสูตร B และสูตร C

ผลการเปรียบเทียบการเจริญของ in vitro root ในอาหารสูตร B และสูตร C โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยทางสถิติ ดังตารางที่ 18 ข. ไม่พบความแตกต่างระหว่างการเจริญของ in vitro root ในอาหารทั้ง 2 สูตร

3.2.3.3 ผลการเจริญของ in vitro rootในสภาวะสว่างและมืด

ผลการเปรียบเทียบการเจริญของin vitro root ในสภาวะสว่าง และมืด โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยทางสถิติดังตารางที่ 18 ค. พบว่า in vitro root ที่เจริญในที่สว่างมีการเจริญดีกว่าในที่มืดอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง

จากผลการทดลองดังกล่าวจึงเห็นได้ว่า hairy root มีการเจริญต่างจาก in vitro root 3 ประการคือ 1. hairy root สามารถเจริญได้ดีกว่า in vitro root 2. แสงไม่มีผลต่อการเจริญของ hairy root โดยส่วนใหญ่ เฉพาะในอาหารสูตร C เท่านั้นที่ hairy root เจริญในที่มืดได้ดีกว่าในที่สว่าง แต่แสงมีผลต่อการเจริญของ in vitro root โดย in vitro root เจริญในที่สว่างได้ดีกว่าในที่มืด และ 3. อาหารไม่มีผลต่อการเจริญของ in vitro root แต่มีผลต่อการเจริญของ hairy rootโดยอาหารสูตร C เป็นอาหารที่ hairy root สามารถเจริญได้ดีที่สุด

4. ผลการตรวจหา และวิเคราะห์หาปริมาณ tropane alkaloid

การตรวจ และวิเคราะห์แอลคาลอยด์ จากเนื้อเยื่อตัวอย่างที่ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแบ่งเป็น 2 ลักษณะ คือการวิเคราะห์เชิงคุณภาพเพื่อตรวจสอบเอกลักษณ์โดยวิธี TLC และการวิเคราะห์เชิงปริมาณโดยวิธี HPLC ซึ่งมีแอลคาลอยด์ atropine เป็นแอลคาลอยด์ที่ทำการวิเคราะห์ ดังต่อไปนี้

4.1 ผลการตรวจหา tropane alkaloid ด้วยวิธี TLC

ตัวอย่างเนื้อเยื่อที่นำมาวิเคราะห์เพื่อตรวจสอบเอกลักษณ์ โดยมี atropine standard reference เป็นตัวเทียบ แสดงไว้ตามลำดับที่วิเคราะห์ ดังนี้

ตัวอย่างที่ 1 hairy root A4

ตัวอย่างที่ 2 hairy root R1000

ตัวอย่างที่ 3 residue จากสารละลายตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ 4 in vitro root

ตัวอย่างที่ 5 hairy root A4 ที่ผ่านการสกัดที่ไม่สมบูรณ์

ตัวอย่างที่ 6 แคลลัสจาก hairy root A4

ตัวอย่างที่ 7 atropine standard reference

ระบบที่นำมาใช้ประกอบไปด้วย 5 ระบบซึ่งให้ผลการตรวจสอบที่มีคุณภาพแตกต่างกันไป ดังผลต่อไปนี้

4.1.1 ผลการตรวจหา tropane alkaloid ด้วยวิธี TLCระบบที่ 1

ผลการตรวจหา tropane alkaloid ด้วยวิธี TLC ในระบบที่ 1 ซึ่งมีสารละลายของระบบประกอบด้วย chloroform : methanol : 25% ammonium solution ในอัตราส่วน 87 : 10 : 1 มีระยะเวลาการเคลื่อนที่ของสารละลายจากจุดเริ่มต้นถึง solvent front เท่ากับ 42 นาที spot ที่ได้เป็น spot ของแอลคาลอยด์ สีส้ม ซึ่งมีจำนวนและค่า HRf ต่างกันไปดังแสดงในตารางที่ 19

จากตารางที่ 19 เห็นได้ว่า spot ของสารในตัวอย่างที่ 7 ซึ่งเป็น atropine standard reference มีเพียง 1 spot มีค่า HRf เท่ากับ 22.7 ซึ่งตรงกับตำแหน่งของ spot ที่ 4 ของสารตัวอย่างที่ 1 2 3 4 และ 5 และยังพบว่า spot ของสารตัวอย่างที่ 1 2 3 4 และ 5 นี้ มี spot ของแอลคาลอยด์ชนิดอื่นนอกเหนือจาก atropine spot ซึ่งเป็น unknown spot ที่ไม่อาจทราบได้ว่าเป็นspot ของ

ตารางที่ 19 ผลการตรวจหา tropane alkaloid ด้วยวิธี TLC ระบบที่ 1

ตัวอย่างที่		1	2	3	4	5	6	* * 7
จำนวน spot		7	7	1	6	5	0	1
spot ที่ 1	* ความสูง	7.9	7.7	7.7	7.7	7.7	-	-
	HRf	52.7	51.3	51.3	51.3	51.3	-	-
spot ที่ 2	ความสูง	6.7	6.4	-	6.2	6.2	-	-
	HRf	44.7	42.7	-	41.3	41.3	-	-
spot ที่ 3	ความสูง	4.7	4.3	4.3	4.2	4.2	-	-
	HRf	31.3	28.7	28.7	28.0	28.0	-	-
spot ที่ 4	ความสูง	3.5	3.3	3.3	3.4	3.4	-	3.4
	HRf	23.3	22.0	22.0	22.7	22.7	-	22.7
spot ที่ 5	ความสูง	2.3	2.3	-	-	2.4	-	-
	HRf	15.3	15.3	-	-	16.0	-	-
spot ที่ 6	ความสูง	1.2	1.2	1.0	1.3	-	-	-
	HRf	8.0	8.0	6.7	8.7	-	-	-
spot ที่ 7	ความสูง	0.3	0.3	0.3	0.2	-	-	-
	HRf	2.0	2.0	2.0	1.3	-	-	-

* ความสูง หน่วย เซนติเมตร

* * atropine standard reference

แอลคาลอยด์ชนิดใด โดยมีจำนวน unknown spot มากที่สุดในตัวอย่างที่ 1 และ 2 คือ 6 spot รองลงมาคือในตัวอย่างที่ 4 จำนวน unknown spot 5 spot และตัวอย่างที่ 3 และ 5 จำนวน unknown spot 4 spot ตามลำดับ ส่วนในตัวอย่างที่ 6 นอกจากไม่พบ atropine spot แล้ว ยังไม่พบ unknown spot ใด ๆ อีกด้วย

4.1.2 ผลการตรวจหา tropane alkaloid ด้วยวิธี TLCระบบที่ 2

สารละลายในระบบที่ 2 ประกอบด้วย chloroform : acetone : methanol : 25% ammmonium solutionในอัตราส่วน 75 : 10 : 15 : 2 มีระยะเวลาการเคลื่อนที่ของสารละลายจากจุดเริ่มต้นถึง solvent front เท่ากับ 51 นาที ได้ spot ของแอลคาลอยด์สีส้ม มีจำนวน spot และค่า HRf ดังตารางที่ 20

จากตารางที่ 20 spot ของ atropine standard reference (ตัวอย่างที่ 7) มี 1 spot มีค่า HRf เท่ากับ 32.7 และตรงกับตำแหน่งของ spot ที่ 5 ของสารตัวอย่างที่ 1 2 3 4 และ 5 และพบ unknown spot ในตัวอย่าง ที่ 1 2 3 และ 4 โดยมีจำนวน unknown spot มากที่สุดในตัวอย่างที่ 1 และ 2 คือ 6 spot รองลงมาคือในตัวอย่างที่ 3 และ 4 จำนวนunknown spot 2 spot ส่วนใน ตัวอย่างที่ 6 ไม่พบทั้ง atropine spot และ unknown spot ใด

4.1.3 ผลการตรวจหา tropane alkaloid ด้วยวิธี TLCระบบที่ 3

สารละลายในระบบที่ 3 ประกอบด้วย acetone : น้ำ : 25% ammonium solution ในอัตราส่วน 90 : 7 : 3 มีระยะการเคลื่อนที่ของสารละลาย จากจุดเริ่มต้นถึง solvent front เท่ากับ 36 นาที ได้ spot ของแอลคาลอยด์สีส้ม มี จำนวน spot และค่า HRf ดังแสดงในตารางที่ 21

จากตารางที่ 21 spot ของ atropine standard reference (ตัวอย่างที่ 7) มี 1 spot มีค่า HRf เท่ากับ 31.3 ตรงกับตำแหน่งของ spot ที่ 3 ของสารตัวอย่างที่ 1 2 3 4 และ 5 และพบ unknown spot ในตัวอย่างที่ 1 2 3 4 และ 5 โดยมีจำนวน unknown spot มากที่สุดในตัวอย่างที่ 1 และ 2 คือ จำนวน 3 spot รองลงมาคือตัวอย่างที่ 3 และ 5 จำนวน unknown spot 2 spot และตัวอย่างที่ 4 จำนวน unknown spot 1 spot ส่วนในตัวอย่างที่ 6 ไม่พบทั้ง atropine spot และ unknown spot ใด ๆ

ตารางที่ 20 ผลการตรวจหา tropane alkaloid ด้วยวิธี TLC ระบบที่ 2

ตัวอย่างที่		1	2	3	4	5	6	* * 7
จำนวน spot		7	7	3	3	2	0	1
spot ที่ 1	* ความสูง	9.2	9.3	9.4	-	-	-	-
	HRf	61.3	62.0	62.7	-	-	-	-
spot ที่ 2	ความสูง	8.5	8.5	-	-	-	-	-
	HRf	56.7	56.7	-	-	-	-	-
spot ที่ 3	ความสูง	8.1	8.0	-	-	-	-	-
	HRf	54.0	53.3	-	-	-	-	-
spot ที่ 4	ความสูง	5.8	5.7	5.7	5.5	-	-	-
	HRf	38.7	38.0	38.0	36.7	-	-	-
spot ที่ 5	ความสูง	4.9	4.9	4.9	4.9	4.9	-	4.9
	HRf	32.7	32.7	32.7	32.7	32.7	-	32.7
spot ที่ 6	ความสูง	3.7	3.7	-	-	-	-	-
	HRf	24.7	24.7	-	-	-	-	-
spot ที่ 7	ความสูง	2.5	2.5	-	2.3	-	-	-
	HRf	16.7	16.7	-	15.3	-	-	-

* ความสูง หน่วย เซนติเมตร

* * atropine standard reference

ตารางที่ 21 ผลการตรวจหา tropane alkaloid ด้วยวิธี TLC ระบบที่ 3

ตัวอย่างที่		1	2	3	4	5	6	7 **
จำนวน spot		4	4	3	2	3	0	1
spot ที่ 1	* ความสูง	10.8	11.0	11.1	-	11.1	-	-
	HRf	72.0	73.3	74.0	-	74.0	-	-
spot ที่ 2	ความสูง	5.7	6.0	-	-	-	-	-
	HRf	38.0	40.0	-	-	-	-	-
spot ที่ 3	ความสูง	4.8	5.0	4.7	4.7	4.8	-	4.7
	HRf	32.0	33.3	31.3	31.3	32.0	-	31.3
spot ที่ 4	ความสูง	0.9	0.9	0.5	0.4	0.7	-	-
	HRf	6.0	6.0	3.3	2.7	4.7	-	-

* ความสูง หน่วย เซนติเมตร

** atropine standard reference

4.1.4 ผลการตรวจหา tropane alkaloid ด้วยวิธี TLCระบบที่ 4

สารละลายในระบบที่ 4 ประกอบด้วย ethylacetate : isopropanol : 25 % ammonium solution ในอัตราส่วน 45 : 35 : 2 มีระยะการเคลื่อนที่ของสารละลายจากจุดเริ่มต้นถึง solvent front เท่ากับ 67 นาที ได้ spot ของแอลคาลอยด์สีส้ม มีจำนวน spot และค่า HRf ดังแสดงในตารางที่ 22

จากตารางที่ 22 spot ของสาร atropine standard reference (ตัวอย่างที่ 7) มี 1 spot ซึ่งมีค่า HRf เท่ากับ 70.0 ตรงกับตำแหน่ง spot ที่ 2 ของสารตัวอย่างที่ 1 2 3 4 และ 5 และพบ unknown spot ในตัวอย่างที่ 1 2 3 และ 5 โดยมีจำนวน unknown spot มากที่สุดในตัวอย่างที่ 1 2 และ 5 คือ 2 spot รองลงมาคือตัวอย่างที่ 3 จำนวน unknown spot 1 spot ส่วนในตัวอย่างที่ 6 ไม่พบทั้ง atropine spot และ unknown spot ใด ๆ

4.1.5 ผลการตรวจหา tropane alkaloid ด้วยวิธี TLCระบบที่ 5

สารละลายในระบบที่ 5 ประกอบด้วย chloroform : acetone : diethylamine ในอัตราส่วน 50 : 40 : 10 มีระยะเวลาการเคลื่อนที่ของสารละลายจากจุดเริ่มต้นถึง slovent front เท่ากับ 41 นาที ได้ spot ของแอลคาลอยด์สีส้ม มีจำนวน spot และค่า HRf ดังแสดงในตารางที่ 23

จากตารางที่ 23 spot ของสาร atropine standard reference (ตัวอย่างที่ 7) มี 1 spot ซึ่งมีค่า HRf เท่ากับ 49.3 ตรงกับตำแหน่ง spot ที่ 2 ของสารตัวอย่างที่ 1 2 3 4 และ 5 และพบ unknown spot ในตัวอย่างที่ 1 2 3 และ 5 โดยมีจำนวน unknown spot มากที่สุดในตัวอย่างที่ 1 และ 2 คือ 2 spot รองลงมาคือตัวอย่างที่ 3 และ 5 จำนวน unknown spot 1 spot ส่วนในตัวอย่างที่ 6 ไม่พบทั้ง atropine spot และ unknown spot ใด ๆ

จากการวิเคราะห์ทั้ง 5 ระบบที่ผ่านมา จะเห็นว่าทุกระบบสามารถแสดง atropine spot ให้เห็นได้โดยมีค่า HRf ของ atropine spot ต่างกันไป ตามแต่ละระบบ แต่เมื่อพิจารณาความสามารถในการแยกชนิดของสารได้มากที่สุด (resolution ดีที่สุด) และชัดเจนที่สุด พบว่าระบบที่ 1 ให้การแยกของสารดีกว่าระบบอื่น ๆ อีก 4 ระบบ จึงขอนำผลที่ได้จากระบบที่ 1 มาเป็นหลักในการพิจารณาความแตกต่างของผลจากสารตัวอย่าง 7 ชนิด ซึ่งพบว่าใน hairy root ทั้ง A4 และ R1000 พบจำนวนชนิดแอลคาลอยด์มากที่สุดคือ 7 ชนิด รอง

ตารางที่ 22 ผลการตรวจหา tropane alkaloid ด้วยวิธี TLC ระบบที่ 4

ตัวอย่างที่		1	2	3	4	5	6	** 7
จำนวน spot		3	3	2	1	3	0	1
spot ที่ 1	* ความสูง	11.4	12.0	12.3	-	12.3	-	-
	HRf	76.0	80.0	82.0	-	82.0	-	-
spot ที่ 2	ความสูง	10.0	10.3	10.3	10.4	10.4	-	10.5
	HRf	66.7	68.7	68.7	69.3	69.3	-	70.0
spot ที่ 3	ความสูง	9.3	9.5	-	-	9.6	-	-
	HRf	62.0	63.3	-	-	64.0	-	-

* ความสูง หน่วย เซนติเมตร

** atropine standard reference

ตารางที่ 23 ผลการตรวจหา tropane alkaloid ด้วยวิธี TLC ระบบที่ 5

ตัวอย่างที่		1	2	3	4	5	6	* * 7
จำนวน spot		3	3	2	1	2	0	1
spot ที่ 1	* ความสูง	8.6	9.2	9.3	-	9.4	-	-
	HRf	57.3	61.3	62.0	-	62.7	-	-
spot ที่ 2	ความสูง	7.0	7.5	7.5	7.4	7.5	-	7.4
	HRf	46.7	50.0	50.0	49.3	50.0	-	49.3
spot ที่ 3	ความสูง	5.1	5.6	-	-	-	-	-
	HRf	34.0	37.3	-	-	-	-	-

* ความสูง หน่วย เซนติเมตร

* * atropine standard reference

ลงมาคือใน in vitro rootพบ 6 ชนิด โดยไม่พบชนิดที่ตรงกับ spot ที่ 5 จาก residue ของสารละลายตัวอย่างพบ 5 ชนิด โดยไม่พบชนิดที่ตรงกับ spot ที่ 2 และ spot ที่ 5 และจาก hairy root A4 ที่ผ่านขั้นตอนการสกัดไม่สมบูรณ์พบ 5 ชนิด โดยไม่พบชนิดที่ตรงกับ spotที่ 6 และ 7 ส่วนในแคลลัสที่เกิดจาก hairy root A4 ไม่สามารถตรวจพบแอลคาลอยด์ชนิดใดๆ เลยในระบบนี้ ผลดังกล่าวนอกจากจะทำให้ทราบว่าสารตัวอย่างทุกชนิดที่นำมาวิเคราะห์ ยกเว้นแคลลัส มีแอลคาลอยด์ atropine แล้ว ยังพบว่ามีแอลคาลอยด์ที่ไม่ทราบชนิดอยู่ด้วยแต่ต่างกันตามชนิดของเนื้อเยื่อซึ่งจะเห็นได้จาก hairy root ทั้ง 2 ชนิด ให้ชนิดแอลคาลอยด์มากกว่า in vitro root และแคลลัส และยังขึ้นอยู่กับ stability คือเมื่อทิ้งสารละลายตัวอย่างที่สกัดไว้เพื่อการวิเคราะห์ HPLC ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลานานจนเป็น residue พบว่าไม่สามารถตรวจพบแอลคาลอยด์บางชนิดได้ และท้ายสุดขึ้นอยู่กับวิธีการสกัด เมื่อวิธีการสกัดไม่สมบูรณ์ดังตัวอย่างที่ 5 ซึ่งใช้ chloroform อย่างเดียวในการหมักพบว่าไม่สามารถตรวจสอบพบแอลคาลอยด์บางชนิดได้เช่นกัน

4.2 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณ atropine ด้วยวิธี HPLC

เนื่องจากการตรวจสอบแอลคาลอยด์โดยวิธี TLC ที่ผ่านมานั้นเป็นเพียงการพิสูจน์เอกลักษณ์เพื่อให้ทราบว่ามีแอลคาลอยด์ atropine อยู่ในเนื้อเยื่อตัวอย่างจริง แต่ไม่สามารถตรวจหาปริมาณ atropine ที่แน่นอนได้ จึงจำเป็นต้องมีการวิเคราะห์แอลคาลอยด์ด้วยวิธี HPLC เพื่อตรวจหาปริมาณ atropine ที่มีในเนื้อเยื่อตัวอย่างแต่ละชนิดต่อไป

4.2.1 ผล calibration curve ของ atropine standard reference

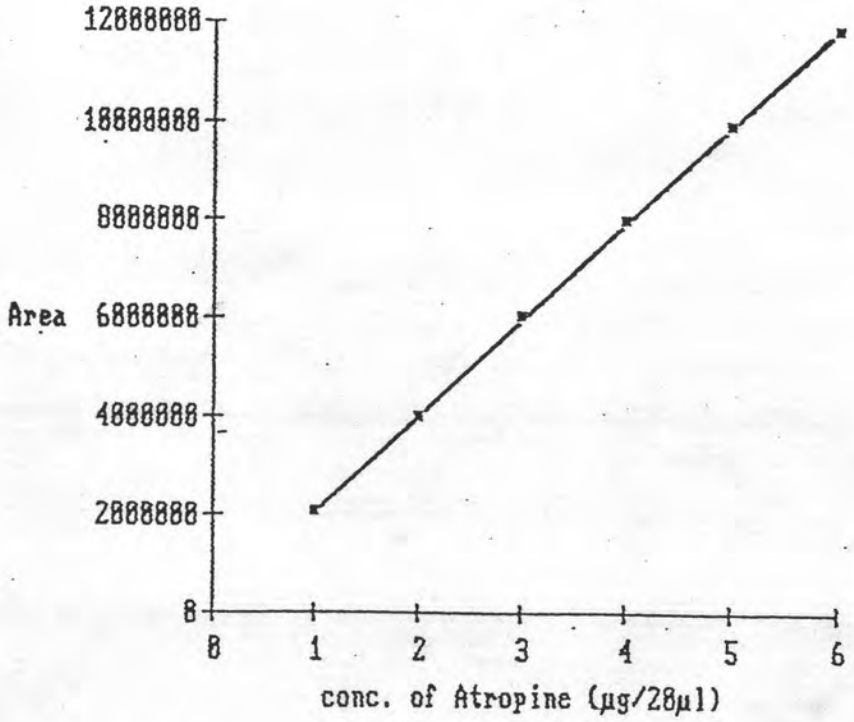
การทำ calibration curve ของสารที่ต้องการวิเคราะห์ปริมาณนับว่ามีความสำคัญอย่างยิ่ง เนื่องจากจะทำให้สามารถแปรผลของพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ HPLC มาเป็นปริมาณ atropine ได้ในที่สุด ภาพที่ 31 แสดง chromatogram ของ atropine standard reference ที่ค่าความเข้มข้น 6.00, 5.00, 4.00, 3.00, 2.00 และ 1.00 μg/20 μl มีค่าพื้นที่ใต้กราฟดังแสดงในตารางที่ 24 ซึ่งให้ calibration curve ของ atropine standard reference ดังแสดงในภาพที่ 32 และมีสมการ linear regression คือ Y = 76764.35 + 1963227.724 X (r=0.999952) โดย Y คือค่าพื้นที่ใต้กราฟ (ตารางหน่วย) และ X คือค่าความเข้มข้นของ atropine (μg/20 μl) ดังนั้นเมื่อทราบพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ HPLC ก็จะทราบต่อมาถึงค่าความเข้มข้นของ

ตารางที่ 24 ผลการวิเคราะห์ atropine standard reference ที่ความเข้มข้นต่างๆกัน ด้วยวิธี HPLC

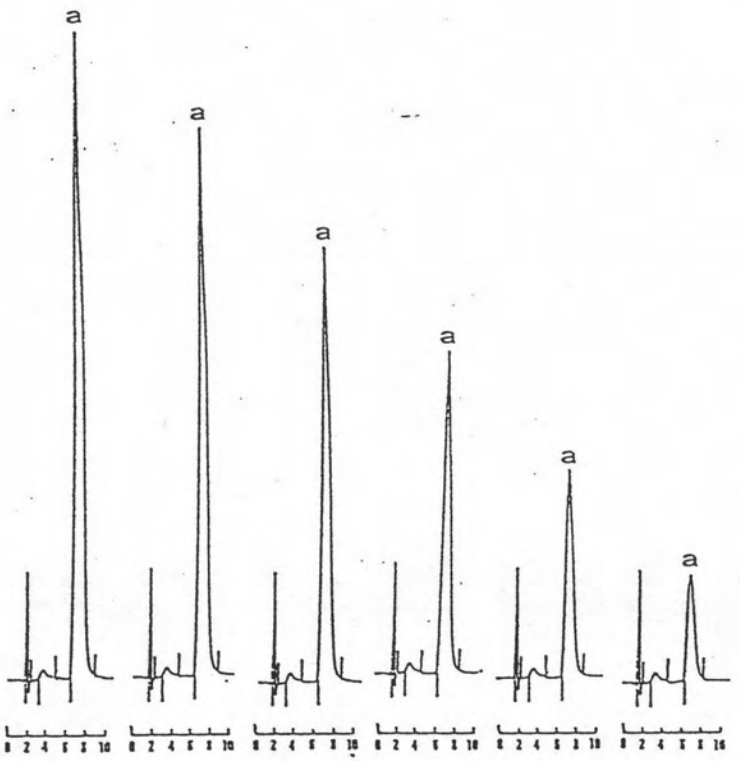
Atropine standard µg/20µl	Area under curve at absorbance 215 nm					
	Area1	Area2	Area3	Mean	SD	%CV
6	11822552	11813858	11870629	11835680	19338.96	0.16
5	9894900	9886330	9892116	9891115	2764.94	0.03
4	7913443	7957112	7973485	7948013	19630.08	0.25
3	5986999	5998785	6035567	6007117	16022.23	0.27
2	3978448	3984455	3965914	3976272	5983.05	0.15
1	2041820	2048980	1999712	2030171	16835.84	0.83

$Y = 76764.35 + 1963227.72 X$

$r = 0.999952$



ภาพที่ 31 Calibration curve ของ atropine standard reference



ภาพที่ 32 Chromatogram ของ atropine standard reference ที่ความเข้มข้น 6.00, 5.00, 4.00, 3.00, 2.00 และ1.00 µg/20 µl

a = atropine

atropine ($\mu g/20\ \mu l$) ซึ่งสามารถนำไปหาปริมาณ atropine (% DW) ได้ต่อไป

4.2.2 ผล co-chromatogram ของ hairy root

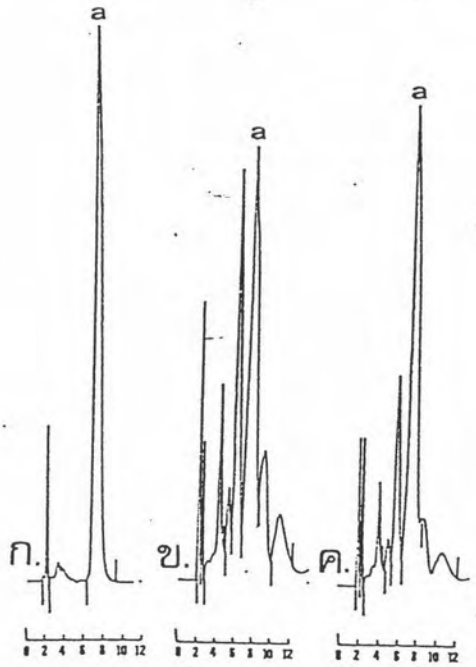
การทำ co-chromatogram นอกจากจะทำให้ทราบแน่ชัดว่าเนื้อเยื่อตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์มีแอลคาลอยด์ atropine อยู่จริงแล้ว ยังทำให้ทราบว่า peak ใดของ chromatogram คือ peak ของ atropine อีกด้วย โดยการวิเคราะห์สารตัวอย่างร่วมกับ atropine standard ในอัตราส่วน 1 : 1 ผลของ co-chromatogram ระหว่าง atropine standard reference กับ สารตัวอย่างจาก hairy root A4 และ co-chromatogram ระหว่าง atropine standard reference กับ สารตัวอย่างจาก hairy root R1000 แสดงดังภาพที่ 33 และ 34 ซึ่งพบว่า peak ของ สาร atropine standard reference ซ้อนเป็น peak เดียวกับ peak นาทีที่ 7 (โดยประมาณ ของสารตัวอย่างจาก hairy root ทั้งสองชนิด ส่วน unknown peak ที่พบในสารตัวอย่างจาก hairy root มีความสูงลดลงประมาณครึ่งหนึ่งใน co-chromatogram

4.2.3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณ atropine จากเนื้อเยื่อพืช

ผลการวิเคราะห์หาปริมาณ atropine ด้วยวิธี HPLC จากเนื้อเยื่อพืช 48 ตัวอย่าง แสดงผล chromatogram ดังภาพที่ 35 36 37 38 39 และ 40 ซึ่งมีค่าพื้นที่ใต้กราฟ ค่าความเข้มข้นของ atropine ($\mu g/20\ \mu l$) และปริมาณ atropine (% DW) ดังแสดงในตารางที่ 25 26 27 28 และ 29 ซึ่งสามารถนำมาวิเคราะห์ผลในลำดับต่อไปได้ดังนี้

4.2.3.1 ผลการวิเคราะห์ปริมาณ atropine ใน hairy rootเบอร์ต่าง ๆ

ผลการวิเคราะห์ปริมาณ atropine ใน hairy root A4 (1) hairy root A4 (2) และ hairy root A4 (3) ซึ่งเจริญในอาหารสูตร C ในสภาวะแสง และอายุต่างกันดังในตารางที่ 30 พบว่า hairy root A4 (2) มีปริมาณ atropine สูงสุด รองลงมาคือ hairy root A4 (3) และ hairy root A4 (1) ตามลำดับทั้ง 4 สภาวะ โดยมีปริมาณ atropine เฉลี่ยรวมจากทั้ง 4 สภาวะดังนี้ hairy root A4 (2) มีปริมาณ atropine เฉลี่ย 0.42% DW hairy root A4 (3) มีปริมาณ atropine เฉลี่ย 0.28% DW และ hairy root A4 (1) มีปริมาณ atropine เฉลี่ย 0.17% DW ตามลำดับ

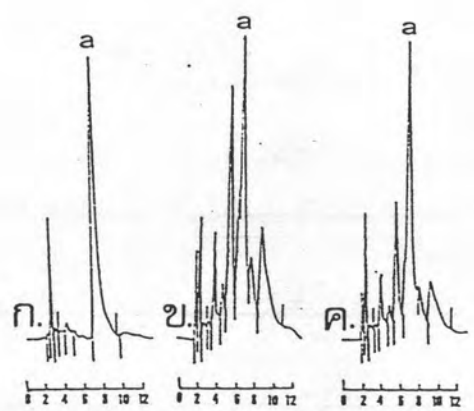


ภาพที่ 33 Co-chromatogram ของ atropine standard reference กับสารสกัด tropane alkaloid จาก hairy root A4

ก. atropine standard reference

ข. สารสกัดแอลคาลอยด์จาก hairy root A4

ค. co-chromatogram

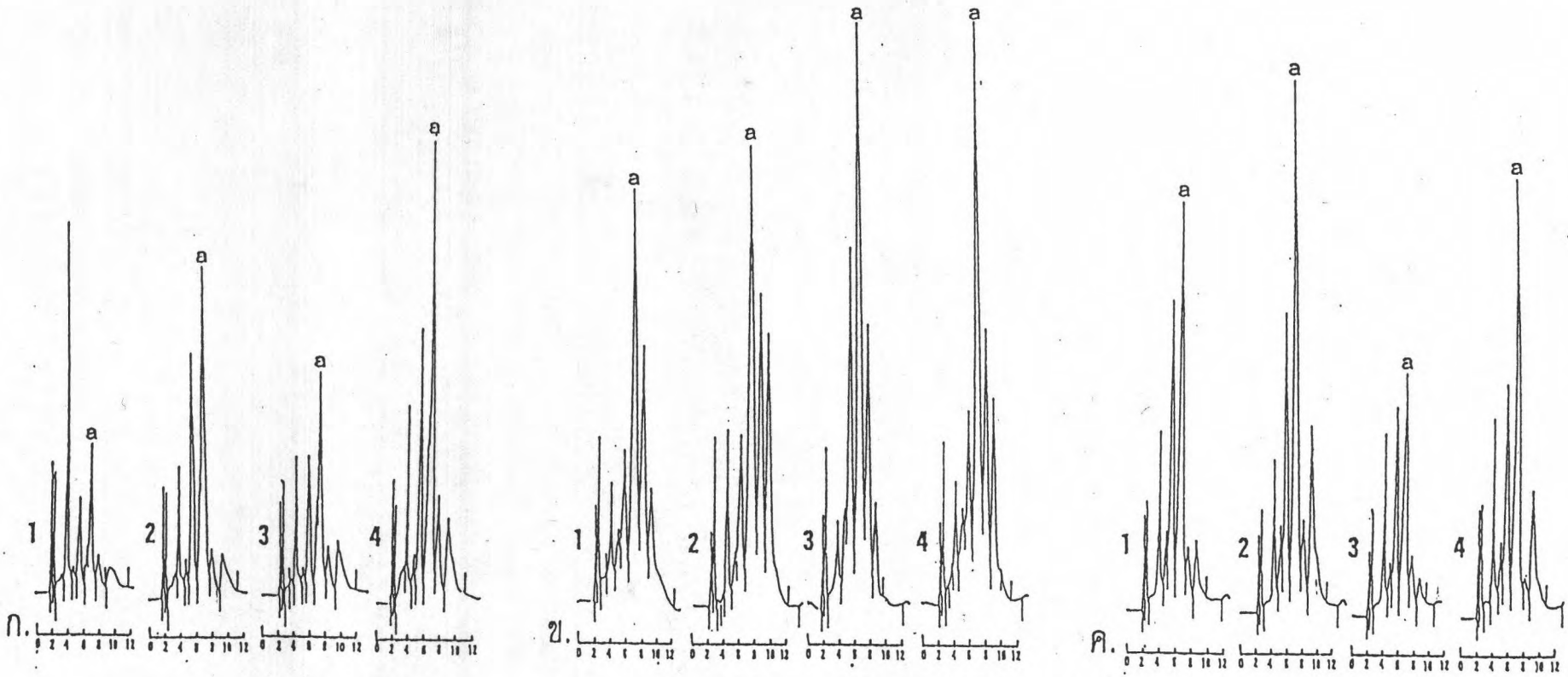


ภาพที่ 34 Co-chromatogram ของ atropine standard reference กับสารสกัด tropane alkaloid จาก hairy root R1000

ก. atropine standard reference

ข. สารสกัดแอลคาลอยด์จาก hairy root R1000

ค. co-chromatogram



ภาพที่ 35 Chromatogram ของ atropine(a) จากการวิเคราะห์หาปริมาณ ด้วยวิธี HPLC ใน hairy root A4(1) A4(2) และ A4(3) ที่เจริญในอาหารสูตร C สภาวะแสง และอายุต่างกัน

ก. hairy root A4 (1)

1) สว่าง/1 สัปดาห์ ปริมาณ atropine 0.08% DW
2) มืด /1 สัปดาห์ ปริมาณ atropine 0.20% DW
3) สว่าง/2 สัปดาห์ ปริมาณ atropine 0.12% DW
4) มืด /2 สัปดาห์ ปริมาณ atropine 0.26% DW

ข. hairy root A4 (2)

1) สว่าง/1 สัปดาห์ ปริมาณ atropine 0.32% DW
2) มืด /1 สัปดาห์ ปริมาณ atropine 0.40% DW
3) สว่าง/2 สัปดาห์ ปริมาณ atropine 0.48% DW
4) มืด /2 สัปดาห์ ปริมาณ atropine 0.49% DW

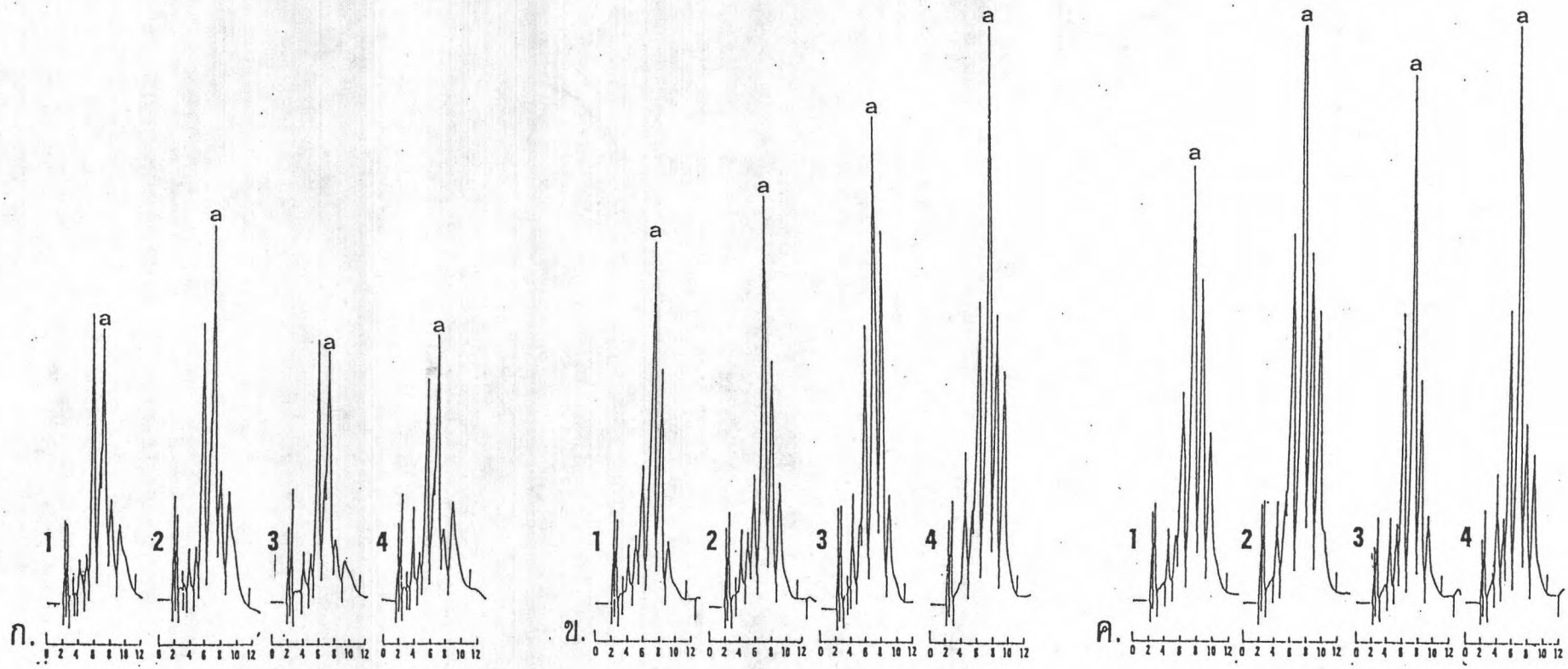
ค. hairy root A4 (3)

1) สว่าง/1 สัปดาห์ ปริมาณ atropine 0.28% DW
2) มืด /1 สัปดาห์ ปริมาณ atropine 0.37% DW
3) สว่าง/2 สัปดาห์ ปริมาณ atropine 0.16% DW
4) มืด /2 สัปดาห์ ปริมาณ atropine 0.31% DW

ตารางที่ 25 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณ atropine ด้วยวิธี HPLC ใน hairy root A4(1) A4(2) และ A4(3) ที่เจริญในอาหารสูตร C ในสภาวะแสง และอายุต่างกัน

Condition	Area under curve at absorbance 215 nm						Atropine	Atropine	Atropine (µg/20µl)					Atropine
	Area1	Area2	Area3	Mean	SD	%CV	(µg/20µl)	(%DW)	Conc1	Conc2	Conc3	Mean	SD	(%DW SD)
1 /1wk/L	1592820	1591425	1586473	1590239	3335.5	0.21	0.77	0.08	0.77	0.77	0.77	0.77	0.0017	0.0002
1 /1wk/D	3897230	4093409	4010900	4000513	98501.1	2.46	2.00	0.20	1.95	2.05	2.00	2.00	0.0502	0.0050
1 /2wks/L	2462223	2512658	2569369	2514750	53603.6	2.13	1.24	0.12	1.22	1.24	1.27	1.24	0.0273	0.0027
1 /2wks/D	5121572	5030032	5131939	5094514	56083.4	1.10	2.56	0.26	2.57	2.52	2.57	2.56	0.0286	0.0029
2 /1wk/L	6279530	6403723	6367319	6350191	63843.6	1.01	3.20	0.32	3.16	3.22	3.20	3.20	0.0325	0.0033
2 /1wk/D	7947998	7850178	8157317	7985164	156906.3	1.96	4.03	0.40	4.01	3.96	4.12	4.03	0.0799	0.0080
2 /2wks/L	9613224	9433446	9633026	9559899	109957.9	1.15	4.83	0.48	4.86	4.77	4.87	4.83	0.0560	0.0056
2 /2wks/D	9633261	9530877	9897969	9687369	189433.1	1.96	4.90	0.49	4.87	4.82	5.00	4.90	0.0965	0.0096
3 /1wk/L	5533273	5722186	5729717	5661725	111306.7	1.97	2.84	0.28	2.78	2.88	2.88	2.84	0.0567	0.0057
3 /1wk/D	7389821	7394807	7497009	7427212	60497.1	0.81	3.74	0.37	3.73	3.73	3.78	3.74	0.0308	0.0031
3 /2wks/L	3035594	3212450	3235479	3161174	109363.6	3.46	1.57	0.16	1.51	1.60	1.61	1.57	0.0557	0.0056
3 /2wks/D	6094800	6076686	6150389	6107292	38406.6	0.63	3.07	0.31	3.07	3.06	3.09	3.07	0.0196	0.0020

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 36 Chromatogram ของ atropine(a) จากการวิเคราะห์หาปริมาณ ด้วยวิธี HPLC ใน hairy rootR1000(1) R1000(2) และR1000(3)ที่เจริญในอาหารสูตร C สภาวะแสงและอายุต่างกัน

ก. hairy root R1000 (1)

1) สว่าง/1 สัปดาห์ ปริมาณ atropine 0.19% DW
2) มืด /1 สัปดาห์ ปริมาณ atropine 0.26% DW
3) สว่าง/2 สัปดาห์ ปริมาณ atropine 0.18% DW
4) มืด /2 สัปดาห์ ปริมาณ atropine 0.19% DW

ข. hairy root R1000 (2)

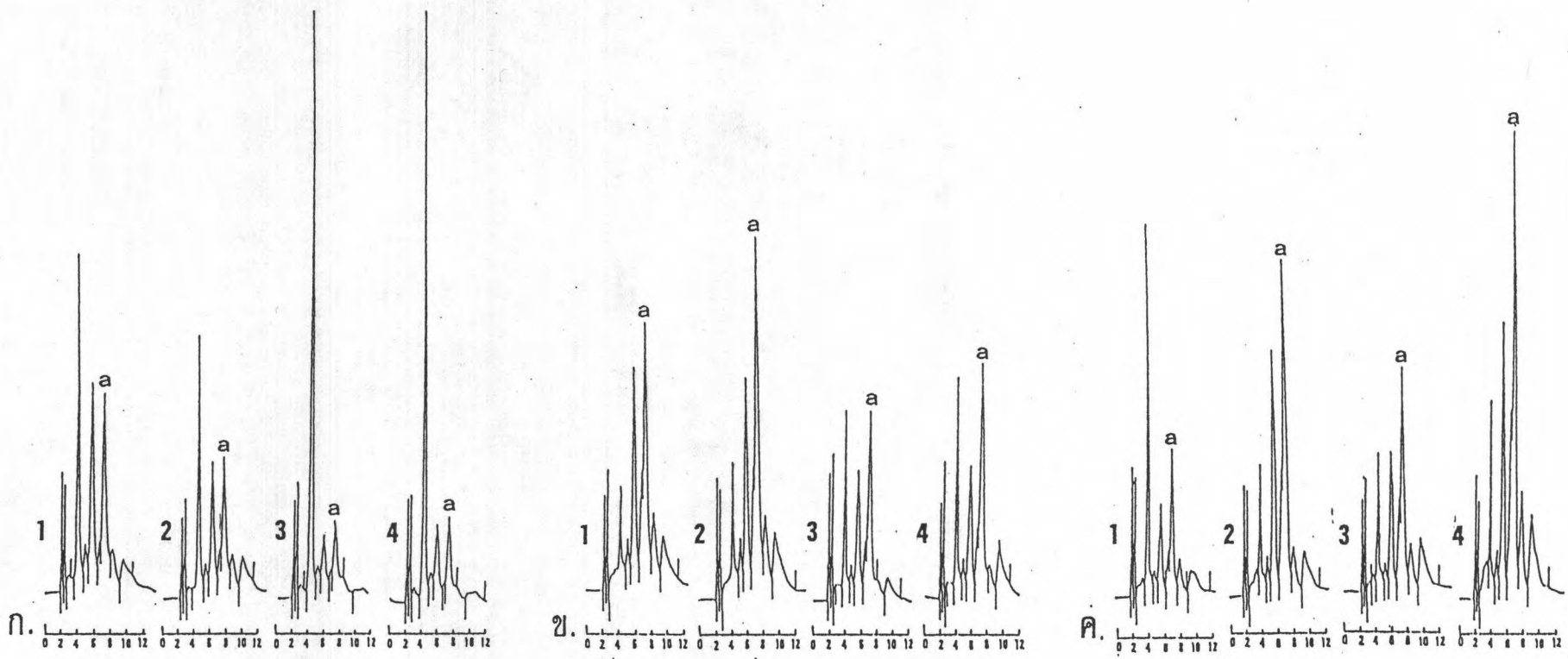
1) สว่าง/1 สัปดาห์ ปริมาณ atropine 0.28% DW
2) มืด /1 สัปดาห์ ปริมาณ atropine 0.30% DW
3) สว่าง/2 สัปดาห์ ปริมาณ atropine 0.37% DW
4) มืด /2 สัปดาห์ ปริมาณ atropine 0.42% DW

ค. hairy root R1000 (3)

1) สว่าง/1 สัปดาห์ ปริมาณ atropine 0.36% DW
2) มืด /1 สัปดาห์ ปริมาณ atropine 0.56% DW
3) สว่าง/2 สัปดาห์ ปริมาณ atropine 0.35% DW
4) มืด /2 สัปดาห์ ปริมาณ atropine 0.43% DW

ตารางที่ 26 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณ atropine ด้วยวิธี HPLC ใน hairy root R1000(1) R1000(2) และ R1000(3) ที่เจริญในอาหารสูตร C ในสภาวะแสง และอายุต่างกัน

Condition	Area under curve at absorbance 215 nm						Atropine	Atropine	Atropine (µg/20µl)					Atropine
	Area1	Area2	Area3	Mean	SD	%CV	(µg/20µl)	(%DW)	Conc1	Conc2	Conc3	Mean	SD	(%DW SD)
1 /1wk/L	3809261	3912808	3738746	3820272	87551.8	2.29	1.91	0.19	1.90	1.95	1.87	1.91	0.0446	0.0045
1 /1wk/D	5161554	5169892	5108122	5146523	33516.2	0.65	2.58	0.26	2.59	2.59	2.56	2.58	0.0171	0.0017
1 /2wks/L	3674647	3579008	3790714	3681456	106017.1	2.88	1.84	0.18	1.83	1.78	1.89	1.84	0.0540	0.0054
1 /2wks/D	3854529	3812128	3695999	3787552	82072.7	2.17	1.89	0.19	1.92	1.90	1.84	1.89	0.0418	0.0042
2 /1wk/L	5616445	5689368	5653995	5653269	36466.9	0.65	2.84	0.28	2.82	2.86	2.84	2.84	0.0186	0.0019
2 /1wk/D	5968026	5908343	5941202	5939190	29892.3	0.50	2.99	0.30	3.00	2.97	2.99	2.99	0.0152	0.0015
2 /2wks/L	7214223	7421716	7234768	7290236	114327.7	1.57	3.67	0.37	3.64	3.74	3.65	3.67	0.0502	0.0058
2 /2wks/D	8349212	8293329	8302322	8314954	30006.8	0.36	4.20	0.42	4.21	4.19	4.19	4.20	0.0153	0.0015
3 /1wk/L	7158436	7130740	7110307	7135028	24196.3	0.34	3.60	0.36	3.61	3.60	3.58	3.60	0.0123	0.0012
3 /1wk/D	11106819	11155934	11140806	11134520	25153.7	0.23	5.63	0.56	5.62	5.64	5.64	5.63	0.0128	0.0013
3 /2wks/L	6856946	6917517	6942566	6905676	44021.0	0.64	3.48	0.35	3.45	3.48	3.50	3.48	0.0224	0.0022
3 /2wks/D	8513727	8498880	8562035	8524881	33021.8	0.39	4.30	0.43	4.30	4.29	4.32	4.30	0.0168	0.0017



ภาพที่ 37 Chromatogram ของ atropine(a) จากการวิเคราะห์หาปริมาณ ด้วยวิธี HPLC ใน hairy root A4(1) ที่เจริญในอาหารสูตร A B และ C สภาวะแสง และ อายุต่างกัน

ก. อาหารสูตร A

1) สว่าง/1 สัปดาห์ ปริมาณ atropine 0.13% DW
2) มืด /1 สัปดาห์ ปริมาณ atropine 0.10% DW
3) สว่าง/2 สัปดาห์ ปริมาณ atropine 0.03% DW
4) มืด /2 สัปดาห์ ปริมาณ atropine 0.04% DW

ข. อาหารสูตร B

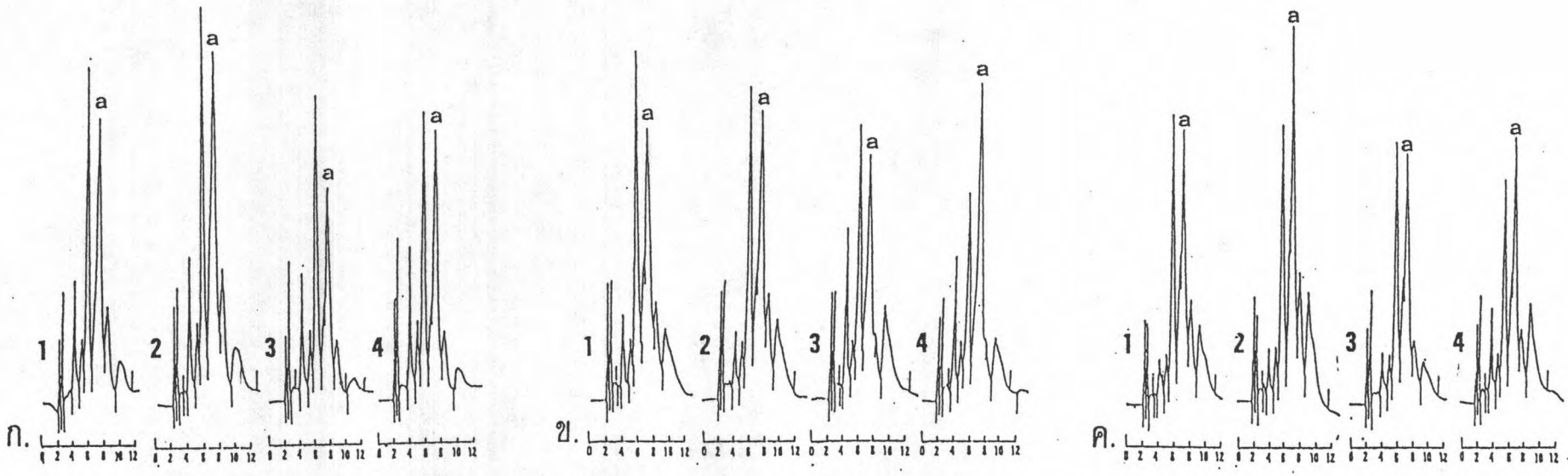
1) สว่าง/1 สัปดาห์ ปริมาณ atropine 0.18% DW
2) มืด /1 สัปดาห์ ปริมาณ atropine 0.24% DW
3) สว่าง/2 สัปดาห์ ปริมาณ atropine 0.11% DW
4) มืด /2 สัปดาห์ ปริมาณ atropine 0.15% DW

ค. อาหารสูตร C

1) สว่าง/1 สัปดาห์ ปริมาณ atropine 0.08% DW
2) มืด /1 สัปดาห์ ปริมาณ atropine 0.20% DW
3) สว่าง/2 สัปดาห์ ปริมาณ atropine 0.12% DW
4) มืด /2 สัปดาห์ ปริมาณ atropine 0.26% DW

ตารางที่ 27 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณ atropine ด้วยวิธี HPLC ใน hairy root A4(1) ที่เจริญในอาหารสูตร A B และ C ในสภาวะแสง และอายุต่างกัน

Condition	Area under curve at absorbance 215 nm						Atropine	Atropine	Atropine (µg/20µl)					Atropine
	Area1	Area2	Area3	Mean	SD	%CV	(µg/20µl)	(%DW)	Conc1	Conc2	Conc3	Mean	SD	(%DW SD)
A/1wk/L	2676358	2608137	2572822	2619106	52632.3	2.01	1.29	0.13	1.32	1.29	1.27	1.29	0.0268	0.0027
A/1wk/D	1999125	2085779	1921594	2002166	82134.7	4.10	0.98	0.10	0.98	1.02	0.94	0.98	0.0418	0.0042
A/2wks/L	686832	711136	672838	690269	19378.9	2.81	0.31	0.03	0.31	0.32	0.30	0.31	0.0099	0.0010
A/2wks/D	874511	873842	906566	884973	18703.1	2.11	0.41	0.04	0.41	0.41	0.42	0.41	0.0095	0.0010
B/1wk/L	3650935	3556586	3527057	3578193	64703.8	1.81	1.78	0.18	1.82	1.77	1.76	1.78	0.0330	0.0033
B/1wk/D	4826549	4869951	4839772	4845424	22246.2	0.46	2.43	0.24	2.42	2.44	2.43	2.43	0.0113	0.0011
B/2wks/L	2088424	2393602	2103163	2195063	172097.7	7.84	1.08	0.11	1.02	1.18	1.03	1.08	0.0877	0.0088
B/2wks/D	2987148	2945628	2984991	2972589	23373.8	0.79	1.48	0.15	1.48	1.46	1.48	1.48	0.0119	0.0012
C/1wk/L	1592820	1591425	1586473	1590239	3335.5	0.21	0.77	0.08	0.77	0.77	0.77	0.77	0.0017	0.0002
C/1wk/D	3897230	4093409	4010900	4000513	98501.1	2.46	2.00	0.20	1.95	2.05	2.00	2.00	0.0502	0.0050
C/2wks/L	2462223	2512658	2569369	2514750	53603.6	2.13	1.24	0.12	1.22	1.24	1.27	1.24	0.0273	0.0027
C/2wks/D	5121572	5030032	5131939	5094514	56083.4	1.10	2.56	0.26	2.57	2.52	2.57	2.56	0.0286	0.0029



ภาพที่ 38 Chromatogram ของ atropine(a) จากการวิเคราะห์หาปริมาณ ด้วยวิธี HPLC ใน hairy root R1000(1) ที่เจริญในอาหารสูตร A B และ C สภาวะแสงและอายุต่างกัน

ก. อาหารสูตร A

1) สว่าง/1 สัปดาห์ ปริมาณ atropine 0.27% DW
2) มืด /1 สัปดาห์ ปริมาณ atropine 0.36% DW
3) สว่าง/2 สัปดาห์ ปริมาณ atropine 0.12% DW
4) มืด /2 สัปดาห์ ปริมาณ atropine 0.21% DW

ข. อาหารสูตร B

1) สว่าง/1 สัปดาห์ ปริมาณ atropine 0.23% DW
2) มืด /1 สัปดาห์ ปริมาณ atropine 0.26% DW
3) สว่าง/2 สัปดาห์ ปริมาณ atropine 0.24% DW
4) มืด /2 สัปดาห์ ปริมาณ atropine 0.31% DW

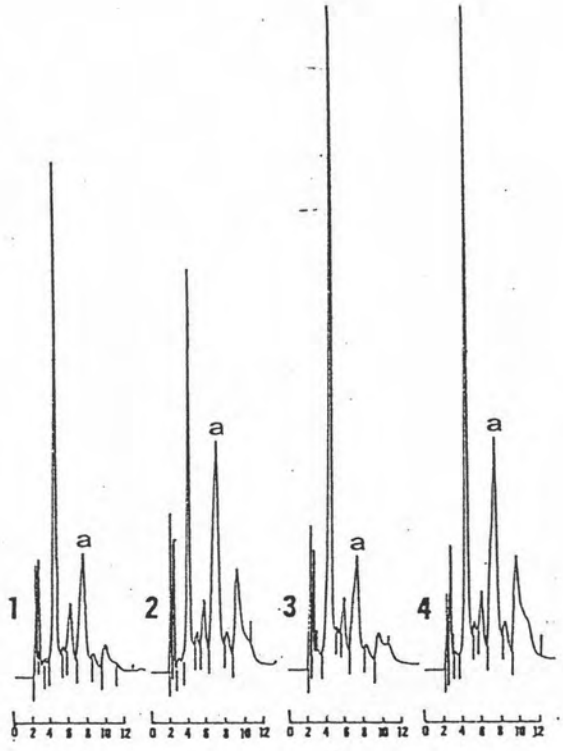
ค. อาหารสูตร C

1) สว่าง/1 สัปดาห์ ปริมาณ atropine 0.19% DW
2) มืด /1 สัปดาห์ ปริมาณ atropine 0.26% DW
3) สว่าง/2 สัปดาห์ ปริมาณ atropine 0.18% DW
4) มืด /2 สัปดาห์ ปริมาณ atropine 0.19% DW

ตารางที่ 28 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณ atropine ด้วยวิธี HPLCใน hairy root R1000(1)

ที่เจริญในอาหารสูตร A B และ C ในสภาวะแสง และอายุต่างกัน

Condition	Area under curve at absorbance 215 nm						Atropine	Atropine	Atropine (µg/20µl)					Atropine
	Area1	Area2	Area3	Mean	SD	%CV	(µg/20µl)	(%DW)	Conc1	Conc2	Conc3	Mean	SD	(%DW SD)
A/1wk/L	5219268	5497996	5279479	5332248	146665.3	2.75	2.68	0.27	2.62	2.76	2.65	2.68	0.0747	0.0075
A/1wk/D	7241076	6969834	7086432	7099114	136065.0	1.92	3.58	0.36	3.65	3.51	3.57	3.58	0.0693	0.0069
A/2wks/L	3334575	3288493	3414998	3346022	64024.6	1.91	1.67	0.17	1.66	1.64	1.70	1.67	0.0326	0.0033
A/2wks/D	4313783	4063670	4293172	4223542	138835.9	3.29	2.11	0.21	2.16	2.03	2.15	2.11	0.0707	0.0071
B/1wk/L	4553686	4642782	4801202	4665890	125365.6	2.69	2.34	0.23	2.28	2.33	2.41	2.34	0.0639	0.0064
B/1wk/D	5144633	5111910	5060588	5105710	42364.1	0.83	2.56	0.26	2.58	2.56	2.54	2.56	0.0216	0.0022
B/2wks/L	4649164	4596246	4832553	4692654	124011.3	2.64	2.35	0.24	2.33	2.30	2.42	2.35	0.0632	0.0063
B/2wks/D	6101392	6330497	6341397	6257762	135530.0	2.17	3.15	0.31	3.07	3.19	3.19	3.15	0.0690	0.0069
C/1wk/L	3809261	3912808	3738746	3820272	87551.8	2.29	1.91	0.19	1.90	1.95	1.87	1.91	0.0446	0.0045
C/1wk/D	5161554	5169892	5108122	5146523	33516.2	0.65	2.58	0.26	2.59	2.59	2.56	2.58	0.0171	0.0017
C/2wks/L	3674647	3579008	3790714	3681456	106017.1	2.88	1.84	0.18	1.83	1.78	1.89	1.84	0.0540	0.0054
C/2wks/D	3854529	3812128	3695999	3787552	82072.7	2.17	1.89	0.19	1.92	1.90	1.84	1.89	0.0418	0.0042

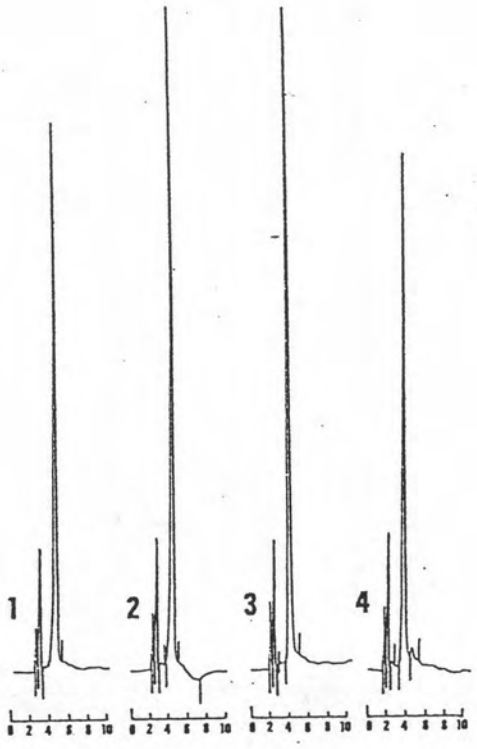


ภาพที่ 39 Chromatogram ของ atropine(a) จากการวิเคราะห์หาปริมาณ ด้วยวิธี HPLC ใน in vitro root ที่เจริญในอาหารสูตร B และ C สภาวะแสงต่างกัน อายุ 2 สัปดาห์

1) อาหารสูตร B / ที่สว่าง ปริมาณ atropine 0.07% DW
2) อาหารสูตร B / ที่มืด ปริมาณ atropine 0.16% DW
3) อาหารสูตร C / ที่สว่าง ปริมาณ atropine 0.10% DW
4) อาหารสูตร C / ที่มืด ปริมาณ atropine 0.17% DW

ตารางที่ 29 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณ atropine ด้วยวิธี HPLC ใน in vitro root ที่เจริญในอาหารสูตร B และ C ในสภาวะแสงต่างกัน อายุ 2 สัปดาห์

Condition	Area under curve at absorbance 215 nm						Atropine	Atropine	Atropine (µg/20µl)					Atropine
	Area1	Area2	Area3	Mean	SD	%CV	(µg/20µl)	(%DW)	Conc1	Conc2	Conc3	Mean	SD	%DW SD
D/2wks/L	1454740	1460861	1473697	1465766	9850.2	0.67	0.71	0.07	0.70	0.71	0.71	0.71	0.0050	0.0005
D/2wks/D	3045274	3301043	3057142	3134486	144364.3	4.61	1.56	0.16	1.51	1.64	1.52	1.56	0.0735	0.0074
C/2wks/L	2033406	2103743	2069585	2068911	35173.3	1.70	1.01	0.10	1.00	1.03	1.02	1.01	0.0179	0.0018
C/2wks/D	3368807	3377792	3375494	3374031	4667.7	0.14	1.68	0.17	1.68	1.68	1.68	1.68	0.0024	0.0002



ภาพที่ 40 Chromatogram จากการวิเคราะห์หาปริมาณ ด้วยวิธี HPLC ในแคลลัส ของ hairy root A4 ในอาหารแข็งสูตร A สภาวะแสง และอายุต่างกัน

1) สว่าง/1 สัปดาห์ ปริมาณ atropine 0 % DW

2) มืด /1 สัปดาห์ ปริมาณ atropine 0 % DW

3) สว่าง/2 สัปดาห์ ปริมาณ atropine 0 % DW

4) มืด /2 สัปดาห์ ปริมาณ atropine 0 % DW

ตารางที่ 30 ผลการวิเคราะห์ปริมาณ atropine (% DW)ใน hairy root A4(1) A4(2) และ A4(3) ที่เจริญในอาหารสูตร C ในสภาวะแสง และอายุต่างกัน

hairy root A4	อายุ 1 สัปดาห์		อายุ 2 สัปดาห์		เฉลี่ย
	สว่าง	มืด	สว่าง	มืด	
A4 (1)	0.08	0.20	0.12	0.26	0.17
A4 (2)	0.32	0.40	0.48	0.49	0.42
A4 (3)	0.28	0.37	0.16	0.31	0.28

ตารางที่ 31 ผลการวิเคราะห์ปริมาณ atropine (% DW) ใน hairy root R1000(1) R1000(2) และ R1000(3)ที่เจริญในอาหารสูตร C สภาวะแสง และอายุต่างกัน

hairy root R1000	อายุ 1 สัปดาห์		อายุ 2 สัปดาห์		เฉลี่ย
	สว่าง	มืด	สว่าง	มืด	
R1000 (1)	0.19	0.26	0.18	0.19	0.21
R1000 (2)	0.28	0.30	0.37	0.42	0.34
R1000 (3)	0.36	0.56	0.35	0.43	0.41

ผลการวิเคราะห์ปริมาณ atropine ใน hairy root R1000 (1) hairy root R1000 (2) และ hairy root R1000 (3) ซึ่งเจริญในอาหารสูตร C ในสภาวะแสงและอายุต่างกันดังตารางที่ 31 พบว่า hairy root R1000 (3) มีปริมาณ atropine สูงสุด รองลงมาคือ hairy root R1000 (2) และ hairy root R1000 (1) ตามลำดับทั้ง 4 สภาวะ โดยมีปริมาณ atropine เฉลี่ยรวมจากทั้ง 4 สภาวะ ดังนี้ hairy root R1000 (3) ปริมาณ atropine เฉลี่ย 0.41 % DW hairy root R1000 (2) ปริมาณ atropine เฉลี่ย 0.34 % DW และ hairy root R1000 (1) ปริมาณ atropine เฉลี่ย 0.21 % DW ตามลำดับ

จากผลการศึกษาดังกล่าว ทำให้ทราบว่านอกจาก hairy root ที่เกิดจาก A. rhizogenes สายพันธุ์ A4 และ R1000 จะมีปริมาณ atropine ต่างกันแล้ว ใน hairy root A4 แต่ละเบอร์ คือ A4 (1) A4 (2) และ A4 (3) และ hairy root R1000 แต่ละเบอร์คือ R1000(1) R1000(2) และ R1000(3) ซึ่งเกิดจาก explant แต่ละชิ้นก็มีปริมาณ atropine ไม่เท่ากันอีกด้วย

4.2.3.2 ผลการวิเคราะห์ปริมาณ atropine ใน hairy root ที่เจริญในสภาวะแสงต่างกัน

ผลการวิเคราะห์ปริมาณ atropine ใน hairy root A4 ที่เจริญในสภาวะแสงต่างกันในอาหารสูตร C ดังตารางที่ 32 พบว่า hairy root A4 ทั้ง 3 เบอร์ ที่เจริญในที่มืดมีปริมาณ atropine สูงกว่าที่เจริญในที่สว่างทั้ง 2 สัปดาห์ โดยมีปริมาณ atropine เฉลี่ยใน hairy root A4 (1) ที่เจริญในที่มืด 0.23 % DW ในที่สว่าง 0.10 % DW hairy root A4 (2) ที่เจริญในที่มืด 0.45 %DW ในที่สว่าง 0.40 % DW และใน hairy root A4 (3) ที่เจริญในที่มืด 0.34 %DW ในที่สว่าง 0.22 % DW

ผลการวิเคราะห์ปริมาณ atropine ใน hairy root R1000 ที่เจริญในสภาวะแสงต่างกันในอาหารสูตร C ดังในตารางที่ 33 พบว่า hairy root R1000 ทั้ง 3 เบอร์ ที่เจริญในที่มืด มีปริมาณ atropine สูงกว่าที่เจริญในที่สว่างทั้ง 2 สัปดาห์เช่นกัน โดยมีปริมาณ atropine เฉลี่ยใน hairy root R1000 (1) ที่เจริญในที่มืด 0.23 % DW ในที่สว่าง 0.19 % DW hairy root R1000 (2) ที่เจริญในที่มืด 0.36 % DW ในที่สว่าง 0.33 % DW hairy root R1000 (3) ที่เจริญในที่มืด 0.5 % DW ในที่สว่าง 0.36 % DW

ตารางที่ 32 ผลการวิเคราะห์ปริมาณ atropine (% DW) ใน hairy root A4 ที่เจริญในสภาวะสว่าง และมืด ในอาหารสูตร C อายุต่างกัน

สภาวะแสง	A4 (1)			A4 (2)			A4 (3)		
	1สัปดาห์	2สัปดาห์	เฉลี่ย	1สัปดาห์	2สัปดาห์	เฉลี่ย	1สัปดาห์	2สัปดาห์	เฉลี่ย
สว่าง	0.08	0.12	0.10	0.32	0.48	0.40	0.28	0.16	0.22
มืด	0.20	0.26	0.23	0.40	0.49	0.45	0.37	0.31	0.34

ตารางที่ 33 ผลการวิเคราะห์ปริมาณ atropine (% DW) ใน hairy root R1000 ที่เจริญในสภาวะสว่าง และมืด ในอาหารสูตร C อายุต่างกัน

สภาวะแสง	R1000 (1)			R1000 (2)			R1000 (3)		
	1สัปดาห์	2สัปดาห์	เฉลี่ย	1สัปดาห์	2สัปดาห์	เฉลี่ย	1สัปดาห์	2สัปดาห์	เฉลี่ย
สว่าง	0.19	0.18	0.19	0.28	0.37	0.33	0.36	0.35	0.36
มืด	0.26	0.19	0.23	0.30	0.42	0.36	0.56	0.43	0.50

จากผลการศึกษาดังกล่าวทำให้ทราบว่าแสงไม่มีผลต่อการสังเคราะห์ atropine ใน hairy root โดยในที่มืด hairy root สามารถสังเคราะห์ atropine ได้ดีกว่าในที่สว่างไม่ว่าจะเป็นใน hairy root เบอร์ใด และแม้ว่าจะในช่วงอายุต่างกันก็ตาม

4.2.3.3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณ atropine ใน hairy root ที่มีอายุต่างกัน

ผลการวิเคราะห์ปริมาณ atropine ใน hairy root A4 ที่มีอายุต่างกัน ในอาหารสูตร C ดังในตารางที่ 34 พบว่าใน hairy root A4 (1) และ A4 (2) ที่มีอายุ 2 สัปดาห์มีปริมาณ atropine สูงกว่าที่มีอายุ 1 สัปดาห์ทั้งในที่สว่างและที่มืด โดยมีปริมาณ atropine เฉลี่ยใน hairy root A4 (1) ที่มีอายุ 2 สัปดาห์ 0.19 % DW และที่อายุ 1 สัปดาห์ 0.14 % DW ใน hairy root A4 (2) ที่มีอายุ 2 สัปดาห์ 0.49 % DW และที่อายุ 1 สัปดาห์ 0.36 % DW ส่วนใน hairy root A4 (3) นั้นพบว่า hairy root A4 (3) ที่มีอายุ 1 สัปดาห์มีปริมาณ atropine สูงกว่าที่มีอายุ 2 สัปดาห์ ทั้งในที่สว่างและที่มืดโดยมีปริมาณ atropine เฉลี่ย 0.33 % DW และ 0.24 % DW ตามลำดับ

ผลการวิเคราะห์ปริมาณ atropine ใน hairy root R1000 ที่มีอายุต่างกันในอาหารสูตร C ดังในตารางที่ 35 พบว่าใน hairy root R1000 (1) และ R1000 (3) ที่มีอายุ 1 สัปดาห์ มีปริมาณ atropine สูงกว่าที่มีอายุ 2 สัปดาห์ ทั้งในที่สว่างและที่มืด โดยมีปริมาณ atropine เฉลี่ยใน hairy root(1) ที่มีอายุ 1 สัปดาห์ 0.23 % DW และที่มีอายุ 2 สัปดาห์ 0.19 % DW ใน hairy root R1000 (3) ที่มีอายุ 1 สัปดาห์ 0.46 % DW และที่อายุ 2 สัปดาห์ 0.39 % DW ส่วนใน hairy root R1000 (2) นั้น พบว่า hairy root R1000 (2) ที่มีอายุ 2 สัปดาห์ มีปริมาณ atropine สูงกว่าที่มีอายุ 1 สัปดาห์ทั้งในที่สว่างและที่มืด โดยมีปริมาณ atropine เฉลี่ย 0.40 % DW และ 0.29 % DW ตามลำดับ

ผลการศึกษาดังกล่าวทำให้ทราบว่า hairy root ที่มีอายุ 1 สัปดาห์ และ 2 สัปดาห์ มีปริมาณ atropine ไม่เท่ากัน โดยปริมาณ atropine ในสัปดาห์ใดจะมากกว่าสัปดาห์ใดนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของ hairy root ซึ่งในที่นี้ hairy root A4 (1) A4 (2) และ R1000 (2) ที่มีอายุ 2 สัปดาห์ มีปริมาณ atropine สูงกว่า

ตารางที่ 34 ผลการวิเคราะห์ปริมาณ atropine (% DW) ใน hairy root A4 ที่มีอายุ 1 สัปดาห์ และ 2 สัปดาห์ เจริญในอาหารสูตร C สภาวะแสงต่างกัน

อายุ	A4 (1)			A4 (2)			A4 (3)		
	สว่าง	มืด	เฉลี่ย	สว่าง	มืด	เฉลี่ย	สว่าง	มืด	เฉลี่ย
1 สัปดาห์	0.08	0.20	0.14	0.32	0.40	0.36	0.28	0.37	0.33
2 สัปดาห์	0.12	0.26	0.19	0.48	0.49	0.49	0.16	0.31	0.24

ตารางที่ 35 ผลการวิเคราะห์ปริมาณ atropine (% DW) ใน hairy root R1000 ที่มีอายุ 1 สัปดาห์ และ 2 สัปดาห์ เจริญในอาหารสูตร C สภาวะแสงต่างกัน

อายุ	R1000 (1)			R1000 (2)			R1000 (3)		
	สว่าง	มืด	เฉลี่ย	สว่าง	มืด	เฉลี่ย	สว่าง	มืด	เฉลี่ย
1 สัปดาห์	0.19	0.26	0.23	0.28	0.30	0.29	0.36	0.56	0.46
2 สัปดาห์	0.18	0.19	0.19	0.37	0.42	0.40	0.35	0.43	0.39

ที่มีอายุ 1 สัปดาห์ ส่วนใน hairy root A4 (3) R1000 (1) และ R1000 (3) ที่มีอายุ 1 สัปดาห์ มีปริมาณ atropine สูงกว่าที่มีอายุ 2 สัปดาห์ โดยให้ผลสอดคล้องกันไม่ว่าจะเลี้ยงในที่สว่าง หรือ ที่มืด

4.2.3.4 ผลการวิเคราะห์ปริมาณ atropine ใน hairy root ที่เจริญในอาหารต่างกัน

ผลการวิเคราะห์ปริมาณ atropine ใน hairy root ที่เจริญในอาหารต่างกันนี้ ได้ทำการศึกษาโดยเลือก hairy root A4 (1) และ hairy root R1000 (1) เป็นตัวแทนในการศึกษาในอาหาร 3 สูตร คือ สูตร A สูตร B และสูตร C ในสภาวะแสง และอายุต่างกันซึ่งปรากฏผลดังต่อไปนี้

ผลการวิเคราะห์ปริมาณ atropine ใน hairy root A4 (1) ที่เจริญในอาหารสูตร A B และ C ดังในตารางที่ 36 พบว่า hairy root A4 (1) ที่เจริญในอาหารสูตร A มีปริมาณ atropine ค่อนข้างน้อยเมื่อเทียบกับปริมาณ atropine ในอาหารสูตร B และสูตร C โดยเฉพาะในสัปดาห์ที่ 2 มีปริมาณ atropine ลดลงจากสัปดาห์ที่ 1 มากอย่างเห็นได้ชัดทั้งที่เจริญในที่สว่างและที่มืด โดยมีปริมาณ atropine เฉลี่ยในสูตร A จากทั้ง 4 สภาวะ เพียง 0.08 % DW ส่วนในอาหารสูตร B และ C นั้นพบว่ามีปริมาณ atropine สูงอยู่ในระดับเดียวกัน โดยเฉลี่ยจาก 4 สภาวะ คือ 0.17 % DW เท่ากัน แต่ในสูตร B ปริมาณ atropine สูงอยู่ในสัปดาห์ที่ 1 คือ 0.24 % DW เมื่อเจริญในที่มืด ส่วนในสูตร C ปริมาณ atropine สูงสุดอยู่ในสัปดาห์ที่ 2 คือ 0.26 % DW เมื่อเจริญในที่มืด

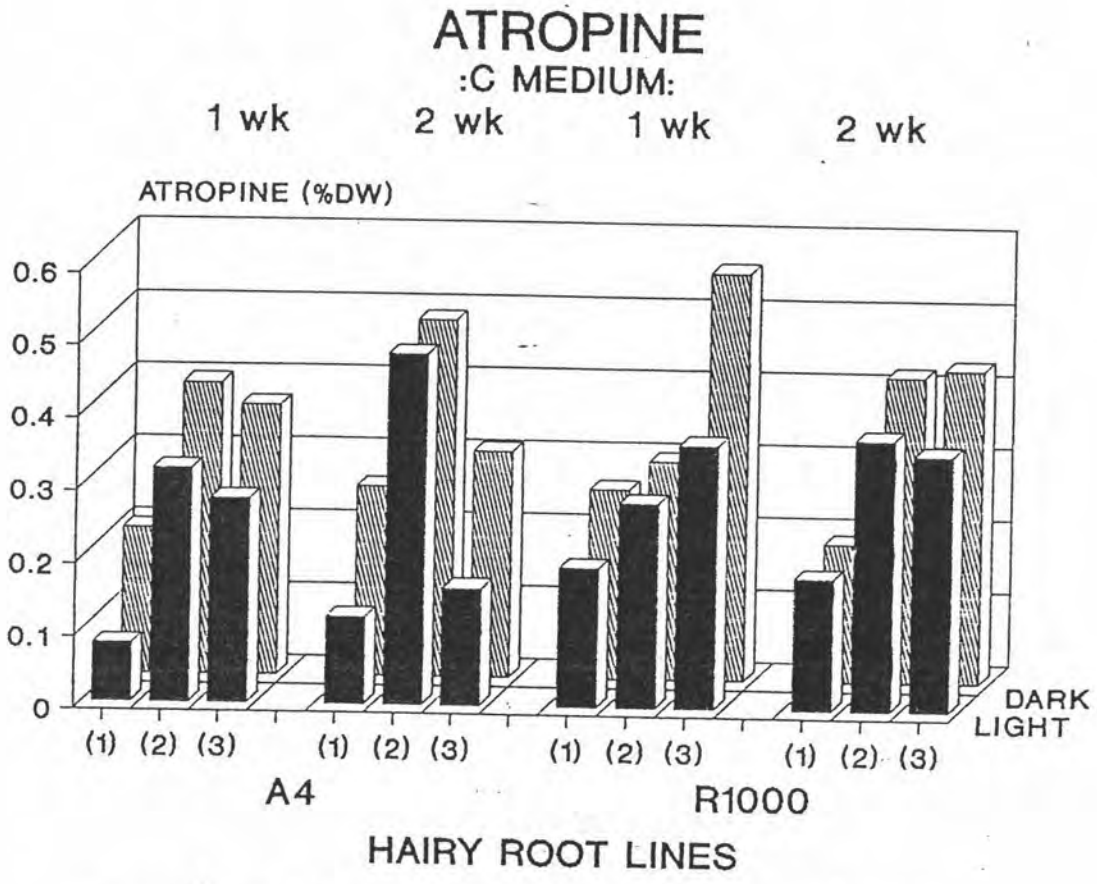
ผลการวิเคราะห์ปริมาณ atropine ใน hairy root R1000 (1) ที่เจริญในอาหารสูตร A B และ C ดังในตารางที่ 37 พบว่า hairy root R1000 (1) ที่เจริญในอาหารสูตร A และ B มีปริมาณ atropine สูงอยู่ในระดับเดียวกัน โดยมีปริมาณ atropine เฉลี่ยจาก 4 สภาวะ 0.25 % DW และ 0.26 % DW ตามลำดับ โดยในสูตร A มีปริมาณ atropine สูงสุดอยู่ในสัปดาห์ที่ 1 คือ 0.36 % DW เมื่อเจริญในที่มืด และในสูตร B มีปริมาณ atropine สูงสุดอยู่ในสัปดาห์ที่ 2 คือ 0.31 % DW เมื่อเจริญในที่มืด ส่วนในสูตร C มีปริมาณ atropine เฉลี่ยจาก 4 สภาวะ น้อยกว่าในสูตร A และ B คือ 0.21 % DW โดยมีปริมาณ atropine สูงสุดอยู่ในสัปดาห์ที่ 1 คือ 0.26 % DW เมื่อเจริญในที่มืด

ตารางที่ 36 ผลการวิเคราะห์ปริมาณ atropine (% DW) ใน hairy root A4 (1) ที่เจริญในอาหารสูตร A สูตร B และสูตร C ในสภาวะแสง และอายุต่างกัน

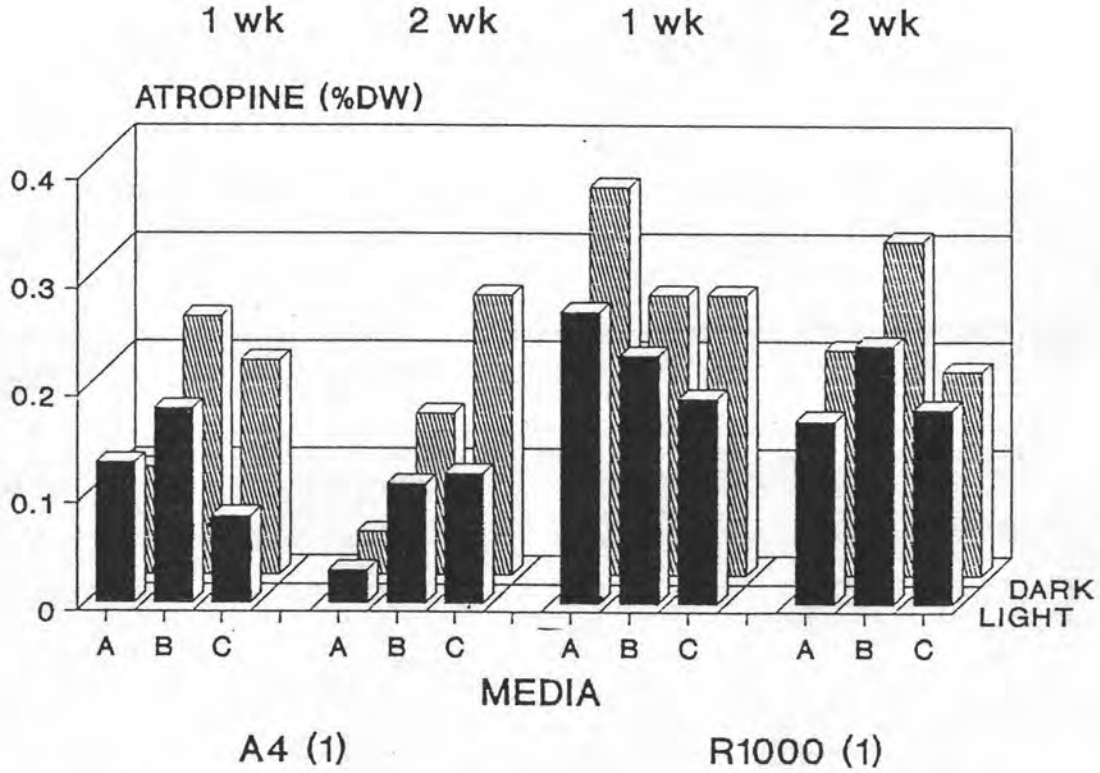
อาหาร	อายุ 1 สัปดาห์		อายุ 2 สัปดาห์		เฉลี่ย
	สว่าง	มืด	สว่าง	มืด	
สูตร A	0.13	0.10	0.03	0.04	0.08
สูตร B	0.18	0.24	0.11	0.15	0.17
สูตร C	0.08	0.20	0.12	0.26	0.17

ตารางที่ 37 ผลการวิเคราะห์ปริมาณ atropine (% DW) ใน hairy root R1000 (1) ที่เจริญในอาหารสูตร A สูตร B และสูตร C ในสภาวะแสง และอายุต่างกัน

อาหาร	อายุ 1 สัปดาห์		อายุ 2 สัปดาห์		เฉลี่ย
	สว่าง	มืด	สว่าง	มืด	
สูตร A	0.27	0.36	0.17	0.21	0.25
สูตร B	0.23	0.26	0.24	0.31	0.26
สูตร C	0.19	0.26	0.18	0.19	0.21



แผนภาพที่ 7 ปริมาณ atropine ใน hairy root เบอร์ต่างๆ



แผนภาพที่ 8 ปริมาณ atropine ใน hairy root ที่เลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ

จากผลการศึกษาดังกล่าวทำให้ทราบว่าอาหารสูตร A B และ C มีผลต่อการสังเคราะห์ปริมาณ atropine ใน hairy root A4 (1) และ R1000 (1) ไม่เท่ากัน โดยอาหารสูตร B และ C เหมาะสำหรับการเลี้ยง hairy root A4 (1) เพื่อผลิต atropine ขณะที่อาหารสูตร A และ B เหมาะแก่การเลี้ยง hairy root R1000 (1) เพื่อผลิต atropine

4.2.3.5 ผลการวิเคราะห์ปริมาณ atropineใน<u>in vitro</u> root

ผลการวิเคราะห์ปริมาณ atropineใน<u>in vitro</u> root ทำการศึกษาในอาหารสูตร B และสูตร C ในสภาวะสว่าง และมืด อายุ 2 สัปดาห์ซึ่งแสดงการเปรียบเทียบกับปริมาณ atropine ใน hairy root ในอาหาร สภาวะแสง และอายุเดียวกันกับ <u>in vitro</u> rootไว้ดังตารางที่ 38 และ 39

ผลการเปรียบเทียบปริมาณ atropine ใน <u>in vitro</u> root และ hairy root ที่เจริญในอาหารสูตร C ในสภาวะสว่าง และมืด อายุ 2 สัปดาห์ ดังตารางที่ 38 พบว่าปริมาณ atropine ใน <u>in vitro</u> root ที่เจริญในที่มืด สูงกว่าในที่สว่าง เช่นเดียวกับใน hairy root โดยมีปริมาณ atropine ในที่มืด 0.17 % DW ซึ่งน้อยกว่าปริมาณ atropine ในที่มืดของ hairy root ทั้ง 6 เบอร์ ตั้งแต่ 1-3 เท่าโดยประมาณ ส่วนในที่สว่างมีปริมาณ atropine 0.10 % DW ซึ่งน้อยกว่าปริมาณ atropine ในที่สว่างของ hairy root 5 เบอร์ (ยกเว้น hairy root A4 (1)) ตั้งแต่ 2-5 เท่าโดยประมาณ

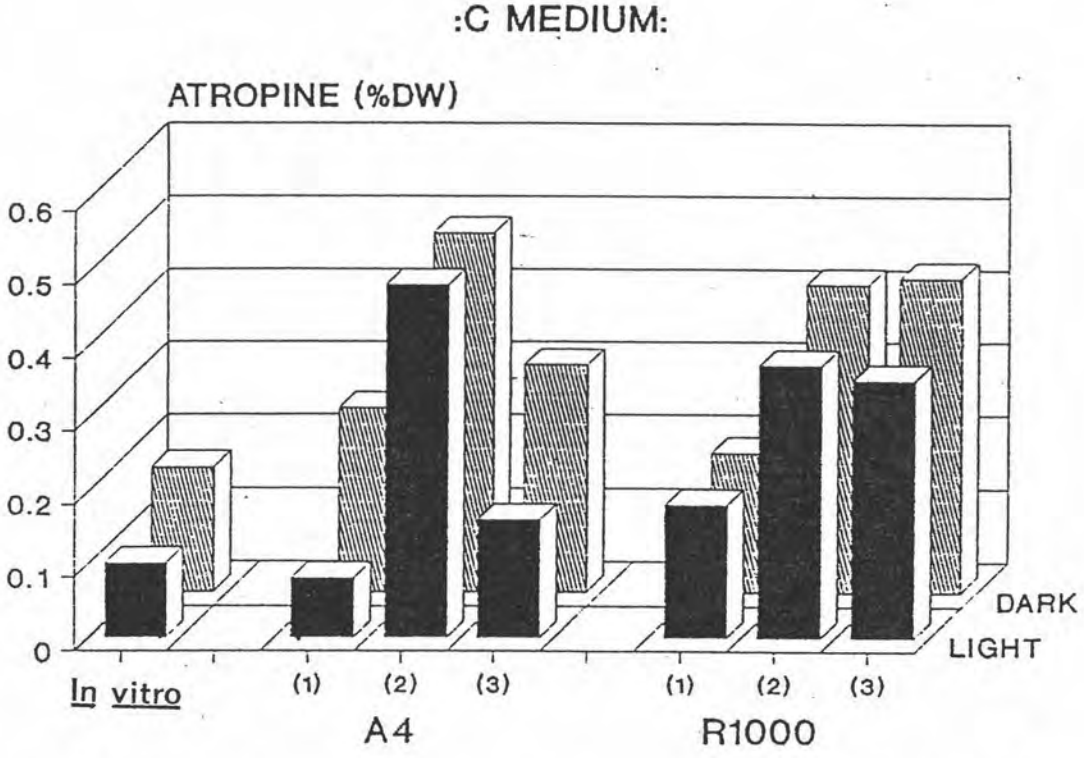
ผลการเปรียบเทียบปริมาณ atropine ใน <u>in vitro</u> root และ hairy root ที่เจริญในอาหารสูตร B ในสภาวะสว่างและมืด อายุ 2 สัปดาห์ ดังตารางที่ 39 ซึ่งมี hairy root ที่เป็นตัวเปรียบเทียบ 2 เบอร์ คือ A4 (1) และ R1000 (1) นั้นพบว่าปริมาณ atropine ใน<u>in vitro</u> rootที่เจริญในที่มืดสูงกว่าในที่สว่าง เช่นเดียวกับใน hairy root โดยมีปริมาณ atropine ในที่มืด 0.16 % DW ซึ่งน้อยกว่าปริมาณ atropine ใน hairy root R1000 (1) ประมาณ 2 เท่า ขณะที่มีปริมาณใกล้เคียงกันกับ hairy root A4 (1) ส่วนในที่สว่างมีประมาณ atropine 0.07 % DWซึ่งน้อยกว่าปริมาณ atropine ในที่สว่างของ hairy root ทั้ง 2 เบอร์ 1.5 และ 4.5 เท่าโดยประมาณ

ตารางที่ 38 ผลการวิเคราะห์ปริมาณ atropine (% DW) ใน in vitro root และ hairy root ที่เจริญในอาหารสูตร C สภาวะแสงต่างกัน ที่อายุ 2 สัปดาห์

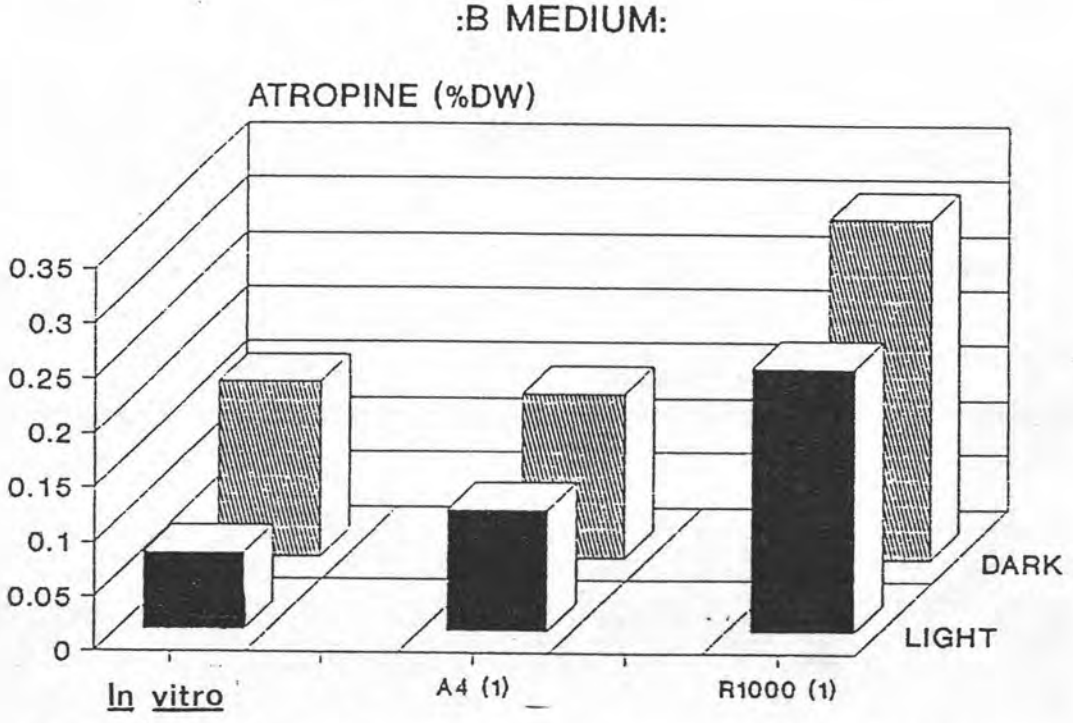
ชนิดราก / แสง	in vitro root	A4 (1)	A4 (2)	A4 (3)	R1000 (1)	R1000 (2)	R1000 (3)
สว่าง	0.10	0.08	0.48	0.16	0.18	0.37	0.35
มืด	0.17	0.25	0.49	0.31	0.19	0.42	0.43

ตารางที่ 39 ผลการวิเคราะห์ปริมาณ atropine (% DW) ใน in vitro root และ hairy root ที่เจริญในอาหารสูตร B สภาวะแสงต่างกัน ที่อายุ 2 สัปดาห์

ชนิดราก / แสง	in vitro root	A4 (1)	R1000 (1)
สว่าง	0.07	0.11	0.24
มืด	0.16	0.15	0.31



แผนภาพที่ 9 ปริมาณ atropine ใน in vitro root เทียบกับ hairy root ในอาหารเหลวสูตร C



แผนภาพที่ 10 ปริมาณ atropine ใน in vitro root เทียบกับ hairy root ในอาหารเหลวสูตร B

จากผลการศึกษาดังกล่าวเห็นได้ว่า ปริมาณของ atropine ใน in vitro root ที่ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อนี้ มีปริมาณค่อนข้างน้อยเมื่อเทียบกับใน hairy root และสูตรอาหารที่ต่างกันคือสูตร B และสูตร C ไม่ได้มีผลต่อการสังเคราะห์ปริมาณ atropine ใน in vitro root ให้มากขึ้นหรือน้อยลงแต่อย่างใด ซึ่งต่างจากใน hairy root

4.2.3.6 ผลการวิเคราะห์ปริมาณ atropine ในแคลลัส

ผลการวิเคราะห์ปริมาณ atropine ในแคลลัสศึกษาในแคลลัสที่เกิดจาก hairy root A4(1) ซึ่งเจริญในอาหารแข็งสูตร A สภาวะสว่างและมืด อายุ 1 และ 2 สัปดาห์ ดังแสดงในภาพที่ 16 ซึ่งไม่สามารถตรวจพบ atropine ทั้ง 4 ตัวอย่าง การศึกษานี้ทำให้ทราบว่าการสังเคราะห์ atropine ใน Datura metel L. เกิดได้ไม่ดีใน unorganized tissue