บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

3.1 สถานที่เก็บตัวอย่าง

3.1.1 ดอยอ่างขาง อ.ฝาง จ.เชียงใหม่

- ระดับความสูงพื้นที่ประมาณ 1100-1300 เมตรจากระดับน้ำทะเล
- *Litsea cubeba* var. *cubeba* (AKC1, AKC2, AKC3)
- *Litsea cubeba* var. *formosana* (AKF1, AKF2, AKF3)

3.1.2 ดอยผากลอง อ.แม่ริม จ.เชียงใหม่

- ระดับความสูงพื้นที่ประมาณ 800-900 เมตรจากระดับน้ำทะเล
- *Litsea cubeba* var. *formosana* (MSF1, MSF2, MSF3)

3.1.3 ดอยอินทนนท์ อ.แม่วาง จ.เชียงใหม่

- ระดับความสูงพื้นที่ประมาณ 1500-1800 เมตรจากระดับน้ำทะเล
- *Litsea cubeba* var. *cubeba* (INC1, INC2, INC3)

3.2 อุปกรณ์และสารเคมี

3.2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยา

1) เครื่องวัดสี
2) Vernier scales

3.2.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดสอบกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ

1) Spectrophotometer
2) Cuvette แก้วและพลาสติก
3) หลอดทดลอง
4) บีกเกอร์ขนาด 50 100 และ 200 มิลลิลิตร
5) Erlenmyer flask ขนาด 100 และ 200 มิลลิลิตร
6) กระบอกตวง ขนาด 100 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

7) Pipette ขนาด 1.0, 5.0 และ 10.0 มิลลิลิตร

8) Micropipette และ pipette tip

9) ขวดแก้ว scott duran ขนาด 500 มิลลิลิตร

10) ขวดสีชา ขนาด 100 มิลลิลิตร

11) Magnetic stirrer

12) อุปกรณ์ให้ออกซิเจนในตู้เลี้ยงปลา

13) เครื่องชั่ง

14) กระดาษฟอยล์

15) กระดาษกรอง whatman no.1

3.2.3 สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ

1) 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

2) β-carotene

3) Linoleic acid solution

4) α-tocopherol

5) Ascorbic acid

6) Tween 80

7) Chloroform

8) Methanol

3.2.4 อุปกรณ์ที่ใช้ในการกลั่นน้ำมันหอมระเหย

1) Round bottom flask ขนาด 1000 มิลลิลิตร

2) Condenser

3) Clevenger apparatus

4) Heating mantle

5) ขาตั้ง

6) สายยาง

7) Dropper

8) Vial สีชา

9) เครื่องชั่ง

10) ปั๊มน้ำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.5 อุปกรณ์ในการวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหย

1) GC 6890 Agilent Technology

- Inlet : 250 °C

  0.2 μL split ratio 200 : 1

- Oven : 50 °C -- -- 6 °C/min ---> 230 °C (10 min)
- Carrier : Helium (10 ml/min)
- Column : HP-5MS (30 m x 0.25 mm ID x 0.25 μm film thickness)

2) MSD 5973 (EI) Hewlett Packard

- MS quadrupole : 150 °C
- MS source : 230 °C

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การศึกษาด้านสัณฐานวิทยา

1) ศึกษาตัวอย่างตะไคร้ต้นที่ขึ้นเองตามธรรมชาติในพื้นที่ต่างๆ ในจังหวัดเชียงใหม่ ได้แก่ ดอยอ่างขาง ดอยผากลอง และดอยอินทนนท์ โดยสุ่มตัวอย่างพื้นที่ละ 3 ต้นต่อสายพันธุ์ ได้แก่

1.1) ดอยอ่างขาง - AKF1 (*Litsea cubeba* var. *formosana*)
- AKF2 (*Litsea cubeba* var. *formosana*)
- AKF3 (*Litsea cubeba* var. *formosana*)
- AKC1 (*Litsea cubeba* var. *cubeba*)
- AKC2 (*Litsea cubeba* var. *cubeba*)
- AKC3 (*Litsea cubeba* var. *cubeba*)

1.2) ดอยผากลอง - MSF1 (*Litsea cubeba* var. *formosana*)
- MSF2 (*Litsea cubeba* var. *formosana*)
- MSF3 (*Litsea cubeba* var. *formosana*)

1.3) ดอยอินทนนท์ - INC1 (*Litsea cubeba* var. *cubeba*)
- INC2 (*Litsea cubeba* var. *cubeba*)
- INC3 (*Litsea cubeba* var. *cubeba*)

เก็บตัวอย่างส่วนใบ กิ่งที่ติดผล ผล และผลแก่ ส่วนละประมาณ 1 กิโลกรัม โดยช่วงเวลาที่เก็บตัวอย่างในการทดลองนี้อยู่ในช่วงเดือนสิงหาคม ปี พ.ศ. 2549

2) บันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันระหว่างสายพันธุ์ ได้แก่

2.1) ขนาด รูปร่าง สี และลักษณะอื่นๆ ที่เด่นชัดของใบที่เจริญเต็มที่
- ขนาด : วัดและบันทึกความกว้าง ความยาว และความหนา
- รูปร่าง : บันทึกรูปร่างตามหลักการทางอนุกรมวิธาน
- สี : วัดและบันทึกสีตามระบบ L*a*b*

2.2) ขนาด สี และลักษณะอื่นๆ ที่เด่นชัดของผลอ่อนและผลแก่
- ขนาด : วัดและบันทึกความยาว เส้นผ่าศูนย์กลางของทั้งผลและเมล็ด
- สี : วัดและบันทึกสีตามระบบ L*a*b*

2.3) ขนาด รูปร่าง สี และลักษณะอื่นๆ ที่เด่นชัดของกิ่งที่ติดผล
- ขนาด : วัดและบันทึกเส้นผ่าศูนย์กลางและความหนาเปลือกของกิ่ง
- สี : วัดและบันทึกสีตามระบบ L*a*b*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3) บันทึกข้อมูลอื่นๆ ของตะไคร้ต้นตัวอย่างทั้ง 12 ต้น ได้แก่ เส้นผ่าศูนย์กลางลำต้น ความสูง และระดับความสูง

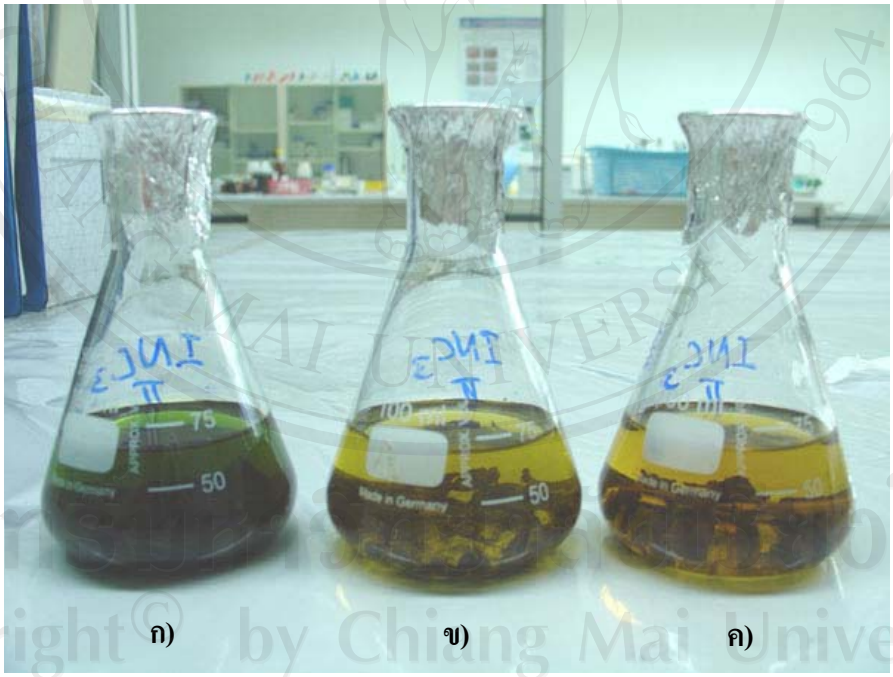
3.3.2 การศึกษากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ

3.3.2.1 การเตรียมตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์

1) ชั่งตัวอย่าง ใบ ลำต้น ผล และผลแก่ของตะไคร้ต้นแต่ละต้น ตัวอย่างละ 4.0 กรัม สับให้ละเอียด แล้วใส่ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 100 มิลลิลิตร

2) เติมสารละลายเมธานอล 80% ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ลงไป ปิดปาก Erlenmeyer flask ด้วยกระดาษฟอยล์ แล้วแช่ทิ้งไว้เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง

3) กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman no.1 เก็บเฉพาะส่วนของสารสกัด (tincture) ไว้ในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อทำการทดลองต่อไป



ก) ข) ค)

ภาพที่ 12 สารสกัดจาก (ก) ใบ (ข) กิ่ง และ (ค) ผลของตะไคร้ต้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3.2.2 การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโดยวิธี DPPH

1) การเตรียม reagent

1.1) เตรียมสารละลาย DPPH เข้มข้น 0.025 กรัม/ลิตร เพื่อใช้เป็น stock solution เข้มข้น 10 เท่า โดยวิธีการดังต่อไปนี้

1.1.1) ชั่งสาร DPPH 0.010 กรัม ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมสารละลายเมธานอล 80% ลงไปและคนด้วยแท่งแก้วคนสารจนกว่าสาร DPPH จะละลายทั้งหมด

1.1.2) เทสารละลายในบีกเกอร์ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 200 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยสารละลายเมธานอล 80% ให้ได้ 200 มิลลิลิตร เก็บสารละลายดังกล่าวไว้ในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.2) เตรียมสารละลาย DPPH สำหรับใช้ในการทดลอง โดยปิเปต stock solution ของสารละลาย DPPH เข้มข้น 0.025 กรัม/ลิตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงในขวดแก้ว Scott Duran ขนาด 500 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายเมธานอล 80% ลงไป 450 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้สารละลาย DPPH เข้มข้น 0.0025 กรัม/ลิตร

2) การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

2.1) เตรียมสารละลาย α-tocopherol ที่ความเข้มข้นต่างๆ (0-600 ไมโครโมลาร์) เพื่อใช้เป็นสารละลายมาตรฐาน ดังวิธีการต่อไปนี้

2.1.1) เตรียมสารละลาย α-tocopherol เข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ โดยชั่งสาร α-tocopherol 0.025 กรัม ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมสารละลายเมธานอล 80% ลงไปและคนด้วยแท่งแก้วคนสารจนกว่าสารจะละลายหมด

2.1.2) เทสารละลายดังกล่าวลงใน Erlenmyer flask ขนาด 100 มิลลิลิตร และเติมสารละลายเมธานอล 80 % เพื่อปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

2.1.3) เจือจางสารละลาย α-tocopherol เข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ ในหลอดทดลอง เพื่อให้ได้สารละลาย α-tocopherol ที่ความเข้มข้น 0-600 ไมโครโมลาร์ โดยใช้อัตราส่วนปริมาตรของสารละลาย α-tocopherol เข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ ต่อสารละลายเมธานอล 80% ดังตารางที่ 3

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 3 อัตราส่วนปริมาตรในการเตรียมสารละลาย α-tocopherol เข้มข้น 0-600 ไมโครโมลาร์

ความเข้มข้น (μM)	α-tocopherol 1 mM (ml)	เมธานอล 80% (ml)
0	0	0.40
100	0.04	0.36
200	0.08	0.32
300	0.12	0.28
400	0.16	0.24
500	0.20	0.20
600	0.24	0.16

2.2) เตรียมสารละลาย ascorbic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ (0-600 ไมโครโมลาร์) เพื่อใช้เป็นสารละลายมาตรฐาน ดังวิธีการต่อไปนี้

2.2.1) เตรียมสารละลาย ascorbic acid เข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ โดยชั่งสาร ascorbic acid 0.017 กรัม ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นลงไปและคนด้วยแท่งแก้วคนสารจนกว่าสารจะละลายหมด

2.2.2) เทสารละลายดังกล่าวลงใน erlenmyer flask ขนาด 100 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

2.2.3) เจือจางสารละลาย ascorbic acid เข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ ในหลอดทดลองเพื่อให้ได้สารละลาย ascorbic acid ที่ความเข้มข้น 0-600 ไมโครโมลาร์ ใช้อัตราส่วนปริมาตรของสารละลาย ascorbic acid เข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ ต่อน้ำกลั่น ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 อัตราส่วนปริมาตรในการเตรียมสารละลาย ascorbic acid เข้มข้น 0-600 ไมโครโมลาร์

ความเข้มข้น (μM)	ascorbic acid 1 mM (ml)	น้ำกลั่น (ml)
0	0	0.40
100	0.04	0.36
200	0.08	0.32
300	0.12	0.28
400	0.16	0.24
500	0.20	0.20
600	0.24	0.16

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3) การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระของสารละลายมาตรฐาน

3.1) เมื่อเตรียมสารละลาย α-tocopherol และ ascorbic acid ตามตารางที่ 1 และตารางที่ 2 แล้วจะได้สารละลายในหลอดทดลองหลอดละ 4.0 มิลลิลิตร

3.2) ปิเปตสารละลาย DPPH ปริมาตร 12 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ (0-600 μM) จนครบทุกหลอด

3.3) เขย่าหลอดทดลอง แล้วทิ้งไว้ให้สารละลายมาตรฐานทำปฏิกิริยากับสารละลาย DPPH ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที

3.4) นำสารละลายมาตรฐานที่ผ่านการทำปฏิกิริยาไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายเมธานอล 80% เป็น blank โดยการทดลองนี้ทำทั้งหมด 3 ซ้ำในแต่ละความเข้มข้น โดยในการวัดค่าการดูดกลืนแสงของแต่ละซ้ำจะวัดทั้งหมด 4 ครั้ง แล้วนำไปหาค่าเฉลี่ย

3.5) บันทึกผลการทดลอง แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณค่า percent radical scavenging activity (%RSA) จากสูตรดังต่อไปนี้

$$\%RSA = \left[\frac{\text{sample ABS - control ABS}}{\text{control ABS}}\right] \times 100$$

โดย sample ABS คือค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ และ control ABS คือค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0 มิลลิโมลาร์

3.6) บันทึกค่า percent radical scavenging activity ของสารละลายมาตรฐานทั้ง 2 ชนิด เพื่อใช้เปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโดยวิธี DPPH

4) การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด

4.1) เตรียมสารละลายชุด blank ของตัวอย่าง โดยปิเปตสารสกัดของแต่ละตัวอย่างปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง แล้วเติมสารละลายเมธานอล 80% ปริมาตร 12 มิลลิลิตร

4.2) เตรียมสารละลายชุดทดลอง โดยปิเปตสารสกัดของแต่ละตัวอย่างปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลาย DPPH เข้มข้น 0.0025 มิลลิกรัม/ลิตร ปริมาตร 12 มิลลิลิตร

4.3) สารละลายชุดควบคุม ใช้สารละลายเมธานอล 80% ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร แทนสารสกัดและเติมสารละลาย DPPH เข้มข้น 0.0025 มิลลิกรัม/ลิตร ปริมาตร 12 มิลลิลิตร

4.4) ปล่อยให้สารสกัดในชุดทดลองและชุดควบคุมทำปฏิกิริยากับสารละลาย DPPH ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที

4.5) ตั้งค่า blank ของเครื่อง spectrophotometer ด้วยสารละลายเมธานอล 80% และวัดค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุมที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร บันทึกข้อมูล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.6) วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายชุดทดลองที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยก่อนวัดค่าดังกล่าวในแต่ละตัวอย่าง ให้ตั้งค่า blank ใหม่ด้วยชุด blank ของตัวอย่างเดียวกันก่อนเสมอ เพื่อไม่ให้ค่าที่ได้คลาดเคลื่อนเนื่องจากการรบกวนโดยสีของสารสกัด

4.7) คำนวณหาค่า percent radical scavenging activity เช่นเดียวกับการทดลองในส่วนของสารละลายมาตรฐาน โดยแทนค่า sample ABS ด้วยค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายในชุดทดลอง และแทนค่า control ABS ด้วยค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม

4.8) นำผลการทดลองที่ได้ไปคำนวณหาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยใช้โปรแกรม SPSS for windows standard version release 11.0.0

4.9) การทดลองนี้จะทำตัวอย่างละ 3 ซ้ำ โดยแต่ละซ้ำจะวัดค่าการดูดกลืนแสงทั้งหมด 4 ครั้ง แล้วนำไปหาค่าเฉลี่ย รวมทั้งชุดควบคุมและชุด blank ของตัวอย่างด้วย

3.3.2.3 การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโดยวิธี BCB

1) การเตรียม reagent

1.1) เตรียมสารละลาย β-carotene ในคลอโรฟอร์มเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/10 มิลลิลิตร โดยชั่งสาร β-carotene 0.010 กรัม แล้วเติมคลอโรฟอร์มลงไป 100 มิลลิลิตร เก็บสารละลายดังกล่าวไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ทดลองต่อไป

1.2) เพิ่มให้ออกซิเจนแก่น้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยใช้อุปกรณ์ให้ออกซิเจนในตู้เลี้ยงปลา

1.3) ปิเปตสารละลาย β-carotene ในคลอโรฟอร์มปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง และเติมสารละลาย linoleic acid ปริมาตร 0.02 มิลลิลิตร และ tween 80 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เขย่าให้สารละลายเข้ากันเป็นเนื้อเดียว

1.4) นำสารละลายดังกล่าวไประเหยคลอโรฟอร์มออกด้วย water bath ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนกว่าสารละลายจะแห้ง

1.5) เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการให้ออกซิเจนแล้วเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ลงไป จากนั้นใช้ magnetic stirrer ปั่นสารละลายให้เข้ากันเป็นเนื้อเดียว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2) การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

2.1) เตรียมสารละลาย α- tocopherol และ ascorbic acid ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ โดยวิธีการเช่นเดียวกับการเตรียมสารละลายมาตรฐานในการทดลองด้วยวิธี DPPH

2.2) เจือจางสารละลาย α- tocopherol เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ด้วยสารละลายเมธานอล 80% และเจือจางสารละลาย ascorbic acid 1 มิลลิโมลาร์ ด้วยน้ำกลั่น เพื่อให้ได้สารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0-600 ไมโครโมลาร์ โดยใช้อัตราส่วนปริมาตรดังตารางที่ 5 และตารางที่ 6

ตารางที่ 5 อัตราส่วนปริมาตรในการเตรียมสารละลาย α- tocopherol เข้มข้น 0-600 ไมโครโมลาร์

ความเข้มข้น (μM)	α- tocopherol 1 mM (ml)	เมธานอล 80% (ml)
0	0	0.2
100	0.02	0.18
200	0.04	0.16
300	0.06	0.14
400	0.08	0.12
500	0.10	0.10
600	0.12	0.08

ตารางที่ 6 อัตราส่วนปริมาตรในการเตรียมสารละลาย ascorbic acid เข้มข้น 0-600 ไมโครโมลาร์

ความเข้มข้น (μM)	ascorbic acid 1 mM (ml)	น้ำกลั่น (ml)
0	0	0.20
100	0.02	0.18
200	0.04	0.16
300	0.06	0.14
400	0.08	0.12
500	0.10	0.10
600	0.12	0.08

3) การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระของสารละลายมาตรฐาน

3.1) เมื่อเตรียมสารละลาย α- tocopherol และสารละลาย ascorbic acid ตามตารางที่ 5 และตารางที่ 6 แล้ว จะได้สารละลายในหลอดทดลองหลอดละ 0.2 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2) เติมสารละลาย β-carotene-linoleic acid ที่เตรียมไว้ ปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองทุกหลอด เขย่าให้เข้ากัน และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร ทันที เพื่อบันทึกค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้น (initial absorbance)

3.3) ปล่อยให้สารทำปฏิกิริยาและเขย่าหลอดทดลองเป็นระยะเพื่อไม่ให้สารตกตะกอน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร ทุก 15 นาที จนกว่าจะครบ 120 นาที บันทึกค่าการดูดกลืนแสงสุดท้าย (final absorbance)

3.4) นำผลการทดลองที่ได้มาคำนวณหาค่า degradation rate (D) จากสูตรดังนี้

$$D = \ln \left[\frac{\text{initial ABS - final ABS}}{\text{เวลา}} \right]$$

3.5) นำค่า degradation rate มาคำนวณหาค่า % antioxidant activity (%AA) จากสูตรดังนี้

$$\%AA = \left[\frac{\text{D sample – D control}}{\text{D control}} \right] \text{ x } 100$$

โดยค่า D sample คือค่า degradation rate ของสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ และค่า D control คือค่า degradation rate ของสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0 มิลลิโมลาร์

3.6) นำค่า % antioxidant activity ของสารละลาย α- tocopherol และสารละลาย ascorbic acid ไปทำกราฟมาตรฐาน (standard curve) ของสารละลายมาตรฐาน เพื่อใช้เปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโดยวิธี β-carotene bleaching assay

3.7) การทดลองนี้จะทำตัวอย่างละ 3 ซ้ำ โดยแต่ละซ้ำจะวัดค่าการดูดกลืนแสงทั้งหมด 4 ครั้ง แล้วนำไปหาค่าเฉลี่ย

4) การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด

4.1) เตรียมสารละลายชุด blank ของตัวอย่าง โดยปิเปตสารสกัดของแต่ละตัวอย่าง ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง แล้วเติมคลอโรฟอร์มปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร

4.2) วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายชุด blank ที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร โดยใช้คลอโรฟอร์มเป็น blank บันทึกผลการทดลอง

4.3) เตรียมสารละลายชุดทดลอง โดยปิเปตสารสกัดของแต่ละตัวอย่างปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลาย β-carotene-linoleic acid ปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร

4.4) สารละลายชุดควบคุม ใช้สารละลายเมธานอล 80% ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร แทนสารสกัด และเติมสารละลาย β-carotene-linoleic acid ปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.4) วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายชุดทดลองและชุดควบคุมที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร ทันที เพื่อบันทึกค่าการดูดกลืนแสงเบื้องต้น (initial absorbance) โดยใช้คลอโรฟอร์มเป็น blank

4.5) ปล่อยให้สารทำปฏิกิริยาและเขย่าหลอดทดลองเป็นระยะเพื่อไม่ให้สารตกตะกอน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร ทุก 15 นาที จนกว่าจะครบ 120 นาที บันทึกค่าการดูดกลืนแสงสุดท้าย (final absorbance)

4.6) คำนวณหาค่าการดูดกลืนแสงที่แท้จริงของสารละลายชุดทดลอง โดยนำค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายชุด blank มาหักออกจากทั้งค่าการดูดกลืนแสงเบื้องต้นและค่าการดูดกลืนแสงสุดท้าย

4.7) คำนวณหาค่า degradation rate และค่า % antioxidant activity เช่นเดียวกับการทดลองในส่วนของสารละลายมาตรฐาน โดยแทนค่า D sample ด้วยค่า degradation rate ของสารละลายชุดทดลอง และแทนค่า D control ด้วยค่า degradation rate ของสารละลายชุดควบคุม

4.8) นำผลการทดลองที่ได้ไปคำนวณทางสถิติ โดยใช้โปรแกรม SPSS for windows standard version release 11.0.0

4.9) การทดลองนี้จะทำตัวอย่างละ 3 ซ้ำ โดยแต่ละซ้ำจะวัดค่าการดูดกลืนแสงทั้งหมด 4 ครั้ง แล้วนำไปหาค่าเฉลี่ย รวมทั้งชุดควบคุมและชุด blank ของตัวอย่างด้วย

3.3.3 การศึกษาปริมาณและองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยในตะไคร้ต้น

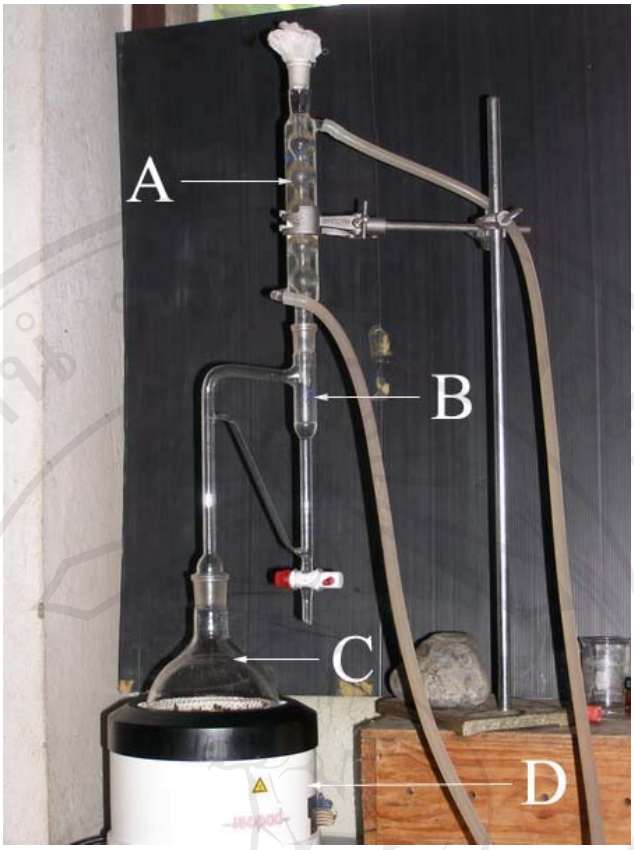
1) เตรียมตัวอย่างส่วนใบและกิ่งของตะไคร้ต้นทั้งสองสายพันธุ์ที่เก็บตัวอย่างจากดอยอ่างขาง ประมาณ 100-200 กรัม ต่อการกลั่นน้ำมันหอมระเหยแต่ละครั้ง ล้างให้สะอาด

2) ตัวอย่างใบนำไปหั่นตามแนวขวางให้มีความกว้างประมาณ 0.2-0.5 เซนติเมตร ส่วนตัวอย่างกิ่ง นำไปผ่าครึ่งตามยาว แล้วตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 1x1 เซนติเมตร

3) นำตัวอย่างแต่ละตัวอย่างไปใส่ใน round bottom flask ขนาด 1000 มิลลิลิตร ให้มีปริมาณครึ่งหนึ่งของความจุทั้งหมด เติมน้ำกลั่นลงไปให้มีระดับต่ำกว่าตัวอย่างเล็กน้อย

4) ประกอบอุปกรณ์กลั่นน้ำมันหอมระเหยโดยวิธีกลั่นด้วยน้ำ (cleavenger apparatus และ condenser) เข้ากับ round bottom flask (ภาพที่ 13) เติมน้ำกลั่นลงในหลอดวัดปริมาตรของ cleavenger apparatus จนเต็ม เพื่อป้องกันไม่ให้น้ำมันหอมระเหยจับกับผิวของหลอดวัดปริมาตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 13 : อุปกรณ์กลั่นน้ำมันหอมระเหยโดยวิธีกลั่นด้วยน้ำ
(A = Condenser B = Cleavenger apparatus C = Round bottom flask D = Heating mantle)

5) ให้ความร้อนแก่ round bottom flask ด้วย heating mantle โดยปรับระดับอุณหภูมิสูงสุดก่อนจนกว่าน้ำจะเริ่มเดือด แล้วจึงลดอุณหภูมิลงให้อยู่ในระดับ 3-4

6) ปล่อยให้น้ำมันหอมระเหยกลั่นตัวเป็นเวลาประมาณ 5-6 ชั่วโมง หรือจนกว่าจะไม่มีน้ำมันหอมระเหยออกมาอีก

7) ทิ้งไว้ให้น้ำมันหอมระเหยทั้งหมดลอยขึ้นสู่ผิวน้ำเป็นเวลาประมาณ 12 ชั่วโมง แล้วจึงเก็บน้ำมันหอมระเหยที่ได้ไว้ใน vial สีชา โดยเลือกขนาดของ vial ให้เหมาะสมกับปริมาณน้ำมันหอมระเหย ในกรณีที่ได้ปริมาณน้ำมันหอมระเหยน้อยมาก จะใช้วิธีการถอด condenser ออก แล้วใช้ dropper ดูดชั้นของน้ำมันหอมระเหยออกจาก cleavenger apparatus โดยตรง

8) กำจัดน้ำที่ปนอยู่ในน้ำมันหอมระเหย โดยใช้ dropper ดูดออก

9) คำนวณหาเปอร์เซ็นต์น้ำมันหอมระเหย โดยสูตรดังต่อไปนี้

$$\%\ \text{น้ำมันหอมระเหย} = \frac{\text{ปริมาตรของน้ำมันหอมระเหย}}{\text{น้ำหนักของวัตถุดิบ}} \times 100$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

10) ส่งตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบโดยวิธี gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) ณ หน่วยบริการทางวิชาการ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เพื่อให้ได้ข้อมูลที่สำคัญ ได้แก่

- โครมาโตแกรม (chromatogram)
- ร้อยละขององค์ประกอบ (area percent)
- เวลาของการเกิดพีค (peak) ขององค์ประกอบ (retention time : Rt)
- ข้อมูลแมสสเปคตรัมของแต่ละพีคขององค์ประกอบเทียบกับแมสสเปคตรัมมาตรฐาน (retention index : RI)

11) นำข้อมูลที่ได้มาพิจารณาหาความสัมพันธ์กับผลการทดลองในส่วนของประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างตะไคร้ต้นในการทดลองทั้ง 2 วิธี

3.3.4 การรวบรวมข้อมูลด้านสภาพแวดล้อมในการเจริญเติบโตของตะไคร้ต้น

3.3.4.1 การศึกษาองค์ประกอบและคุณภาพดิน

1) เก็บตัวอย่างดินบริเวณที่ตะไคร้ต้นเจริญเติบโตในแต่ละพื้นที่ โดยขุดดินให้มีความลึกประมาณ 1 ฟุต จากผิวดิน

2) ตัวอย่างดินที่เก็บจะมีทั้งหมด 3 ตัวอย่าง ได้แก่

2.1) ตัวอย่างดินในบริเวณที่ตะไคร้ต้นเจริญเติบโตจากดอยอ่างขาง

2.2) ตัวอย่างดินในบริเวณที่ตะไคร้ต้นเจริญเติบโตจากดอยผากลอง

2.3) ตัวอย่างดินในบริเวณที่ตะไคร้ต้นเจริญเติบโตจากดอยอินทนนท์

3) ส่งตัวอย่างดิน ณ ห้องปฏิบัติการกลาง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เพื่อการวิเคราะห์ข้อมูลดังต่อไปนี้

3.1) ธาตุอาหารหลัก (macro element)

3.2) ธาตุอาหารรอง (micro element)

3.3) ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)

3.4) ปริมาณอินทรียวัตถุ

4) นำข้อมูลที่ได้มาพิจารณาหาความสัมพันธ์กับผลการทดลองในส่วนของประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างตะไคร้ต้นในการทดลองทั้ง 2 วิธี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3.4.2 การรวบรวมข้อมูลด้านอุตุนิยมวิทยา

1) ขอความอนุเคราะห์ข้อมูลทางด้านอุตุนิยมวิทยาจากสถานีโครงการหลวงในพื้นที่ต่างๆ ได้แก่ ดอยอ่างขาง แม่สาใหม่ และดอยอินทนนท์

2) ข้อมูลที่ใช้จะเป็นข้อมูลทางด้านอุตุนิยมวิทยาในรอบปีเดียวกันกับที่เก็บตัวอย่างพืช

3) นำข้อมูลที่ได้มาพิจารณาหาความสัมพันธ์กับผลการทดลองในส่วนของประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างตะไคร้ต้นในการทดลองทั้ง 2 วิธี

สถานที่ดำเนินการวิจัย

1) ห้องปฏิบัติการกลาง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

2) ห้องปฏิบัติการพืชอุตสาหกรรม คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3) ห้องปฏิบัติการพฤกษศาสตร์พื้นบ้าน คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

4) พื้นที่ต่างๆ ดังที่ระบุในหัวข้อสถานที่เก็บตัวอย่าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved