

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การศึกษาถึงลักษณะทางสัณฐานวิทยาและปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระของชาพื้นเมืองในจังหวัดเชียงใหม่และแม่ฮ่องสอน เพื่อให้บรรลุถึงวัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้ จึงได้แบ่งขั้นตอนการศึกษาออกเป็น 2 การทดลอง ดังนี้

1. แผนงานทดลอง

ทำการเก็บรวบรวมชาทั้งหมด 143 ตัวอย่าง จากพื้นที่ปลูกชาในจังหวัดเชียงใหม่และจังหวัดแม่ฮ่องสอน ซึ่งจังหวัดเชียงใหม่ได้แก่ อำเภอเมือง อำเภอดอยสะเก็ด อำเภอแม่แตง อำเภอเชียงดาว อำเภอแม่แจ่ม อำเภอแม่ริม อำเภอสะเมิง อำเภออมก๋อย อำเภอแม่สาย และจังหวัดแม่ฮ่องสอน ได้แก่ อำเภอเมือง อำเภอปางมะผ้า และอำเภอแม่ลาน้อย

1.1 การเก็บตัวอย่างพืชและดิน

1.1.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ

- 1) ถุงพลาสติก ขนาด 12×18 นิ้ว และถุงซิปล็อค ขนาด 4×5 นิ้ว
- 2) ป้ายพลาสติก ปากกาเคมี
- 3) พลับหรือเสียม
- 4) เตาอบความร้อน (Microwave)
- 5) เทอร์โมมิเตอร์
- 6) เครื่องกำหนดพิกัด โดยสัญญาณดาวเทียม (Global Positioning System : GPS)

1.1.2 วิธีการทดลอง

1.1.2.1 การเก็บตัวอย่างพืช

1) การเก็บตัวอย่างต้นชาเพื่อการจัดกลุ่มชาโดยเก็บใบชาที่เจริญเต็มที่แล้วจำนวน 10 ใบต่อ 1 ต้น จากนั้นบันทึกพิกัดทางภูมิศาสตร์ ตำแหน่งที่ตั้ง ความสูงจากระดับน้ำทะเล และนำตัวอย่างใบชาเพื่อเปรียบเทียบลักษณะและวัดขนาดใบชา

2) การเก็บตัวอย่างชาเพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ โดยเก็บส่วนยอดของชา

ที่ประกอบด้วย 1 ยอด กับ 2 ใบ แล้วนำใบชาไปอบด้วยเตาอบความร้อนทันที ที่กำลังไฟฟ้า 800 วัตต์ นานประมาณ 1-2 นาที

1.1.2.2 การเก็บตัวอย่างดิน โดยเก็บดินบริเวณบริเวณรอบๆ จุดที่เก็บตัวอย่างพืช ทำการขุดดินลึกประมาณ 20 เซนติเมตร

1.1.2.3 การเก็บข้อมูลเกี่ยวกับแปลงปลูกชา โดยใช้เครื่อง GPS วัดพิกัดความสูงในทุกๆ จุดที่ทำกรเก็บตัวอย่าง



ภาพที่ 1 ลักษณะพื้นที่เก็บชาอำเภอเมือง (ช่างเคียน) จังหวัดเชียงใหม่



ภาพที่ 2 ลักษณะพื้นที่เก็บชาอำเภอเชียงดาว (แม่ณะ) จังหวัดเชียงใหม่



ภาพที่ 3 ลักษณะพื้นที่เก็บชาอำเภอเชียงดาว (ป่าเกี๊ยะ) จังหวัดเชียงใหม่



ภาพที่ 4 ลักษณะพื้นที่เก็บชาอำเภอคอยสะเก็ด (เทพเสด็จ) จังหวัดเชียงใหม่



ภาพที่ 5 ลักษณะพื้นที่เก็บชา อำเภอแม่อาว (แม่สาว) จังหวัดเชียงใหม่



ภาพที่ 6 ลักษณะพื้นที่เก็บชาอำเภอแม่แจ่ม (แม่นาจร) จังหวัดเชียงใหม่



ภาพที่ 7 ลักษณะพื้นที่เก็บชาอำเภอแม่ริม (โป่งแยง) จังหวัดเชียงใหม่



ภาพที่ 8 ลักษณะพื้นที่เก็บชาอำเภออมก๋อย (ม่อนจร) จังหวัดเชียงใหม่



ภาพที่ 9 ลักษณะพื้นที่เก็บชาอำเภอแม่แตง (บริษัทธาระมิงค์) จังหวัดเชียงใหม่



ภาพที่ 10 ลักษณะพื้นที่เก็บชาอำเภอมะแมง (ป่าแป๋) จังหวัดเชียงใหม่



ภาพที่ 11 ลักษณะพื้นที่เก็บชาอำเภอสะเมิง (สะเมิงเหนือ) จังหวัดเชียงใหม่



ภาพที่ 12 ลักษณะพื้นที่เก็บชาอำเภอเมือง (หมอกจำแป่) จังหวัดแม่ฮ่องสอน



ภาพที่ 13 ลักษณะพื้นที่เก็บชาอำเภอลาน้อย (ห้วยห้อม) จังหวัดแม่ฮ่องสอน

2. การวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

2.1 การเตรียมตัวอย่างพืชและดิน

2.1.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ

- 1) ครกกระเบื้องเคลือบ พร้อมทั้งลูกครกหรือลูกกลิ้งไม้
- 2) ตะแกรงทองเหลืองขนาด 0.5 มิลลิเมตร และ 2 มิลลิเมตร
- 3) เครื่องแก้วในห้องปฏิบัติการทดลอง
- 4) กระดาษฟอยล์ กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1
- 5) water bath
- 6) ถังพลาสติก ขนาด 30 × 30 นิ้ว
- 7) เครื่องชั่งอิเล็กทรอนิกส์ ทศนิยม 4 ตำแหน่ง
- 8) Freeze dry

2.1.2 วิธีการทดลอง

1) การเตรียมตัวอย่างพืช โดยนำใบชาแห้งมาบด ชั่งมา 10 แล้วตวงน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ใส่บีกเกอร์ปิดปากด้วยกระดาษฟอยล์ นำไปต้มใน water bath ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นานประมาณ 5 นาที แล้วเทชาที่บดไว้ลงในน้ำกลั่น ต้มต่อไปอีกประมาณ 10 นาทีหลังจากนั้นกรองเอากากใบชาออก เพื่อมาต้มซ้ำอีกรอบ โดยลดปริมาณน้ำกลั่นลงครึ่งหนึ่งครั้งแรกแล้วกรองซ้ำอีกรอบด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 จะได้น้ำสกัดชา นำไปทำให้แห้งด้วยความเย็น (Freeze dry)

2) การเตรียมตัวอย่างดิน โดยนำดินที่เก็บมาทำให้แห้ง ด้วยการนำดินมาเกลี่ยลงบนถังพลาสติก ขนาด 30×30 นิ้ว แล้วผึ่งแดดเป็นเวลา 2-3 วัน ขึ้นอยู่กับความชื้นสัมพัทธ์ เมื่อดินแห้งแล้วนำมาบดให้ละเอียด แล้วร่อนดินผ่านตะแกรงทองเหลือง ขนาด 0.5 มิลลิเมตร และ 2 มิลลิเมตร เก็บใส่ถุงเพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป (ทัศนีย์, 2542)

2.2 การวิเคราะห์ทางเคมี

2.2.1 การวิเคราะห์พืช

2.2.1.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ

- 1) เครื่องชั่งอิเล็กทรอนิกส์ ทศนิยม 4 ตำแหน่ง
- 2) เครื่องแก้วในห้องปฏิบัติการทดลอง
- 3) กระดาษกรองเมมเบรน (Cellulose acetate membrane) ขนาด 0.45 μm ×47mm.
- 4) น้ำ Deionized

5) ตู้อบ (Hot air oven)

6) เครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

(High-Performance Liquid Chromatographic, HPLC)

7) Spherisorb cartridge column ODS2, 5 μ , 4.6 \times 250 mm., C₁₂

2.2.1.2 สารเคมี

1) Concentrated Sulfuric acid (H₂SO₄)

2) Acetonitrile for HPLC

3) Ethyl acetate for HPLC

4) Methanol for HPLC

2.2.1.3 วิธีการทดลอง

1) การวิเคราะห์หาปริมาณสารแอนติออกซิแดนซ์ในใบชา

1.1 การเตรียมตัวอย่าง โดยนำชาที่ Freeze dry ไว้แล้ว มาละลายในน้ำ Deionized โดยให้มีความเข้มข้น 2 μ g/ μ l แล้วกรองด้วย Filter membrane จะได้น้ำตัวอย่างที่พร้อมจะฉีดเข้าเครื่อง นำค่าที่วิเคราะห์ได้มาเปรียบเทียบกับ Standard ของสาร Epicatechin gallate (ECG), Epigallocatechin-3 gallate (EGCG), Catechin (C), Epigallocatechin (EGC)

1.2 การเตรียม Mobile Phase โดยเติม Cone. H₂SO₄ 0.453 มิลลิลิตร กับ Ethyl acetate 20 มิลลิลิตร และเติมน้ำ Deionized 860 มิลลิลิตร เข้าด้วยกัน แล้วกรองด้วย Filter membrane หลังจากนั้นเติม Acetonitrile 120 มิลลิลิตร จะได้ Mobile Phase ที่มี pH ประมาณ 1.85 ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ตามกรรมวิธีของ Chen *et al.*, 2001

1.3 Condition ของ HPLC โดย Column ODS2 μ - C₁₈ 4.6 \times 250 mm และ Detector UV ที่ความยาวคลื่น 280 nm ใช้อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที (Chen *et al.*, 2001)

2.2.2 การวิเคราะห์ดิน

2.2.2.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1) เครื่องซังอิเล็กโทรนิกส์ ทศนิยม 4 ตำแหน่ง

2) เครื่องแก้วในห้องปฏิบัติการทดลอง

3) กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 5

4) เครื่องไตเตรท

5) pH meter ยี่ห้อ BECKMAN รุ่น 40

6) เครื่อง Atomic absorption spectrophotometer

2.2.2.2 สารเคมี

- 1) Potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$)
- 2) Concentrated Sulfuric acid (H_2SO_4)
- 3) Ammonium ferrous sulfate
- 4) O-phenanthroline
- 5) Ferrous sulfate($FeSO_4$)
- 6) Ammonium fluoride (NH_4F)
- 7) Hydrochloric acid (HCL)
- 8) Ammonium molybdate
- 9) Antimony potassium tartrate
- 10) Ascorbic acid
- 11) Acetic acid
- 12) Ammonium hydroxide
- 13) Ammonium acetate (NH_4CH_3COOH)

2.2.2.3 วิธีการทดลอง

1) pH ของดิน โดยชั่งดินตัวอย่างที่บดและผ่านการร่อนด้วยตะแกรงทองเหลือง ขนาด 2 มิลลิเมตรแล้ว จำนวน 10 กรัม ในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร (อัตราส่วนของดิน:น้ำ = 1:1) คนให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที นำไปวัดค่า pH ด้วยเครื่อง pH-meter (Peter, 2000)

2) การวิเคราะห์หาปริมาณอินทรีย์วัตถุ (organic matter) ในดินโดยวิธี Walkley and Black (ทัศนีย์, 2542)

2.1) สาร reagent

2.1.1) Potassium dichromate solution ($K_2Cr_2O_7$) 1 N เตรียมได้โดยละลาย potassium dichromate ที่อบแล้วที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส จำนวน 49.04 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

2.1.2) กรดซัลฟูริกเข้มข้น (Conc. H_2SO_4)

2.1.3) Ferrous sulfate solution 0.5 N เตรียมได้จากละลาย ammonium ferrous sulfate จำนวน 196.1 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

2.1.4) O-phenanthroline ferrous sulfate indicator 0.025 M เตรียมได้จาก ละลาย O-phenanthroline จำนวน 1.48 กรัม และ ferrous sulfate จำนวน 0.7 กรัม ในน้ำกลั่นเติม กรดซัลฟูริกเข้มข้น จำนวน 15 มิลลิลิตร

2.2) วิธีการ โดยชั่งดินตัวอย่างที่บดและผ่านการร่อนด้วยตระแกรงทองเหลือง ขนาด 0.5 มิลลิเมตร จำนวน 0.5 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น เติมน้ำกลั่น 1 N potassium dichromate จำนวน 5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น จำนวน 10 มิลลิลิตร อย่างรวดเร็วแล้วแกว่งขวดไปรอบๆ เพื่อให้ปฏิกิริยา เกิดได้อย่างสมบูรณ์ ตั้งดินทิ้งไว้ 30 นาที เติมน้ำกลั่น 15 มิลลิลิตร และหยด 0.025 M O-phenanthroline ferrous sulfate indicator ลง ไป 3 หยด นำ soil suspension ที่ได้ไปไตเตรท กับสารละลาย 0.5 N ferrous sulfate จนถึงจุดยุติ (end point) ซึ่ง soil suspension จะเปลี่ยนสีจากสีเขียวเป็นน้ำตาลแดง จนปริมาณของสารละลาย ferrous sulfate ที่ใช้เพื่อใช้คำนวณหาปริมาณอินทรีย์วัตถุในดิน

ทำ blank เพื่อใช้หาความเข้มข้นที่แท้จริงของสารละลาย ferrous sulfate และ ปริมาณของ potassium dichromate ที่ถูกรีดิวซ์ (reduced) โดยดินตัวอย่าง ซึ่งทำเช่นเดียวกับการ วิเคราะห์หาปริมาณอินทรีย์วัตถุในดิน

วิธีการคำนวณ

$$\% \text{ O.M.} = \frac{(\text{meq K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 - \text{meq Fe}_2\text{SO}_4) \times 0.003 \times 100 \times 1.33 \times 1.72}{\text{wt. of soil sample (g)}}$$

3. การวิเคราะห์หาปริมาณฟอสฟอรัสในดิน โดยวิธี Bray II (ทัสนีย์, 2542)

3.1 สาร reagent

3.1.1) Ammonium fluoride solution 1 N เตรียมได้โดยละลาย ammonium fluoride (NH₄F) จำนวน 3.8 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

3.1.2) Hydrochloric acid 5 N เตรียมได้จากเจือจางกรดเกลือเข้มข้น (conc. hydrochloric acid) 43.5 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

3.1.4) สารละลาย ammonium molybdate ascorbic acid (solution B)

solution A ได้จากการผสมสารละลาย ammonium molybdate จำนวน 12 กรัม ใน น้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร แล้วละลาย antimony potao 0.2908 กรัม ลงในน้ำกลั่น 100

มิลลิลิตร นำสารละลายทั้งสองชนิดนี้ผสมกันและปรับปริมาตรให้เป็น 2 ลิตร เก็บไว้ในขวดแก้วในสภาพที่มีดและเย็น

solution B ได้จากการละลาย ascorbic acid 1.056 กรัม ในสารละลาย solution A จำนวน 200 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน reagent ที่เตรียมได้จะต้องใช้ให้หมดภายใน 24 ชั่วโมง

3.1.5) Standard phosphate solution เตรียมโดยละลาย KH_2PO_4 (A.R.) 0.2195 กรัม ในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ซึ่ง standard นี้จะมีความเข้มข้น 50 ppm

3.2) วิธีการ

3.2.1) การสกัด โดยชั่งดินจำนวน 20 กรัม เติมสารละลาย Bray II จำนวน 20 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 60 วินาที กรองเอาสารละลาย (soil solution) ที่สกัดได้ออก เก็บไว้ในขวดรูปชมพู่

3.2.2) การวิเคราะห์หาปริมาณฟอสฟอรัสในสารละลายดินสกัด
การทำ standard curve ของฟอสฟอรัส จากการเตรียมน้ำยามาตรฐาน phosphate ให้มีความเข้มข้น 5 ppm โดยใช้ standard phosphate solution 50 ppm P มาทำให้เจือจาง 10 เท่า

ใช้ปิเปตดูด aliquot 0 1 2 3 4 และ 5 มิลลิลิตร บรรจุใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร เติมน้ำลงไปจนมีปริมาตร 20 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เติม reagent B ลงไป 4 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 25 มิลลิลิตร เขย่าวางทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที แล้วนำไปอ่านค่า spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 882 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาเขียนกราฟ โดยใช้ความสัมพันธ์ระหว่างค่า transmittance (แกน Y) กับความเข้มข้นของ P (แกน X)

3.2.3) การวิเคราะห์หาปริมาณฟอสฟอรัสในตัวอย่างดิน โดยใช้ aliquot ประมาณ 1 มิลลิลิตร ของสารละลายที่สกัดได้เช่นเดียวกับที่ทำกับ standard

3.2.4) คำนวณปริมาณฟอสฟอรัส

$$\text{ppm P in soil} = \frac{Z \times Y \times \text{final vol. (ml)}}{\text{Aliquot used (ml)}}$$

โดย Y = ratio ของ solution : soil Z = ppm P ที่อ่านได้จาก standard curve

4) การวิเคราะห์หาปริมาณโพแทสเซียมในดิน (ทัศนีย์, 2542)

4.1) สาร reagent

4.1.1) Ammonium acetate ($\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COOH}$) 1 N เตรียมโดยใช้ ammonium hydroxide 68 กรัม ละลายในน้ำ 500 มิลลิลิตร เติมกรดอะซิติก (acetic acid) ลงไป 57 มิลลิลิตร แล้ว

เติมน้ำกลั่นลงไปให้ครบ 1000 มิลลิลิตร เขย่าสารละลายให้เข้ากัน ปรับ pH ของสารละลายให้เป็นกลาง ด้วยสารละลายที่เจือจางของ 1 N ammonium hydroxide หรือ acetic acid

4.1.2) สารละลายมาตรฐาน 100 ppm K เตรียมโดยชั่งโพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) 1.913 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรจนครบ 1 ลิตร

4.1.3) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 0 1 2 3 4 และ 5 ppm K โดยใช้ปิเปตดูดสารละลายโพแทสเซียมมาตรฐาน 100 ppm K มา 0 1 2 3 4 และ 5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายโพแทสเซียมมาตรฐาน 0 1 2 3 4 และ 5 ppm K ตามลำดับ

4.2) วิธีการ โดยชั่งตัวอย่างดิน 5 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร เติมน้ำยาสกัด $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COOH}$ ลงไป 50 มิลลิลิตร เขย่า ติดต่อกันนาน 30 นาที กรองโดยใช้กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 5 เทสารละลายที่กรองได้ใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรจนมีปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปวัดหาปริมาณโพแทสเซียม ด้วยเครื่อง atomic absorption spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 769.4 นาโนเมตร

5) แคลเซียม (Ca) และแมกนีเซียม (Mg) ในดิน

5.1) ชั่งตัวอย่างดิน 2.5 g ใส่ในขวดพลาสติก 100 มิลลิลิตร

5.2) เติมน้ำยาสกัด 25 ml

5.3) ทำตัวเปรียบเทียบกับอีก 2 ขวด แต่มีตัวอย่างดิน

5.4) นำตัวอย่างดินวางบนเครื่องเขย่านาน 30 นาที แล้วนำมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 5

5.5) เอาสารละลายที่กรองได้เก็บไว้ในขวดพลาสติก

5.6) การหาปริมาณของ Ca และ Mg ใช้ AAS-mode วัดค่าการดูดกลืนโดยเครื่อง atomic absorption spectrophotometer (PERKIN - ELMER, USA) (AAS)

6) การวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนในดิน

ส่งตัวอย่างดินไปวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการกลาง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (Total Nitrogen) โดยวิธี Micro Kjeldahl ตามกรรมวิธีของ Bremer and Mulvancy (1982)

3. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 16.0 โดยวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของตัวแปรอิสระและตัวแปรตาม ด้วยวิธีการวิเคราะห์การถดถอยพหุคูณ (Multiple Regression Analysis) วิเคราะห์สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation Coefficient Analysis) และวิเคราะห์แบบแบ่งกลุ่ม (Cluster Analysis) โดยแสดงผลในรูปของ Dendrogram

สถานที่ทำการทดลอง

1. สวนขาในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่และจังหวัดแม่ฮ่องสอน
2. ห้องปฏิบัติการกลาง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
3. ห้องปฏิบัติการคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ระยะเวลาทดลอง

เดือนกันยายน 2550 ถึง พฤษภาคม 2552

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved