

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

เมล็ดพันธุ์

เมล็ดข้าวเหนียวเก่าจำนวน 24 พันธุ์ และข้าวขาวพันธุ์ปรับปรุงจำนวน 2 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และ กข 6 เป็นพันธุ์เปรียบเทียบ (ตาราง 3.1) และเมล็ดงาจี๋ม่อนจำนวน 12 พันธุ์ มีงาดำ (ไชยบุรี, เวียงสา) และงาขาว (ไชยบุรี) เป็นพันธุ์เปรียบเทียบ (ตาราง 3.2)

ตาราง 3.1 แสดงสายพันธุ์ข้าวเหนียวเก่าที่ใช้ในการศึกษา

ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	แหล่งที่มาของข้าวเหนียวเก่า	ลักษณะพันธุ์
1	ก้า พะเยา	อำเภอจุน, จังหวัดพะเยา	ข้าวนาดำ
2	ก้า เวียงสา	อำเภอเวียงสา, จังหวัดน่าน	ข้าวนาดำ
3	ก้า นา	อำเภอเวียงสา, จังหวัดน่าน	ข้าวนาดำ
4	ก้า น่าน	อำเภอปัว, จังหวัดน่าน	ข้าวไร่
5	ก้า คอยสะเก็ด	พันธุ์ปรับปรุงของมหาวิทยาลัยเชียงใหม่	ข้าวนาดำ
6	ก้า หกสาดี	อำเภอฝาง, จังหวัดเชียงใหม่	ข้าวไร่
7	ก้า คอยมูเซอ	อำเภอมก๋อย, จังหวัดเชียงใหม่	ข้าวไร่
8	ก้า ฝาง	อำเภอฝาง, จังหวัดเชียงใหม่	ข้าวไร่
9	ก้า 5153	อำเภอสอง, จังหวัดแพร่	ข้าวนาดำ
10	ก้า 7677	อำเภอท่าคันโท, จังหวัดกาฬสินธุ์	ข้าวนาดำ
11	ก้า 87061	ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	ข้าวนาดำ
12	ก้า 87090	ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	ข้าวนาดำ
13	ก้า 87046	ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	ข้าวนาดำ
14	ก้า 89038	ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	ข้าวนาดำ
15	ก้า 89057	ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	ข้าวนาดำ
16	ก้า 88061	ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	ข้าวนาดำ
17	ก้า 88069	ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	ข้าวนาดำ
18	ก้า 88083	ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	ข้าวนาดำ
19	ก้า 99151	ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	ข้าวนาดำ
20	ก้า 11875	อำเภอทองแสนขัน, จังหวัดอุตรดิตถ์	ข้าวนาดำ

ตาราง 3.1 (ต่อ) แสดงสายพันธุ์ข้าวเหนียวเก่าที่ใช้ในการศึกษา

ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	แหล่งที่มาของข้าวเหนียวเก่า	ลักษณะพันธุ์
21	เก่า 19104	อำเภอวังชิ้น, จังหวัดแพร่	ข้าวนาดำ
22	เก่า 19959	อำเภอพิมาย, จังหวัดนครราชสีมา	ข้าวนาดำ
23	เก่า สุพรรณ	อำเภอเมือง, จังหวัดสุพรรณบุรี	ข้าวนาดำ
24	เก่า เวียดนาม	ประเทศเวียดนาม	ข้าวนาดำ

ตาราง 3.2 แสดงสายพันธุ์งาจี๋ม่อนที่ใช้ในการศึกษา

ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	แหล่งที่มาของงาจี๋ม่อน	ลักษณะพันธุ์
1	งาจี๋ม่อน ท่าวังผา	อำเภอท่าวังผา, จังหวัดน่าน	ปลูกบนพื้นที่ดอน
2	งาจี๋ม่อน เวียงสา 1	อำเภอเวียงสา, จังหวัดน่าน	ปลูกบนพื้นที่ดอน
3	งาจี๋ม่อน เวียงสา 2	อำเภอเวียงสา, จังหวัดน่าน	ปลูกบนพื้นที่ดอน
4	งาจี๋ม่อน เวียงสา 3	อำเภอเวียงสา, จังหวัดน่าน	ปลูกบนพื้นที่ดอน
5	งาจี๋ม่อน นาน้อย 1	อำเภอนาน้อย, จังหวัดน่าน	ปลูกบนพื้นที่ดอน
6	งาจี๋ม่อน นาน้อย 2	อำเภอนาน้อย, จังหวัดน่าน	ปลูกบนพื้นที่ดอน
7	งาจี๋ม่อน นาน้อย 3	อำเภอนาน้อย, จังหวัดน่าน	ปลูกบนพื้นที่ดอน
8	งาจี๋ม่อน นาน้อย 4	อำเภอนาน้อย, จังหวัดน่าน	ปลูกบนพื้นที่ดอน
9	งาจี๋ม่อน นาน้อย 5	อำเภอนาน้อย, จังหวัดน่าน	ปลูกบนพื้นที่ดอน
10	งาจี๋ม่อน นาน้อย 6	อำเภอนาน้อย, จังหวัดน่าน	ปลูกบนพื้นที่ดอน
11	งาจี๋ม่อน นาน้อย 7	อำเภอนาน้อย, จังหวัดน่าน	ปลูกบนพื้นที่ดอน
12	งาจี๋ม่อน นาน้อย 8	อำเภอนาน้อย, จังหวัดน่าน	ปลูกบนพื้นที่ดอน

วิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1 การหาปริมาณวิตามินอีในรำข้าวเหนียวเก่า

การปลูกและดูแลรักษาต้นข้าวเหนียวเก่า

ทำการปลูกข้าวเหนียวเก่าแต่ละพันธุ์จำนวน 24 พันธุ์ โดยมีข้าวขาวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และ กข 6 เป็นพันธุ์เปรียบเทียบ วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) จำนวน 3 ซ้ำ โดยเริ่มปลูก เมื่อเดือนกรกฎาคม – ธันวาคม 2553 ปักดำกอละ 2-3 ต้น ระยะปักดำ 25x25 เซนติเมตร ในการดูแลรักษาแปลงทดลอง ใส่ปุ๋ยรองพื้นสูตร 16-20-0 หลังอายุข้าว ประมาณ 30 วัน ครั้งที่ 2 ใส่เมื่อต้นข้าวอายุได้ 55 วัน หลังปักดำ ดูแลรักษา และป้องกันกำจัดโรค และแมลงตามความเหมาะสม

1.1 ประเมินลักษณะทางสัณฐานวิทยาของข้าวเหนียวเก่า ตามมาตรฐานสีต้นข้าวแบบบันทึก Descriptors for rice ของ IBPGR-IRRI (1980) โดยบันทึกลักษณะดังนี้

1.1.1 ระยะแตกกอ (Seedling stage) 6 ลักษณะ คือ ได้แก่ สีแผ่นใบ (leaf blade) สีกาบใบ (leaf sheath) สีเขี้ยวกันแมลง (auricle) สีเยื่อกันน้ำฝน (ligule) สีข้อ (node) และสีปล้อง (internode)

1.1.2 ระยะออกรวง (Flowering stage) 4 ลักษณะ คือ สีเกสรตัวเมีย (stigma) สีปลายยอดดอก (apiculus) สีกลีบรองดอก (inner glumes) และการปรากฏของหาง (present of awn)

1.1.3 ระยะเก็บเกี่ยว (Harvesting stage) 3 ลักษณะ คือ สีเปลือกเมล็ด (husk) สีเยื่อหุ้มเมล็ด (pericarp) และขนาดเมล็ด (seed size)

1.2 การศึกษาความแตกต่างของการสะสมปริมาณไขมันโดยรวม และความแตกต่างของการสะสมปริมาณวิตามินอีในรำข้าวเหนียวเก่า

1.2.1 การศึกษาความแตกต่างของการสะสมปริมาณไขมันโดยรวม (Crude Fat) ในรำข้าวเหนียวเก่า โดยวิธี Soxhlet

เก็บตัวอย่างเมล็ดข้าวเหนียวเก่าทุกต้น แล้วทำการสุ่มตัวอย่างเมล็ดในแต่ละพันธุ์ หลังจากนั้นนำเมล็ดข้าวเหนียวเก่ามากะเทาะเอาเปลือกออก โดยเหลือเยื่อหุ้มเมล็ดข้าว ให้เป็นรำข้าวเหนียวเก่า หลังจากนั้นนำรำข้าวเหนียวเก่ามาบด ด้วยเครื่องบดตัวอย่าง แล้วชั่งตัวอย่างรำข้าวเหนียวเก่า ใน

แต่ละพันธุ์ จำนวน 2.5 กรัมใส่กระดาษกรอง ห่อตัวอย่างให้มิดชิด (กันตัวอย่างหลุดออกขณะสกัด) ใส่ลงใน thimble หลังจากนั้นนำ thimble ใส่ลงใน soxhlet ต่อปลายล่างของ soxhlet เข้ากับขวดทรงเตี้ย (flask) เติม dichloromethane ประมาณ 250 มิลลิลิตร ทางบนสุดของเครื่องควบแน่น ให้ความร้อนรอนจนเกิดการควบแน่น 4-6 หยด ต่อวินาที ใช้เวลา 8 ชั่วโมง

หลังจากนั้นนำไขมันโดยรวมที่ได้จากร้าข้าวเหนียวก้าไปชั่ง เพื่อหาค่าปริมาณไขมันโดยรวมของร้าข้าวเหนียวก้า โดยวิเคราะห์ตาม วิธีของ Pathak *et al.* (1996)

1.2.2 การศึกษาความแตกต่างของการสะสมปริมาณวิตามินอี ในร้าข้าวเหนียวก้า

นำไขมันโดยรวมที่สกัดจากร้าข้าวเหนียวก้า หาปริมาณวิตามินอี โดยนำตัวอย่างของไขมันไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC (Shimadzu, Japan) โดยใช้ระบบ Normal phase มี Fluorescence (excitation 290 nm., emission 330 nm.) เป็นเครื่องตรวจจับ ใช้ตัวทำละลาย (mobile phase) 0.5:99.5 (v/v) isopropanol:hexane ใช้คอลัมน์ชนิด Pinnacle silica 5/μm, 250 x 4.6 mm. (Restex, USA) จากนั้นนำไปวิเคราะห์ และเปรียบเทียบปริมาณมาตรฐานต่อไป

การคำนวณปริมาณวิตามินอี ในตัวอย่างวิเคราะห์ หน่วยเป็น μg/g อ้างอิงวิเคราะห์ตามวิธีมาตรฐาน AOCS (Method Ce-8-89) (AOCS, 1997)

1.3 การศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (DPPH radical scavenging activity) ในร้าข้าวเหนียวก้า

วิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ตามวิธีของ Brand-William *et al.*, 1995

เตรียมสารละลายของ DPPH ที่ความเข้มข้น 0.08 มิลลิโมล ในสารละลายเอทานอล 100% หลังจากนั้นผสมสารละลาย DPPH, tris buffer solution และ 80% เอทานอล ในอัตราส่วน 1: 1: 1 เพื่อให้ได้สารผสมปริมาตร 1.8 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมสารสกัดจากตัวอย่างปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร (ในกรณีของสารมาตรฐานให้เติมสารมาตรฐานความเข้มข้นต่างๆ ลงไปแทนสารสกัดจากตัวอย่าง โดยใช้ Trolox เป็นสารมาตรฐาน) ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 2.4 มิลลิลิตร บ่มปฏิกิริยาไว้นาน 30 นาที ในที่มืด วัดปฏิกิริยาโดยวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 525 นาโนเมตร หน่วยวัดมีค่าเท่ากับ ไมโครโมลาร์ Trolox ต่อกรัมไขมัน (μmol TE/g fat)

1.4 การศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณไขมันโดยรวม, ปริมาณวิตามินอี และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ในร้าข้าวเหนียวก้า

ทำการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของปริมาณไขมันโดยรวม, ปริมาณวิตามินอี และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ในร้าข้าวเหนียวก้า

การทดลองที่ 2 การหาปริมาณวิตามินอีในเมล็ดงาขี้ม้อน

การปลูกและดูแลรักษาต้นงาขี้ม้อน

ทำการปลูกงาขี้ม้อนแต่ละพันธุ์จำนวน 12 พันธุ์ ไร่เป็นแถว โดยปลูกเทียบกับ งาดำ (ไชยบุรี, เวียงสา) และงาขาว (ไชยบุรี) วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) จำนวน 3 ซ้ำ โดยเริ่มปลูก เมื่อเดือนกรกฎาคม – พฤศจิกายน 2553 ระยะปลูก 50 x 10 ซม. แถวยาว 1 เมตร ให้มีงาประมาณ 10-20 ต้น หลังปลูก 15 วัน จึงถอนแยก ใส่ปุ๋ยรองพื้นสูตร 15-15-15 ไร่กับร่องแถวก่อนปลูก ครั้งที่ 2 ใส่เมื่อต้นงาอายุไม่เกิน 15 วัน หลังออก ดูแลรักษา และป้องกันกำจัดโรค และแมลงตามความเหมาะสม

2.1 ประเมินลักษณะทางสัณฐานวิทยาของงาขี้ม้อน ตามมาตรฐานสีและรูปร่างของต้นงาแบบบันทึกของ Ju Kyong Lee and Ohmi Ohnishi (2001) โดยบันทึกลักษณะ ดังนี้

- 2.1.1 ระยะต้นกล้า (Seedling stage)** 3 ลักษณะ คือ สีผิวใบ (leaf surface) สีผิวใบล่าง (reverse side of leaf) และสีของลำต้น (stem)
- 2.1.2 ระยะออกดอก (Flowering stage)** 3 ลักษณะ คือ รูปร่างของใบ (shape of leaf) สีของดอก (color of flower) และ ความสูงของต้น (plant height)
- 2.1.3. ระยะเก็บเกี่ยว (Harvesting stage)** 2 ลักษณะ คือ สีของเมล็ด (color of seed) และ ขนาดเมล็ด (seed size)

2.2 การศึกษาความแตกต่างของการสะสมปริมาณไขมันโดยรวม และความแตกต่างของการสะสมปริมาณวิตามินอีในเมล็ดงาขี้ม้อน

2.2.1 การศึกษาความแตกต่างของการสะสมปริมาณไขมันโดยรวม

(Determination of Crude Fat) ในเมล็ดงาขี้ม้อน โดยวิธี Soxhlet

เก็บตัวอย่างเมล็ดงาขี้ม้อนทุกต้น แล้วทำการสุ่มตัวอย่างเมล็ดในแต่ละพันธุ์ หลังจากนั้นนำเมล็ดงาขี้ม้อนมาบด แล้วชั่งตัวอย่างเมล็ดงาขี้ม้อน ทำเช่นเดียวกับการทดลอง 1.2.1

2.2.2 การศึกษาความแตกต่างของการสะสมปริมาณวิตามินอี ในเมล็ดงาขี้ม้อน

นำไขมันโดยรวมที่สกัดจากเมล็ดงาขี้ม้อน หาปริมาณวิตามินอี โดยนำตัวอย่างของไขมันไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC จากนั้นนำไปวิเคราะห์ และเปรียบเทียบวิตามินอีมาตรฐานต่อไป

การคำนวณปริมาณวิตามินอี ในตัวอย่างวิเคราะห์ ทำเช่นเดียวกับการทดลอง 1.2.2

2.3 การศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (DPPH radical scavenging activity) ในเมล็ดงาขี้ม่อน

วิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในเมล็ดงาขี้ม่อน ตามวิธีของBrand-William *et al.*, 1995 เช่นเดียวกับการทดลอง 1.3

2.4 การศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณไขมันโดยรวม, ปริมาณวิตามินอี และค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ในเมล็ดงาขี้ม่อน

ทำการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของปริมาณไขมันโดยรวม, ปริมาณวิตามินอี และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ในเมล็ดงาขี้ม่อน

สถานที่ทดลอง

งานวิจัยนี้ที่แปลงทดลอง สาขาวิชาพืชไร่ ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ แปลงวิจัยพืชไร่ ณ ศูนย์วิจัยสาริตและฝึกอบรมการเกษตรแม่เหิยะ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และห้องปฏิบัติการกลาง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปี พ.ศ. 2553-2554

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ผลทางสถิติโดยการวิเคราะห์หาความแปรปรวน (Analysis of variance) แต่ละข้อมูลโดยเปรียบเทียบกับพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 และ กข 6 และงาคำ (ไชยบุรี, เวียงสา) และงาขาว (ไชยบุรี) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Least Significant Difference (LSD) ที่ $P < 0.05$