บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

งานวิจัยในครั้งนี้เป็นการศึกษาคุณภาพของเมล็ดในข้าวเหนียวก่ำพันธุ์พื้นเมืองแต่ละพันธุกรรม โดยลักษณะทางคุณภาพของเมล็ดที่นำมาประเมิน ได้แก่ ปริมาณของไซยานิดิน (cyanidin 3-glucoside), ปริมาณอะมิโลส และชนิดของกรดอะมิโนจำเป็นที่มีอยู่ในส่วนของเมล็ดของตัวอย่างข้าวเหนียวก่ำพันธุ์พื้นเมืองแต่ละพันธุกรรม

สถานที่ทดลอง

ดำเนินงานวิจัยที่แปลงปฏิบัติการของภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เริ่มทำการทดลอง ระหว่างเดือนสิงหาคม 2548 ถึงเดือน มิถุนายน 2549

พันธุกรรม

ได้ใช้ข้าวเหนียวก่ำพันธุ์พื้นเมืองจำนวน 19 พันธุ์ และพันธุ์ตรวจสอบ จำนวน 3 พันธุ์ได้แก่

varieties	
1.ก่ำดอยมูเซอ	12.ก่ำเวียงสา
2.ก่ำน่าน	13.ก่ำ 5153
3.ก่ำเวียดนาม 4	14.ก่ำ 88061
4.ก่ำ 99151	15.ก่ำ 87059
5.ก่ำ 7677	16.ก่ำ 87046
6.ก่ำ 87090	17.ก่ำ 87061
7.ก่ำ 88069	18.ก่ำดอยสะเก็ด
8.ก่ำ 89038	19.ก่ำอมก๋อย
9.ก่ำ 89057	20.มะลิแดง (check)
10.ก่ำ 19959	21.กข 6 (check)
11.ก่ำนา	22.ขาวดอกมะลิ 105 (check)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การวางแผนการทดลอง

ทำการปลูกข้าวเหนียวก่ำแต่ละพันธุกรรมจำนวน 19 พันธุ์ รวมทั้งพันธุ์ตรวจสอบได้แก่ข้าวพันธุ์มะลิแดง กข6 และขาวดอกมะลิ105 รวมทั้งสิ้น 22 พันธุ์ ทำการปลูกในแปลงทดลอง ภาควิชาพืชไร่คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยวางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design จำนวน 3 ซ้ำ

การปลูกและดูแลรักษา

ในการปลูกมีการจัดการปลูกและดูแลดังนี้คือ

1.การเตรียมดิน ทำการเตรียมดิน 1 ครั้งก่อนปลูกโดยวิธีการไถพรวน

2.ปลูกโดยปักดำกอละ 2-3 ต้น ระยะปักดำ 0.25X0.25 เมตร

3.ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 15-15-15 จำนวน 2 ครั้ง ครั้งที่ 1 ใส่เมื่อข้าวอายุประมาณ 30 วัน หลังปักดำ ครั้งที่ 2 ใส่เมื่อข้าวอายุประมาณ 50-55 วัน หลังปักดำ

4.การกำจัดวัชพืช และโรคแมลงตามลักษณะอาการที่พบ

การบันทึกข้อมูล

1.บันทึกปริมาณของไซยานิดิน ในข้าวเหนียวก่ำพันธุ์พื้นเมืองแต่ละพันธุกรรม ที่คำนวณได้

2.บันทึกปริมาณของอะมิโลสในข้าวเหนียวก่ำพันธุ์พื้นเมืองแต่ละพันธุกรรมที่คำนวณได้

3.บันทึกชนิดของอะมิโนจำเป็นที่พบในข้าวเหนียวก่ำพื้นเมืองแต่ละพันธุกรรม

4.บันทึกลักษณะทางคุณภาพของเมล็ดอื่นๆได้แก่ ความยาวและความกว้างของเมล็ด, สีเปลือกเมล็ด, สีเปลือกของข้าวกล้อง, ผลผลิต และน้ำหนัก 1000 เมล็ด

5.บันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของข้าวเหนียวก่ำแต่ละพันธุกรรม ได้แก่ลักษณะสีของกาบใบ, แผ่นใบ, ปล้อง, เยื่อกันน้ำฝน และเขี้ยวใบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลอง

ศึกษาลักษณะทางคุณภาพของเมล็ดในข้าวเหนียวก่ำแต่ละพันธุกรรมจำนวน 19 พันธุกรรมและพันธุ์ตรวจสอบ 3 พันธุกรรม โดยเก็บตัวอย่างเมล็ดทุกต้นแล้วทำการสุ่มตัวอย่างเมล็ดในแต่ละพันธุกรรมมาทำการวิเคราะห์ ดังนี้

1.การวัดปริมาณของไซยานิดิน (cyanidin 3-glucoside) โดยใช้เทคนิค HPLC

วิธีการวิเคราะห์ไซยานิดิน (cyanidin 3-glucoside)

เก็บตัวอย่างเมล็ดทุกต้นแล้วทำการสุ่มตัวอย่างเมล็ดในแต่ละพันธุ์จากนำไปสกัดไซยานิดิน (cyanidin 3-glucoside) ในส่วนของเมล็ด โดยวิธีของ Ryu *et al.*, (1998) นำตัวอย่างของข้าวเหนียวก่ำพันธุ์พื้นเมือง 1 กรัม มาสกัดในสารสกัด 0.5%TFA-95%EtOH ปริมาตร 20 ml. จากนั้นนำเข้าเครื่องเขย่าเป็นเวลา 9 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 25 องศาเซลเซียส) ตัวอย่างที่สกัดที่ได้นำมากรองเอากากออกเบื้องต้นโดยใช้กระดาษกรองเบอร์ 4 จากนั้นกรองซ้ำอีกครั้งโดยใช้ C_{18} cartridge (กรองสารสกัดเก็บไว้ประมาณ 10 ml.) นำสารสกัดที่กรองเสร็จไปวิเคราะห์ในเครื่อง HPLC เพื่อวัดปริมาณไซยานิดิน โดยใช้ reversed phase ODS C_{18} คอลัมน์ ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 280 nm มี mobile phase A คือ 0.1%TFA-H_2O และ mobile phase B คือ 0.1%TFA-MeOH เปลี่ยน mobile phase A ไปเป็น B โดยใช้สมการเส้นตรงจาก 0.1%TFA-H_2O ไปเป็น 0.1%TFA-MeOH ใช้เวลา 30 นาที ที่อัตราการไหล 1.0 ml./min. จากนั้นนำไปวิเคราะห์และเปรียบเทียบกับปริมาณไซยานิดินมาตรฐานต่อไป

บันทึกข้อมูล

ปริมาณของไซยานิดิน ในข้าวเหนียวก่ำพันธุ์พื้นเมืองแต่ละพันธุกรรม ที่คำนวณได้

2.การวัดปริมาณอะมิโลสที่สะสมอยู่ในส่วนของเมล็ดของตัวอย่างข้าวเหนียวก่ำพันธุ์พื้นเมือง

วิธีการสกัดและวัดปริมาณอะมิโลส (amylose)

เก็บตัวอย่างเมล็ดทุกต้นแล้วทำการสุ่มตัวอย่างเมล็ดในแต่ละพันธุ์ จากนั้นนำตัวอย่างมาบดละเอียด ชั่งปริมาณ 0.1 กรัมใส่หลอดทดลอง เติมสารละลาย NaOH ,2N จำนวน 9 ml. แล้วเติม EtOH 95% 1ml. นำไปเขย่า 10 นาทีจากนั้นดูดสารละลายที่เตรียมมา 5 ml. ใส่ใน volumetric flask ขนาด 100 ml. เติมสารละลายไอโอดีน 2 ml. และกรดเกลเซียสอะซีติก 2 ml. เขย่าให้เข้ากัน แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 ml. นำตัวอย่างที่ได้ไปอ่านค่าดูดกลืนแสงภายใต้เครื่อง spectrophotometer ที่ความ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ยาวคลื่น 620 nm. จากนั้นนำไปวิเคราะห์และเปรียบเทียบกับปริมาณ amylose มาตรฐานต่อไปงามชื่น (2541)

บันทึกข้อมูล

ปริมาณของอะมิโลสในข้าวเหนียวก่ำพันธุ์พื้นเมืองแต่ละพันธุกรรมที่คำนวณได้

3.การวิเคราะห์หากรดอะมิโนจำเป็นที่มีอยู่ในส่วนของเมล็ดของตัวอย่างข้าวเหนียวก่ำพันธุ์พื้นเมือง

ทำการสุ่มข้าวเหนียวก่ำจากการกระจายตัวของปริมาณไซยานิดิน 3-กลูโคไซด์มาจำนวน 10 พันธุ์ได้แก่ พันธุ์ 1.เพื่อนำไปสกัดหาชนิดของกรดอะมิโนจำเป็น

วิธีการวิเคราะห์หาชนิดของอะมิโนจำเป็น

นำตัวอย่างข้าวที่บดละเอียด 1.5 กรัม มา hydrolyzed ด้วย 6 M HCl 20 มิลลิลิตร และ 0.1 M Phenol 2 มิลลิลิตร แล้วทำการ reflux ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 30 ชั่วโมง ตัวอย่างที่ได้นำมากรองเอากรดเกลือที่เกินพอออก โดยใช้ desicator ที่มี NaoH (pellet) บรรจุอยู่ แล้วล้าง residue ที่ได้ด้วยน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร นำไประเหยอีกครั้งจนแห้ง นำตัวอย่างที่กรองได้ไปวิเคราะห์คุณภาพโดยใช้ TLC ทำ 2 ซ้ำ (TLC) ทำ 2 ซ้ำ ในสารละลาย 2 solution คือ

T1. Phenol : water ในอัตราส่วน 75 กรัม : 25 กรัม (3:1 w/w)

T2. Phenol : water : acetic acid ในอัตราส่วน 75 กรัม : 25 กรัม : 5 มิลลิลิตร

หลังจากนั้นนำ plate ที่ develop แล้วมาอบให้แห้ง spray ด้วย ninhydrin อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที จะเห็น spot ของกรดอะมิโนเป็นสีม่วงแดง ยกเว้น proline และ hydroxyproline จะให้ spot สีเหลือง เมื่อเปรียบเทียบค่า R_f ของ sample กับของ standard amino acid แล้วจะทราบได้ว่า spot นั้นคือ amino acid ตัวใด

บันทึกข้อมูล

- บันทึกระยะทางของสารละลายเป็นเซนติเมตร
- บันทึกระยะทางของ spot ตัวอย่าง
- หาค่า R_f value โดยคำนวณจาก

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางของจุดศูนย์กลาง spot จากจุดเริ่มต้นจนถึงจุดสุดท้าย}}{\text{ระยะทางของตัวทำละลายจากจุดเริ่มต้นจนถึง solvent front}}$$

- เปรียบเทียบกับ R_f ของ standard amino acid
- เปรียบเทียบสีของ spot ของ standard amino acid กับ spot ของสารละลายตัวอย่าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

- ชนิดของอะมิโนจำเป็นที่พบในข้าวเหนียวก่ำพื้นเมืองแต่ละพันธุกรรม

การวิเคราะห์ข้อมูล

ปริมาณความแตกต่างทางคุณภาพของเมล็ดที่คำนวณได้ในแต่ละตัวอย่างนำมาวิเคราะห์เพื่อดูความแตกต่างทางสถิติโดยใช้วิธี Analysis of variance

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved