บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การทดลองที่หนึ่ง การจำแนกพันธุ์กวาวเครือขาวโดยใช้ลักษณะทางพฤกษศาสตร์และเทคนิค ISSR-Touchdown PCR

3.1.1 ชนิดของพืช : กวาวเครือขาว ในแปลงของฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (มทส.) รวมทั้งสิ้น 36 สายต้น (ภาพที่ 3.1) ซึ่งได้จากการเพาะเมล็ดจากต้นที่ซื้อต้นพันธุ์มาจากจังหวัดประจวบคีรีขันธ์

3.1.2 การจำแนกลักษณะพฤกษศาสตร์ :

3.1.2.1 การจำแนกลักษณะพฤกษศาสตร์ตาม จรัญ ดิษฐไชยวงศ์ และคณะ (2550) ประกอบด้วย 7 ลักษณะ ได้แก่

3.1.2.1.1 สีด้านหลังใบ คำนวณจากค่า L*, a*, b* และประยุกต์วิธีการเก็บข้อมูลจาก cowpea descriptions ตามลักษณะการจำแนกพันธุ์ของ International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR) (IBPGR, 1983) โดยค่า L* คือ ทิศทางสี ในด้านความสว่าง เริ่มจากมืด (สีดำ) L*= 0 ถึง สว่าง (สีขาว) L*= 100, ค่า a* คือ ทิศทางสี เริ่มจากสีแดง (+a) ถึง สีเขียว (-a), ค่า b* คือ ทิศทางสี เริ่มจากสีเหลือง (+b) ถึง สีน้ำเงิน (-b) ด้วยเครื่อง Minolta CR-300 ตามระบบ The Hunter L, a, b Color Space (DeMan, 1999) และค่า x และ y = ค่าสีตามระบบ CIE chromaticity diagram (DeMan, 1999)

3.1.2.1.2 ลักษณะใบ ได้แก่ รูปร่างใบ [ovate (ใบรูปไข่), elliptic (ใบรูปรี)], ฐานใบ [obtuse (ฐานใบมน), acute (ฐานใบแหลม)], ปลายใบ [cuspidate (ปลายใบเป็นติ่งแหลม) และ acuminate (ปลายใบเรียวแหลม)]

3.1.2.1.3 ขนบนส่วนของลำต้น

3.1.2.1.4 ขนที่ฝัก

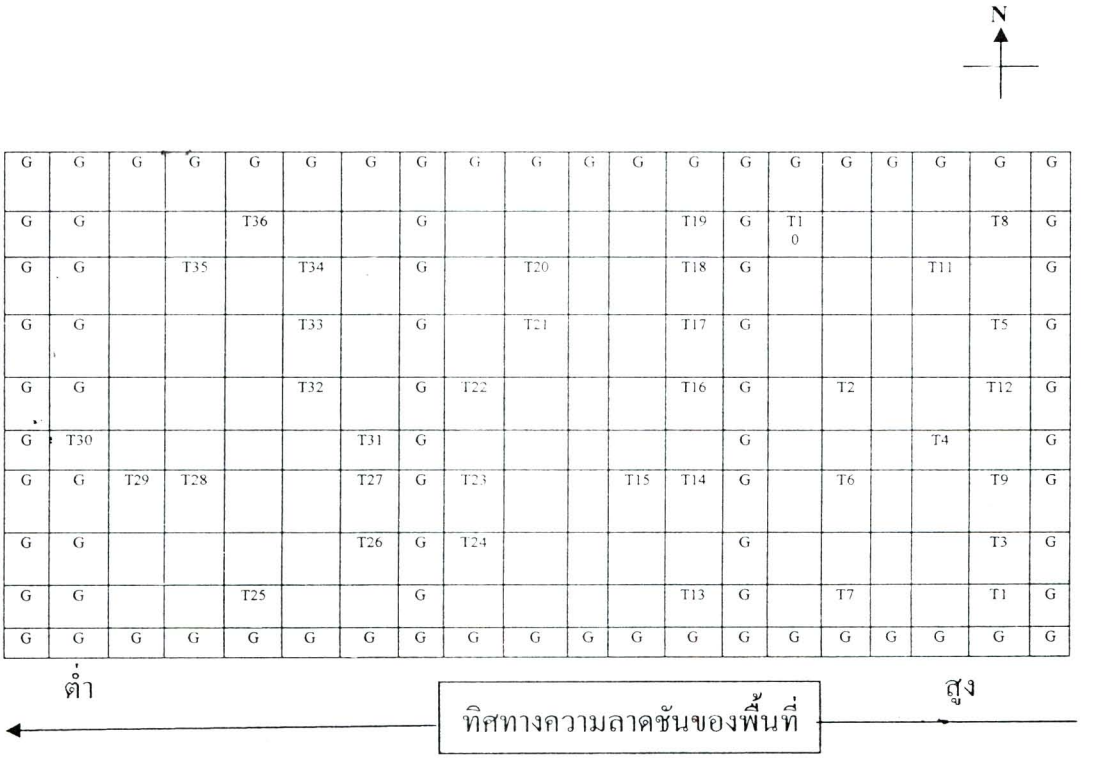
3.1.2.1.5 สีของดอก คำนวณจากค่า L*, a*, b* และประยุกต์วิธีการเก็บข้อมูลจาก cowpea descriptions (IBPGR, 1983) เช่นเดียวกับข้อ 3.2.2.1.1

3.1.2.1.6 ขนาดของใบย่อยส่วนปลาย โดยการวัดความยาวจากส่วนยอดใบถึงฐานใบ และความกว้างโดยการวัดส่วนที่กว้างที่สุดของใบ

3.1.2.1.7 ความยาวก้านช่อดอก

3.1.2.2 การวิเคราะห์ความแตกต่างลักษณะทางพฤกษศาสตร์ ใช้ลักษณะพฤกษศาสตร์ 7 ลักษณะ ได้แก่ สีด้านหลังใบ ลักษณะใบ ขนบนส่วนของลำต้น ขนที่ฝัก สีของดอก ขนาดของใบ และ

ความยาวก้านช่อดอก มาใช้ในการแยกความแตกต่างระหว่างต้นโดยต้นที่มีลักษณะเดียวกันให้คะแนนเป็น 1 หรือ 0 เมื่อปรากฏหรือไม่ปรากฏลักษณะที่ตำแหน่งเดียวกันคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงตามวิธี Jaccard similarity และจัดกลุ่มความสัมพันธ์ (dendrogram) โดยวิธี Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) ด้วยโปรแกรม NTSYS pc v.21 (Biostatistics, Inc.) และ Winboot program (Yap and Nelson, 1996) ซึ่งกำหนดการวิเคราะห์หาค่า Bootstrap จำนวน 1000 ซ้ำของการสุ่มวิเคราะห์ของการสร้าง Consensus tree วิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วย Principle component analysis (PCA) และหาความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มประชากร (Nei, 1972) ด้วยโปรแกรม POPGENE V1.31 (Yeh, Yang and Boyle, 1999)



ภาพที่ 3.1 ผังแปลงทดลองกวาวเครือขาวที่ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (T1-T36=สายต้นที่ 1-36, G=แนวป้องกัน)

3.1.3 การจำแนกด้วยเทคนิค ISSR-Touchdown PCR : ทำการทดลองที่ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น

3.1.3.1 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนโดยประยุกต์จากวิธีการของ Li and Midmore (1999) โดยบดใบพืชในโกร่งด้วยไนโตรเจนเหลวจนเป็นผงละเอียด ตักผงตัวอย่างใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ (microcentrifuge tube) ที่มีบัฟเฟอร์สำหรับสกัด (extraction buffer : 2% CTAB, 1.4 M NaCl,

0.1 M Tris pH 8.0, 0.02 M EDTA pH 8.0, 1% PVP และ 1% β-mercapto ethanol) 500 µl นำไปอุ่นที่ 65°C 30 นาที จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที (16,500 g) นาน 5 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ แล้วเติมสารละลาย chloroform : isoamyl (24 : 1) ปริมาตร 1 เท่า เขย่า และปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดสารละลายส่วนบนใส่หลอดไมโครฟิวส์ใหม่ นำไปอุ่นที่ 55°C 30 นาที แล้วแช่เย็นที่ 4°C 5 นาที เติม isopropanol ปริมาตร 1 เท่ากลับหลอดไปมาเบาๆ จะเห็นตะกอนดีเอ็นเอ แล้วปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที (16,500 g) นาน 5 นาที เทสาร ละลายทิ้งแล้วล้างตะกอนด้วยเอทานอล 70% 1 ครั้ง ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง จากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอโดยใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 180 µl เติม 5 M NaCl 20 µl และเอทานอล 95% 400 µl พลิกหลอดกลับไปมาเบาๆ จนเห็นตะกอนดีเอ็นเอ แล้วปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทสารละลายทิ้งแล้วล้างตะกอนด้วย เอทานอล 70% อีก 2 ครั้ง ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง เติมสารละลาย TE ที่มี RNase (10 mg/ml) ปริมาตร 40 µl เก็บดีเอ็นเอที่ -20°C

จากนั้นตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอโดยวิธีอิเลคโตรโฟริซิสโดยใช้อะกาโรสเจลความเข้มข้น 1% ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.5x TBE ผสมดีเอ็นเอที่สกัดได้ 5 µl 6X Loading dye 2 µl ที่มี 1X Vistragreen® (Amersham, USA) และ dH_2O 5 µl รวมปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 12 µl จากนั้นหยอดตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้ลงในร่องสำหรับหยอดตัวอย่าง และหยอดดีเอ็นเอมาตรฐาน (GeneRuler™ DNA Ladder Mix, Fermentas, EU) ลงในร่องสำหรับหยอดดีเอ็นเอมาตรฐานลงบนอะกาโรสเจล ผ่านกระแสไฟฟ้าโดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นานประมาณ 50-60 นาที ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง Gel Ducumentation System (Vilber Lourmat, France) และบันทึกภาพที่ได้

3.1.3.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิควิธี ISSS-Touchdown PCR

นำดีเอ็นเอที่ได้มาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี PCR ตามวิธีการของ Sakuanrungsirikul, *et al.*, (2005*a*) ตามสภาวะดังนี้ สารละลายดีเอ็นเอที่เจือจางจนเหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา (10-30 ng) 3.5 µl, 10x Taq buffer with $(NH_4)_2SO_4$ (Fermentas) 1.5 µl, 25 mM $MgCl_2$ 0.9 µl, 20 mM dNTPs 0.9 µl, 5 U *Taq* DNA polymerase (Fermentas) 0.187 µl, dH_2O 6.263 µl และ 20 µM ISSR 0.75 µl ในปริมาตรรวม 15 µl จำนวนไพรเมอร์ที่ใช้ 41 ไพรเมอร์ (ตารางที่ 3.5) ใช้โปรแกรมควบคุมอุณหภูมิด้วยเครื่อง Thermal cycler (PE Applied Biosystem, PCR System 9700) ดังนี้ ใช้อุณหภูมิ 94°C นาน 5 นาที ตามด้วย touchdown PCR จำนวน 5 รอบ ประกอบด้วยอุณหภูมิ 94°C นาน 30 วินาที, 52°C นาน 1 นาที, 72°C นาน 1 นาที โดยอุณหภูมิลดลง 1°C ทุก 1 รอบ จากนั้นตามด้วย PCR ปกติจำนวน 30 รอบ ประกอบด้วยอุณหภูมิ 94°C 1 นาที, 48°C 1 นาที, 72°C 1 นาที และสุดท้ายการสังเคราะห์ ดีเอ็นเอให้เสร็จสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 72°C นาน 5 นาที เก็บผลที่ได้ที่ 4°C

ทำการแยกขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากผลผลิตปฏิกิริยา PCR โดยวิธีอิเลคโตรโฟริซิสโดยใช้อะกาโรสความเข้มข้น 1% ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.5x TBE ผสมดีเอ็นเอที่สกัดได้ 5 µl

6X Loading dye ที่มี 1X Vistragreen® (Amersham, USA) 2 µl และdH_2O 5 µl รวมปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 12 µl จากนั้นหยอดตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้ลงในร่องสำหรับหยอดตัวอย่าง และหยอดดีเอ็นเอมาตรฐาน (GeneRuler™ DNA Ladder Mix, Fermentas, EU) ลงในร่องสำหรับหยอดดีเอ็นเอมาตรฐานลงบนอะกาโรสเจล ผ่านกระแสไฟฟ้าโดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นานประมาณ 50-60 นาที ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง Gel Ducumentation System (Vilber Lourmat, France) ทำซ้ำด้วยวิธี PCR ทั้ง 36 ต้น เพื่อยืนยันผลของ PCR ที่ได้ของการทดลอง

3.1.3.3 การวิเคราะห์ข้อมูลแถบดีเอ็นเอ วัดน้ำหนักโมเลกุลด้วยโปรแกรม PhotoCapt (Vilber Lourmat, France) กำหนดแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวกันเป็นหนึ่งลักษณะ ให้ค่าคะแนนเป็น 1 หรือ 0 เมื่อปรากฏหรือไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวกันนั้น

3.1.3.4 การวิเคราะห์ความใกล้ชิดทางพันธุกรรม คำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงตามวิธี Jaccard similarity และจัดกลุ่มความสัมพันธ์ (dendrogram) โดยวิธี UPGMA ด้วยโปรแกรม NTSYS pc v.21 (Biostatistics, Inc.) และ Winboot program (Yap and Nelson, 1996) ซึ่งกำหนดการวิเคราะห์หาค่า bootstrap จำนวน 1,000 ซ้ำของการสุ่มวิเคราะห์ของการสร้าง consensus tree วิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วย PCA และหาความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มประชากร (Nei, 1972) ด้วยโปรแกรม POPGENE V1.31 (Yeh, Yang and Boyle, 1999)

3.2 การทดลองที่สอง ชนิดและความเข้มข้นของสารชักนำต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและการเจริญเติบโตของกวาวเครือขาว

ทำการทดลองที่ห้องปฏิบัติการสรีรวิทยาพืช มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยแบ่งเป็น 3 การทดลองย่อย ก่อนการชักนำเตรียมต้นกวาวเครือขาวจากการเพาะเมล็ดและปลูกใน growth chamber ที่กำหนดค่าความชื้นสัมพัทธ์เท่ากับ 85 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิกลางวัน/กลางคืน เท่ากับ 27/25 °C ช่วงแสงกลางวัน/กลางคืน 14/10 ชั่วโมง ความเข้มแสงเท่ากับ 270 ลักซ์ เมื่อต้นกวาวเครือขาวอายุ 4 เดือน จึงทำการทดลอง โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD 5 ทรีตเมนต์ (ความเข้มข้นของสารแต่ละชนิด) ทรีตเมนต์ ละ 12 ซ้ำ (1 ต้น/ซ้ำ) ดังแสดงในตาราง ที่ 3.1

3.2.1 การชักนำด้วยไคโตซาน

3.2.1.1 การเตรียมสารชักนำ นำผงไคโตซานขนาด 0.01 0.5 1.0 และ 1.5 กรัม นำใส่ในน้ำสะอาด ปริมาตร 990 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน เติมกรดอะซิติกเข้มข้น (glacial acetic acid) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และคนจนผงไคโตซานละลายหมดจะได้สารละลายไคโตซานเข้มข้น 0, 10, 500 1,000 และ 1,500 มิลลิกรัม/ลิตร ในกรดอะซิติก 1 เปอร์เซ็นต์

3.2.1.2 การชักนำ เมื่อกวาวเครือขาวที่ปลูกใน growth chamber อายุ 4 เดือน จึงทำการชักนำโดยนำสารละลายแต่ละความเข้มข้นไปราดลงดินบริเวณโคนต้นกวาวเครือขาวแล้วพรวน

ดินกลบ ทำทั้งหมด 4 ครั้ง แต่ละครั้ง ห่างกัน 7 วัน จากนั้นเก็บข้อมูลจากทุกทรีตเมนต์ หลังจากทำการชักนำครั้งที่ 4 แล้ว 1 วัน 7 วัน 15 วัน และ 30 วัน เพื่อวิเคราะห์ผลที่เกิดขึ้นต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิค ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ พื้นที่ใบ อัตราการสังเคราะห์แสง อัตราส่วนของน้ำหนักสด/น้ำหนักแห้ง และน้ำหนักสารสกัดหยาบที่สกัดได้จากแต่ละทรีตเมนต์

ตารางที่ 3.1 การทดลองและระดับความเข้มข้นของสารชักนำในแต่ละการทดลองย่อย

ชนิดของสารชักนำ	ความเข้มข้น (มิลลิกรัม/ลิตร)
การทดลองที่ 3.1 ไคโตซาน	0, 10, 500, 1000 และ 1500 (Al-Tawaha *et al.*, 2005)
การทดลองที่ 3.2 กรดซาลิไซลิก	0, 10, 100, 150 และ 200 (Kneer *et al.*, 1999)
การทดลองที่ 3.3 คอปเปอร์คลอไรด์	0, 10 , 100, 200, และ 300 (ประสาร ฉลาดคิด, 2546)

3.2.1.3 การสกัดสารจากหัวกวาวเครือขาว ใช้วิธีของวิโรจน์ เชาว์วิเศษ (2550) โดยอบหัวกวาวเครือขาวแต่ละตัวอย่างที่หั่นเป็นชิ้นบาง ๆ ที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง บดให้ละเอียดด้วยเครื่องบด (ultra centrifuge mill) จะได้ผงกวาวเครือขาวที่มีขนาดของอนุภาค 100 mesh ชั่งผงกวาวเครือขาวหนัก 10 กรัม ใส่6+ขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร เติมเอทานอล ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วจึงเขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง (Whatman เบอร์ 42) แล้วจึงนำสารละลายที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4000 รอบ/นาที (Yu *et al.*, 2000) เป็นเวลา 12 นาที แล้วแยกสารละลายส่วนที่ใสไประเหยตัวทำละลายออกด้วย rotary evaporator ภายใต้การลดอุณหภูมิและความดันบรรยากาศ จนได้สารสกัดซึ่งมีความหนืด สีน้ำตาลติดอยู่ใน flask ชั่งน้ำหนักของสารสกัดกวาวเครือขาวที่สกัดได้และเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำ -20°C เพื่อรอการวิเคราะห์ในกรณีต่าง ๆ ต่อไป

3.2.1.4 วัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ใช้วิธีการทดลองของ Brand-Williams *et al.*, (1995) นำสารที่สกัดได้จากแต่ละทรีตเมนต์ 1.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย DPPH (ที่ละลายในเมทานอล) ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร นำไปบ่มไว้ในที่มืดอุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง 517 นาโนเมตร และคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสารอนุมูลอิสระจากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสารอนุมูลอิสระ} = \{ [Abs_{control} - Abs_{sample}] / Abs_{control} \} \times 100$$

Abs_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัด 1.5 มิลลิลิตรผสมกับสารละลาย DPPH 1.5 มิลลิลิตร

$Abs_{control}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ผสม กับเมทานอล 1.5 มิลลิลิตร

3.2.1.5 การวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ตามวิธีของ Benzie and Strain (1999) สร้างกราฟมาตรฐานของ ferrous sulfate ($FeSO_4.7H_2O$) โดยผสมสารละลาย $FeSO_4$ ความเข้มข้น 0.101-1.011 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร กับสารละลาย FRAP reagent ปริมาตร 950 ไมโครลิตร และผสม FRAP reagent กับเมทานอล (สารละลายควบคุม) ที่บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร โดยใช้สารละลาย acetate buffer pH 3.6 เป็น blank สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของ $FeSO_4$ กับค่าผลต่างของค่าดูดกลืนแสงที่ 593 นาโนเมตร (ค่าการดูดกลืนแสงของสาร $FeSO_4$–ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายควบคุม) แล้วคำนวณหาสมการเส้นตรง (ภาพผนวกที่ 1) เพื่อใช้คำนวณค่า FRAP value ของแต่ละตัวอย่าง กรณีหาค่า FRAP value ของตัวอย่าง ให้ผสมสารสกัดของแต่ละตัวอย่าง ความเข้มข้น 100 มิลลิลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร กับ FRAP reagent ปริมาตร 950 ไมโครลิตร วัดค่าดูดกลืนแสง แล้วคำนวณ ค่าผลต่างของค่าดูดกลืนแสงที่ 593 นาโนเมตร ของแต่ละตัวอย่าง แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวณค่า FRAP value

3.2.1.6 การตรวจหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิค ตามวิธีการของ Singleton *et al.* (1965) โดยผสมสารสกัดแต่ละตัวอย่าง ความเข้มข้น 0.0263 กรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร กับสารละลาย folin-ciocalteu's phenol reagent ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ใน volumetric flask ทิ้งไว้ 10 นาที เติมสารละลาย 7.5 เปอร์เซ็นต์ ของสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (w/v) ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 760 นาโนเมตร โดยใช้เมทานอล 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารต่าง ๆ แทนการใช้สารละลายตัวอย่างเพื่อใช้เป็น blank นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปคำนวณหาปริมาณสารฟีนอลิคโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิค (gallic acid) สร้างกราฟมาตรฐานของกรดแกลิค ความเข้มข้น 1-100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยผสมกรดแกลิคแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร กับสารละลายต่าง ๆ เช่นเดียวกับกรณีของสารสกัดแต่ละตัวอย่าง วัดค่าการดูดกลืนแสงแล้วสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของกรดแกลิค (ภาพผนวกที่ 2) รายงานปริมาณฟีนอลิคของแต่ละทรีตเมนต์ เป็นค่า gallic acid equivalent

3.2.1.7 ตรวจหาฟลาโวนอยด์ ด้วย aluminium chloride complex colorimatric method ตามวิธีของ Chang *et al.* (2002) โดยผสมสารสกัดความเข้มข้น 0.0263 กรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร กับ เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติมอลูมิเนียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และโพแทสเซียมอะซีเตท ความเข้มข้น 1 โมล ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงวัดการดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณฟลาโวนอยด์โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของเคอร์ซีติน (quercetin) การสร้างกราฟมาตรฐานของเคอร์ซีติน

ความเข้มข้น 1-16 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ใช้ขั้นตอนและผสมกับสารละลายต่าง ๆ เหมือนกรณีของสารสกัดตัวอย่าง วัดค่าการดูดกลืนแสงแล้วสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารเคอร์ซีติน (ภาพผนวกที่ 3) และรายงานปริมาณฟลาโวนอยด์ของแต่ละทรีตเมนต์เป็นค่า quercetin equivalent

3.2.1.8 การวัดตัวแปรที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต ตัวแปรที่วัดได้แก่ พื้นที่ใบของกวาวเครือขาวด้วยเครื่อง delta-T image analysis system วัดอัตราการสังเคราะห์แสงด้วยเครื่อง Portable Photosynthesis รุ่น LCA-4 (portable photosynthesis and transpiration measurement system) คำนวนอัตราส่วนของน้ำหนักสด/น้ำหนักแห้งของแต่ละตัวอย่างและชั่งน้ำหนักของสารสกัดหยาบที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่าง

3.2.1.9 การวิเคราะห์ข้อมูล วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล (ANOVA) ของทุกตัวแปร (ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารฟีนอลิค ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ อัตราส่วนน้ำหนักสด/แห้ง น้ำหนักของสารที่สกัดได้และอัตราการสังเคราะห์แสง) ของแต่ความเข้มข้น ในแต่ละการทดลอง ด้วยวิธี F-test และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละความเข้มข้นด้วยวิธี Duncan's Multiple Rang Test (DMRT) ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป SPSS version 14 (Statistical Package for Social Science) (Levesque and SPSS Inc., 2006) โดยวิเคราะห์แยกตามวันที่เก็บข้อมูลหลังการชักนำและแสดงผลในรูปของกราฟแท่งที่กำกับด้วยตัวอักษรแสดงความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ย โดยค่าข้อมูลที่ปรากฏในวันเดียวกัน ที่ถูกกำกับด้วยตัวอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

3.2.2 การชักนำด้วยกรดซาลิไซลิก

3.2.2.1 การเตรียมสารชักนำ เตรียมสารละลายกรดซาลิไซลิกความเข้มข้น 0 10 100 150 และ 200 มิลลิกรัม/ลิตร โดยชั่งกรดซาลิไซลิก 0.01 1.1 1.5 และ 2.0 กรัม แล้วละลายด้วยสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 0.5 โมลาห์ ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร

3.2.2.2 การชักนำ เมื่อกวาวเครือขาวใน growth chamber มีอายุ 4 เดือน นำสารละลายแต่ละความเข้มข้นไปฉีดพ่นให้ทั่วทั้งต้นจนสารละลายหยดลงจากใบ ทำการชักนำ 4 ครั้ง แต่ละครั้ง ห่างกัน 7 วัน เก็บข้อมูลเพื่อวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิค ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ วัดพื้นที่ใบ อัตราการสังเคราะห์แสง คำนวนอัตราส่วนของน้ำหนักสด/น้ำหนักแห้ง และชั่งน้ำหนักของสารสกัดหยาบของแต่ละทรีตเมนต์ และวิเคราะห์ข้อมูล เหมือนการทดลองที่ 1

3.2.3 การชักนำด้วยคอปเปอร์คลอไรด์

เตรียมสารละลายความเข้มข้น 0 10 100 200 และ 300 มิลลิกรัม/ลิตร โดยเตรียม stock solution ของทองแดงความเข้มข้น 10,000 มิลลิกรัม/ลิตร จาก คอปเปอร์คลอไรด์ โดยชั่งสาร 2.68

กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร เตรียมสารละลายทองแดงความเข้มข้น 10 100 200 และ 300 มิลลิกรัม/ลิตร จากคอปเปอร์คลอไรด์โดยใช้ stock solution ของคอปเปอร์คลอไรด์ ปริมาตร 1 10 20 และ 30 มิลลิลิตรตามลำดับ ละลายในน้ำแล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร การชักนำทำเหมือนการทดลองที่ 2

3.2.4 ตรวจหาการมีอยู่ของพิวรารินและจีนิสทีอิน

ตรวจหาการมีอยู่ของสารทั้งสองในทุกทรีตเมนต์ด้วย thin layer chromatography (TLC) ใช้วิธีการทดสอบของ Dan *et al.* (2004) โดยการจุด (spot) สารมาตรฐานของสารพิวรารินและสารจีนิสทีอินที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร และจุดสารสกัดหยาบของแต่ละทรีตเมนต์อย่างละ 2 ไมโครลิตรลงบน TLC silicagel 60 F_{254} (MERK) ขนาด 10 x 10 เซนติเมตร แล้ว develop ด้วยตัวทำละลายเคลื่อนได้แก่ *n*-butanol : acetic acid : น้ำ (5 : 3 : 1 โดยปริมาตร) แล้วตรวจหาสารพิวรารินภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร และสารจีนิสทีอินภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร เปรียบเทียบค่า retention mobility (R_f) ของสารสกัดหยาบของแต่ละทรีตเมนต์กับสารละลายมาตรฐาน ยืนยันผลการตรวจหาโดยนำแผ่น TLC แผ่นเดิมมาอบที่อุณหภูมิ 110°C เป็นเวลา 10 นาที เปรียบเทียบตำแหน่งของสารทั้งสองในแต่ละตัวอย่างกับสารละลายมาตรฐานของสารพิวรารินและสารจีนิสทีอิน

3.3 การทดลองที่สาม พิวราริน จีนิสทีอิน และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในกวาวเครือขาวที่ถูกชักนำด้วยไคโตซาน กรดซาลิไซลิก และคอปเปอร์คลอไรด์ในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน

3.3.1 การเตรียมสารชักนำและต้นกวาวเครือขาว

สารที่ใช้ชักนำทั้ง 8 ทรีตเมนต์ ได้จากการนำไคโตซาน ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร คอปเปอร์คลอไรด์ 200 มิลลิกรัม/ลิตร และกรดซาลิไซลิก 100 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งเป็นสารชักนำที่ดีที่สุดจากการทดลองในบทที่ 3 ใช้เป็นสารชักนำร่วมกัน โดยจัดเป็นทรีตเมนต์ได้ทั้งหมด 8 ทรีตเมนต์ ดังนี้

ทรีตเมนต์ที่ 1 ฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่น (control)

ทรีตเมนต์ที่ 2 ฉีดพ่นด้วยกรดซาลิไซลิกที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร (SA)

ทรีตเมนต์ที่ 3 ฉีดพ่นด้วยคอปเปอร์คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร ($CuCl_2$)

ทรีตเมนต์ที่ 4 ฉีดพ่นด้วยคอปเปอร์คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับกรดซาลิไซลิกความที่เข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร ($CuCl_2$ + SA)

ทรีตเมนต์ที่ 5 ราดโคนต้นด้วยไคโตซานที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร (Chitosan)

ทรีตเมนต์ที่ 6 ราดโคนต้นด้วยไคโตซานที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับฉีดพ่นกรดซาลิไซลิกที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร (Chitosan + SA)

ทรีตเมนต์ที่ 7 ราดโคนต้นด้วยไคโตซานที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร ฉีดพ่นด้วยคอปเปอร์คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร (Chitosan + $CuCl_2$)

ทรีตเมนต์ที่ 8 ราดโคนต้นด้วยไคโตซานที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับการฉีดพ่นด้วยคอปเปอร์คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร และกรดซาลิไซลิกที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร (Chitosan + $CuCl_2$ + SA)

นำทรีตเมนต์ทั้งหมดไปชักนำในกวาวเครือขาวที่ปลูกใน growth chamber ในโรงเรือนและในแปลงทดลอง ก่อนการชักนำเตรียมต้นพืชและวางแผนการทดลอง ดังนี้

การปลูกใน growth chamber ทำการทดลองที่ห้องปฏิบัติการสรีรวิทยาพืช อาคารเครื่องมือ 3 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยนำต้นกวาวเครือขาว อายุ 3 เดือน ที่ได้จากการเพาะเมล็ดและปลูกในกระถางที่บรรจุดินปลูกสำเร็จรูป (ดินปลูก มทส) เข้า growth chamber ที่ตั้งค่าความชื้นสัมพัทธ์ 85 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 27/25°C ช่วงแสง 14/10 ชั่วโมง ความเข้มแสง 270 ลักซ์ เมื่อต้นกวาวเครือขาวอายุ 4 เดือน (ภาพผนวกที่ 4) จึงทำการชักนำ ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (complete randomized design: CRD) 8 ทรีตเมนต์ ๆ ละ 4 ซ้ำ (1 ต้น/ซ้ำ)

การปลูกในโรงเรือน (ภาพผนวกที่ 5) ทำการทดลองที่ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยนำต้นกวาวเครือขาว อายุ 3 เดือน จากการเพาะเมล็ดและปลูกในกระถางเข้าไปไว้ในโรงเรือน ให้น้ำด้วยระบบสปริงเกลอร์ (แบบปีกผีเสื้อ ติดตั้งบนหลังคาด้านในโรงเรือน) ในเวลา 9.00-9.30 ทุกวัน ให้ปุ๋ยคอกผสมปุ๋ยเคมีสูตร 15-15-15 ในอัตราส่วน 1 : 1 เดือนละ 1 ครั้ง แต่ละครั้งให้ปริมาณ 5 กรัม/ต้น ไม่ฉีดพ่นสารกำจัดศัตรูพืชตลอดการทดลอง เมื่อต้นกวาวเครือขาวอายุ 4 เดือนจึงเริ่มทำการชักนำสารสำคัญ โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ 8 ทรีตเมนต์ ๆ ละ 8 ซ้ำ (1 ต้น/ซ้ำ)

การปลูกในแปลงทดลอง (ภาพผนวกที่ 6) ทำการทดลองที่ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีโดยนำเอาต้นกวาวเครือขาว อายุ 3 เดือน ที่ได้จากการเพาะเมล็ด ย้ายลงดินที่ยกร่องสูง 0.5 เมตร ด้วยระยะปลูกระหว่างแถวห่างกัน 3 เมตร และระยะระหว่างต้นห่างกัน 2 เมตร ทำค้างแบบแยกต้น ให้น้ำด้วยระบบสปริงเกลอร์ (แบบปีกผีเสื้อ ติดตั้งสูงจากโคนต้น 0.5 เมตร) ในเวลา 9.00-9.30 ทุกวัน ให้ปุ๋ยคอกผสมปุ๋ยเคมีสูตร 15-15-15 ในอัตราส่วน 1:1 เดือนละ 1 ครั้ง แต่ละครั้งให้ปริมาณ 5 กรัม/ต้น ไม่ฉีดพ่นสารกำจัดศัตรูพืชตลอดการทดลอง เมื่อต้นกวาวเครือขาวอายุ 12 เดือน และใบอยู่ในระยะเพสลาดจึงเริ่มทำการชักนำ (ไม่สามารถชักนำที่อายุ 8 เดือนได้ เนื่องจากกวาวเครือขาวอยู่ในระยะใบแก่และกำลังผลัดใบ) ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ภายในบล็อก (randomized complete block design: RCB) 8 ทรีตเมนต์ ๆ ละ 3 ซ้ำ (block) ซ้ำละ 4 ต้น

เมื่อต้นกวาวเครือขาวในแต่ละกรณี ถึงระยะที่ต้องทำการชักนำด้วยทรีตเมนต์ต่าง ๆ ตามแผนการทดลอง จึงใช้ทรีตเมนต์ทั้ง 8 ชนิด มาชักนำอย่างต่อเนื่องจำนวน 4 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 7

วัน โดยการฉีดพ่นลงบนต้นกวาวเครือขาว (กรณีคอปเปอร์คลอไรด์และกรดซาลิไซลิก) หรือราดลงดินบริเวณโคนต้นแล้วพรวนดินกลบไว้ (กรณีไคโตซาน) เก็บข้อมูลจากทุกทรีตเมนต์ หลังการชักนำครั้งสุดท้าย 15 วัน เพื่อเปรียบเทียบปริมาณพิวรารินและจีนิสทีอิน ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารฟีนอลลิค ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ และผลที่มีต่อการเจริญเติบโตของต้นกวาวเครือขาว ได้แก่ อัตราส่วนน้ำหนักสด/แห้งของหัว น้ำหนักของสารที่สกัดได้และอัตราการสังเคราะห์แสง (วัดด้วยเครื่อง leaf chamber analysis type LCA-4) ในเวลา 10.00-12.00 นาฬิกา

3.3.2 การสกัดสารจากหัวกวาวเครือขาว

ตามวิธีของ วิโรจน์ เชาว์วิเศษ (2550) โดยอบหัวกวาวเครือขาวแต่ละตัวอย่างที่หั่นเป็นชิ้นบาง ๆ ที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดชนิด ultra centrifuge mill ได้ผงกวาวเครือขาวที่มีขนาดอนุภาค 100 mesh จากนั้นชั่งผงกวาวเครือขาว 10 กรัม ใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร เติมเอทานอล ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วจึงเขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง (whatman เบอร์ 42) แล้วจึงนำสารละลายที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที (Yu *et al.*, 2000) เป็นเวลา 12 นาที แยกเอาสารละลายส่วนที่ใสไประเหยตัวทำละลายออกภายใต้สภาวะอุณหภูมิต่ำและการลดความดันบรรยากาศ จนได้สารสกัดสีน้ำตาล ติดอยู่ใน flask ที่ใช้ระเหยตัวทำละลาย บันทึกน้ำหนักของสารที่สกัดจากหัวกวาวเครือขาว แล้วเก็บในอุณหภูมิ -20°C

3.3.3 การตรวจหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิค

ตามวิธีการของ Singleton *et al.* (1965) โดยผสมสารสกัดแต่ละตัวอย่าง ความเข้มข้น 0.0263 กรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรกับสารละลาย folin-ciocalteu's phenol reagent ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ใน volumetric flash ทิ้งไว้ 10 นาที เติมสารละลาย 7.5 เปอร์เซ็นต์ ของสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (w/v) ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 760 นาโนเมตร โดยใช้เมทานอล 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารต่าง ๆ แทนการใช้สารละลายตัวอย่างเพื่อใช้เป็น blank นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปคำนวณหาปริมาณสารฟีนอลิคโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลิค (gallic acid) สร้างกราฟมาตรฐานของกรดแกลิค ความเข้มข้น 1-100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยผสมกรดแกลิคแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร กับสารละลายต่าง ๆ เช่นเดียวกับกรณีของสารสกัดแต่ละตัวอย่าง วัดค่าการดูดกลืนแสงแล้วสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของกรดแกลิค รายงานปริมาณฟีนอลิคของแต่ละทรีตเมนต์ เป็นค่า gallic acid equivalent

3.3.4 การตรวจหาฟลาโวนอยด์

ด้วยวิธี aluminium chloride flavonoids complex colorimatric method ตามวิธีของ Chang *et al.* (2002) และ Harbone (1998) โดยผสมสารสกัดแต่ละตัวอย่าง ความเข้มข้น 0.0263 กรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร กับ เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติมอลูมิเนียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และโพแทสเซียมอะซีเตท ความเข้มข้น 1 โมล ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงวัดการดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณฟลาโวนอยด์โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของเคอร์ซีติน (quercetin) การสร้างกราฟมาตรฐานของเคอร์ซีตินความเข้มข้น 1-16 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ใช้ขั้นตอนและผสมกับสารละลายต่าง ๆ เหมือนกรณีของสารสกัดตัวอย่าง วัดค่าการดูดกลืนแสงแล้วสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารเคอร์ซีตินและรายงานปริมาณฟลาโวนอยด์ของแต่ละทรีตเมนต์เป็นค่า quercetin equivalent

3.3.5 การหาปริมาณของพิวรารินและจีนิสทีอินด้วย HPLC

ตามวิธีของ Zhang *et al.* (1999) และวิโรจน์ เชาว์วิเศษ (2550) โดยกรองสารละลายของสารสกัดกวาวเครือขาวแต่ละตัวอย่างด้วยกระดาษกรองไนลอนเมมเบรน ขนาด 0.45 ไมโครเมตร เก็บสารละลายที่กรองได้ใน vial ขนาด 1.5 มิลลิลิตร วิเคราะห์ด้วย HPLC (Hewlett-Packard 1050 Series) ที่ใช้ diode array เป็น detector โดยฉีดสารสกัด 20 ไมโครลิตร/ครั้ง/ตัวอย่าง ผ่านคอลัมน์ชนิด RP-C_{18} Agilent®column (4.6x150 มิลลิเมตร) ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของคอลัมน์เท่ากับ 5 ไมโครเมตร ใช้เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) คือ 0.1 เปอร์เซ็นต์ (v/v) acetic acid ในน้ำ (A) และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ (v/v) acetic acid ใน acetonitrile (B) โดยทำเป็น gradient (ตารางที่ 3.2) ใช้อัตราการเคลื่อนที่ของสารเท่ากับ 1.0 มิลลิลิตร/นาที อุณหภูมิของระบบเท่ากับ 30°C คำนวณพื้นที่ใต้กราฟด้วยโปรแกรม Chem station 3D (Hewlett-Packard Company, Scientific Instruments Division) เปรียบเทียบตำแหน่งของสาร พิวรารินและจีนิสทีอินในสารสกัดกวาวเครือขาวแต่ละตัวอย่างกับสารมาตรฐาน แล้วนำพื้นที่ใต้กราฟของสารทั้งสองมาคำนวนหาปริมาณสารที่แต่ละตัวที่มีอยู่ในตัวอย่าง โดยแทนค่าในสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟมาตรฐานของพิวราริน (ภาพผนวกที่ 7) และจีนิสทีอิน (ภาพผนวกที่ 8) ที่วิเคราะห์ในสภาวะเดียวกับสารสกัดกวาวเครือขาว แล้วจึงคำนวณเป็นปริมาณของสารต่อหน่วยน้ำหนักแห้งเพื่อรายงานผลการวิเคราะห์ต่อไป

ตารางที่ 3.2 gradient ของเฟสเคลื่อนที่ชนิด (A) และชนิด (B)

เวลา (นาที)	ปริมาตรของเฟสเคลื่อนที่ (เปอร์เซ็นต์)	
	(A)	(B)
0	90	10
35	72	28

3.3.6 ฤทธิ์การยับยั้งสารอนุมูลอิสระ DPPH

ตามวิธีของ Brand-Williams *et al.* (1995) โดยนำสารสกัดแต่ละตัวอย่างมาละลายด้วยเมทานอลให้ได้ความเข้มข้น 750-4500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นผสมสารสกัดแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 4.9 มิลลิลิตร กับสารลาย DPPH ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาห์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เมื่อผสมให้เข้ากันแล้วบ่มไว้ในที่มืด อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร แล้วจึงคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสาร DPPH ด้วยจากสูตร

เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสารอนุมูลอิสระ = { [$Abs_{control}$ - Abs_{sample}] / $Abs_{control}$ } x 100

Abs_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัด 1.5 มิลลิลิตรผสมกับสารละลาย DPPH 1.5 มิลลิลิตร

$Abs_{control}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตรผสม กับเมทานอล 1.5 มิลลิลิตร

สร้างกราฟระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสารอนุมูลอิสระกับความเข้มข้นของสารสกัดแต่ละตัวอย่าง สร้างสมการเส้นตรงเพื่อคำนวณ IC_{50}

3.3.7 การวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP

ตามวิธีของ Benzie and Strain (1999) สร้างกราฟมาตรฐานของ ferrous sulfate ($FeSO_4.7H_2O$) โดยผสมสารละลาย $FeSO_4$ ความเข้มข้น 0.101–1.011 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมกับ FRAP reagent ปริมาตร 950 ไมโครลิตร และผสม FRAP reagent กับเมทานอล (สารละลายควบคุม) ที่บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร โดยใช้สารละลาย acetate buffer pH 3.6 เป็น blank สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของ $FeSO_4$ กับค่า ผลต่างของค่าดูดกลืนแสงที่ 593 นาโนเมตร (ค่าดูดกลืนแสงของสาร $FeSO_4$–ค่าดูดกลืนแสงของสารละลายควบคุม) แล้วคำนวณหาสมการเส้นตรง เพื่อใช้

คำนวณค่า FRAP value ของแต่ละตัวอย่าง การหาค่า FRAP value ของแต่ละตัวอย่าง ผสมสารสกัดของแต่ละตัวอย่าง ความเข้มข้น 100 มิลลิลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร กับ FRAP reagent ปริมาตร 950 ไมโครลิตร วัดค่าดูดกลืนแสง แล้วคำนวณ ผลต่างของค่าดูดกลืนแสงที่ 593 นาโนเมตร ของแต่ละตัวอย่าง นำค่าที่ได้ไปคำนวณค่า FRAP value ของตัวอย่างต่อไป

3.3.8 การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ความปรวนแปรของข้อมูล (ANOVA) ปริมาณพิวรารินี จีนิสทีอิน ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สารฟีนอลลิค สารฟลาโวนอยด์ อัตราการสังเคราะห์แสง อัตราส่วนน้ำหนักสด/แห้ง และน้ำหนักของสารที่สกัดได้ ของแต่ละทรีตเมนต์ ด้วยวิธี F-test และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย ระหว่างทรีตเมนต์ ด้วยวิธี Duncan's Multiple Rang Test (DMRT) โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป SPSS (Statistical Package for Social Science) version 14 (Levesque และ SPSS Inc., 2006)

3.4 การทดลองที่ 4 สารสกัดกวาวเครือขาวกับการลดระดับน้ำตาลในเลือดและผลกระทบต่อเนื้อเยื่อตับอ่อนและตับของหนูแรทที่เป็นเบาหวาน

3.4.1 การเตรียมการทดลอง

3.4.1.1 สารสกัดกวาวเครือขาว คัดเลือกกวาวเครือขาวจากทรีตเมนต์ที่ให้ปริมาณพิวรารินสูงที่สุด ที่ได้จากการชักนำด้วย Chitosan+$CuCl_2$ ในต้นกวาวเครือขาวที่ปลูกใน growth chamber จากการทดลองในบทที่ 4 มาใช้ทำการทดลอง เตรียมสารสกัดกวาวเครือขาวด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ โดยนำหัวกวาวเครือขาวมาล้างทำความสะอาด หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วอบแห้งที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วบดให้เป็นผงละเอียด ชั่งผงกวาวเครือขาว 5 กรัม เติมเอทิลแอลกอฮอล์ 50 มิลลิลิตร (ต่อครั้ง) คนแบบต่อเนื่องนาน 48 ชั่วโมง กรองแยกกากไปสกัดซ้ำอีกครั้ง นำเอทิลแอลกอฮอล์ที่สกัดได้ทั้งหมดมาระเหยด้วย rotary evaporation และทำให้แห้งด้วยการอบที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จะได้สารสกัดสีเหลืองอำพันโดยมี yield เท่ากับ 33.6 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง เก็บสารสกัดไว้ ที่ -20°C

3.4.1.2 สัตว์ทดลอง หนูแรท (*Rattus norvegicus*) เพศผู้พันธุ์วิสตาร์ อายุ 4 สัปดาห์ น้ำหนัก 200-250 กรัม จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติมหาวิทยาลัยมหิดล ตำบลศาลายา อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม นำมาเลี้ยงที่ห้องเลี้ยงสัตว์ทดลอง อาคารสัตว์ทดลองมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยเลี้ยงในกรงสเตนเลสที่มีขี้เลื่อยนึ่งฆ่าเชื้อเป็นวัสดุรองนอน ห้องควบคุมอุณหภูมิ 25±2°C ให้ช่วงสว่างถึงมืด 12 ชั่วโมง ช่วงสว่างเริ่มต้นเมื่อ 6.00 นาฬิกา ให้น้ำประปาและอาหารเม็ดสำเร็จรูปตลอดเวลา เนื่องจากมีปัญหาด้านการเตรียมการทดลองจึงต้องเลี้ยงหนูทดลองต่อไปจนถึงอายุ 10 สัปดาห์และมีน้ำหนักตัว 350-400 กรัม จึงได้เริ่มทำการทดลอง

3.4.1.3 การเหนี่ยวนำให้หนูเป็นเบาหวาน แบ่งหนูส่วนหนึ่งเพื่อเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานโดย งดให้อาหารหนู 16 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างเลือดโดยใช้เข็มเจาะบริเวณปลายหางหนูเพื่อตรวจระดับน้ำตาลในเลือดด้วยกลูโคมิเตอร์ (Advantage® II, Roch Diagnosis) ก่อนฉีดสเตรปโตโซโทซินในขนาด 50 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ที่ละลายในซิเตรตบัฟเฟอร์ (ภาคผนวก ก) เข้าทางช่องท้อง (intraperitoneal, ip.) (Kamalakkannan and Stanely, 2006) ในวันที่ 7 หลังฉีดสเตรปโตโซโทซินให้หนูอดอาหาร 16 ชั่วโมง เก็บเลือดมาตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือด คัดเลือกหนูที่มีระดับน้ำตาลในเลือดมากกว่า 250 มิลลิกรัม/เดซิลิตร ซึ่งเป็นหนูที่เกิดภาวะเบาหวานไปทำการทดลอง (Sabu and Subburaju, 2002)

3.4.2 ฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดของสารสกัดกวาวเครือขาวในหนูแรทที่มีภาวะกลูโคสในเลือดสูงเฉียบพลันโดยการทำ oral glucose tolerance test (OGTT)

3.4.2.1 ในหนูปกติ งดให้อาหารหนูก่อนทำการทดลอง 16 ชั่วโมง แบ่งหนูเป็น 5 กลุ่ม ๆ ละ 6 ตัว โดยแต่ละตัวต้องเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อตรวจระดับน้ำตาลในเลือดที่เวลา 0 นาที (ก่อนป้อนสาร) แล้วจึงป้อนสารตามกลุ่มที่ถูกจัดไว้ ดังนี้ กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม ป้อนน้ำกลั่นขนาด 2 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว กลุ่มที่ 2 ป้อนยาควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด กลัยเบนคลาไมด์ (daonil®) 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว กลุ่มที่ 3-4 ป้อนสารสกัดกวาวเครือขาวที่ 100 และ 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว หลังจากป้อนสารแต่ละกลุ่ม เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงป้อนกลูโคส 3 กรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว (Pushparaj *et al.*, 2000) ในหนูทุกกลุ่มแล้วทำการเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อตรวจระดับน้ำตาลในเลือดอีกครั้งหลังป้อนสารแต่ละกลุ่ม 60 120 180 และ 240 นาที การป้อนสารทำโดยนำกระบอกฉีดยาขนาด 3 มิลลิลิตร มาต่อด้วยเข็มป้อนสารลงกระเพาะ (gastric feeding needle) เบอร์ 18 จากนั้น ป้อนสารครั้งละไม่เกิน 1 มิลลิลิตร

3.4.2.2 ในหนูเบาหวาน คัดเลือกหนูที่เป็นเบาหวานเข้าทำการทดลองโดยทำการทดลองเหมือนในหนูปกติ แต่ใช้กลุ่มทดลองเพียง 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุมทำการป้อนน้ำกลั่นขนาด 2 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว กลุ่มที่ 2 ทำการป้อน กลัยเบนคลาไมด์ 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว กลุ่มที่ 3 ทำการป้อนสารสกัดกวาวเครือขาวที่ 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว และเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อตรวจระดับน้ำตาลในเลือดอีกหลังป้อนสารแต่ละกลุ่ม 30 60 120 180 240 และ 300 นาที

3.4.3 ฤทธิ์ของสารสกัดกวาวเครือขาวในการลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูแรทเบาหวานเมื่อให้สารสกัดวันละครั้งติดต่อกัน 30 วัน

แบ่งหนูที่เป็นเบาหวานออกเป็น 3 กลุ่ม ๆ ละ 6 ตัว โดยหนูกลุ่มที่ 1 คือ หนูปกติที่ป้อนน้ำกลั่นขนาด 1 มิลลิลิตร/ตัว/วัน กลุ่มที่ 2 คือ หนูเบาหวานที่ป้อนน้ำกลั่นขนาด 2 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน กลุ่มที่ 3 คือ หนูเบาหวานที่ป้อนกลัยเบนคลาไมด์ 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/

วัน กลุ่มที่ 4 คือ หนูเบาหวานที่ป้อนกวาวเครือขาว 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน (ใช้ 100 มิลลิกรัมของสารสกัดหยาบ/1กิโลกรัมนน.ตัวของหนูทำการให้ทุกวัน) ทำการป้อนน้ำหรือสาร (ของแต่ละกลุ่ม) ผ่านท่อลงสู่กระเพาะโดยตรง โดยใช้ gastric feeding needle เป็นเวลา 30 วัน เก็บเลือดและตรวจระดับน้ำตาลในเลือดทุก 7 วัน แล้วเปรียบผลการลดระดับน้ำตาลในเลือดของแต่ละทรีตเมนต์กับกลุ่มควบคุมในแต่ละครั้งของการตรวจเลือด และในทรีตเมนต์เดียวกันเปรียบเทียบระดับน้ำตาลในเลือดของการตรวจแต่ละครั้งกับข้อมูลก่อนการป้อนสาร (วันที่ 0)

3.4.4 ผลของสารสกัดกวาวเครือขาวต่อเนื้อเยื่อในตับอ่อน และตับของหนูแรทเบาหวานที่ได้รับสารสกัดเป็นเวลา 30 วัน

โดยใช้หนูจากการทดลองในหัวข้อที่ 3.4.3 หลังป้อนสารครบ 30 วัน แล้วทำการฆ่าหนูด้วยเครื่องตัดคอ จากนั้นผ่าหน้าท้องแล้วตัดตับอ่อนและตับไปคงสภาพใน neutral phosphate buffer formalin
(ภาคผนวก ข) เป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง จึงนำไปผ่านขั้นตอนจนได้เป็นสไลด์ถาวรของเนื้อเยื่อที่ย้อมด้วยสีฮีมาทอกซิลิน (Hematoxylin) และอีโอซิน (Eosin) (ภาคผนวก ค) เพื่อศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ (light microscope)

3.4.5 การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลระดับน้ำตาลในเลือดด้วย one-way analysis of variance (ANOVA) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่ม (ทรีตเมนต์) โดยใช้ duncan multiple rang test (DMRT) และเปรียบเทียบข้อมูลก่อนและหลังด้วย student's paired-t test ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$ โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป SPSS (Statistical Package for Social Science) version 14 (Levesque and SPSS Inc., 2006)