บทที่ 3

ระเบียบวิธีการวิจัย

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ สารเคมี

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. GC Apparatus: Agilent Model 6890N (G1530N), USA
2. HPLC Apparatus: Agilent Model 1100, USA
3. Pycnometer
4. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (top – load balance)
5. เครื่องชั่งแบบวิเคราะห์4 ตำแหน่ง (analytical balance)
6. ขวดชั่งสาร
7. Weighting boat
8. เตาไฟฟ้า
9. กรวยกรอง (funnel)
10. ปิเปต (pipet) 1, 5, 10, 25 มล.
11. อ่างน้ำคุมอุณหภูมิ (water bath)
12. บิวเรต (buret) 50 มล.
13. Iodine flask 250 มล.
14. กระบอกตวง (cylinder) 10, 25, 50, 100 มล.
15. บีกเกอร์ (beaker) 50, 100, 250, 400, 1000, 2000 มล.
16. เทอร์โมมิเตอร์ (thermometer)
17. ตู้อบ (hot air oven)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

สารเคมี

1. น้ำมันจากเมล็ดกัญชง (Hemp seed oil) จากแปลงปลูกของมูลนิธิโครงการหลวงบนพื้นที่สูงในเขตภาคเหนือของประเทศไทย
2. Delta-9-tetrahydrocannabinol, 1.02mg/ml, Sigma®, USA
3. Cannabidiol, 1.00mg/ml, Lipomed, Switzerland
4. 2,2,2 triphenylacetophenone, Aldrich, Germany
5. Methanol
6. Potassium hydroxide
7. Anhydrous sodium carbonate
8. Potassium iodate
9. Potassium iodide
10. Potassium acid phthalate
11. Sodium thiosulphate
12. Sodium hydroxide
13. Starch
14. PhenolphthaleinTS
15. Ether
16. Absolute Ethanol
17. Chloroform
18. Glacial acetic acid
19. Concentrate hydrochloric acid
20. น้ำกลั่น
21. Toluene
22. 2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl (DPPH)
23. Trolox

3.2 ขั้นตอนการทดลอง

3.2.1 ทดลองปลูกกัญชงสายพันธุ์ต่างๆ ในพื้นที่ที่มีสภาพภูมิประเทศต่างๆกัน ซึ่งเป็นพื้นที่ขององค์การพฤกษศาสตร์จำนวน 3 พื้นที่ ได้แก่ ศูนย์รวมพรรณไม้ที่สูงเขตร้อน อ.แม่ริม จ.เชียงใหม่ โรงเรือนเพาะชำพรรณไม้ (ห้วยตาด) อ.แม่ริม จ.เชียงใหม่ และศูนย์รวมพรรณไม้บ้านร่มเกล้าในพระราชดำริ อ.ชาติตระการ จ.พิษณุโลก ในช่วงปี พ.ศ. 2552-2553

โดยมีขั้นตอนการปฏิบัติและดูแลรักษา ในการปลูกทดลองดังนี้

1.) เตรียมพื้นที่ปลูกกำจัดวัชพืช เตรียมดินโรยปูนขาว

2.) หลังจากปลูก 30 วัน ใส่ปุ๋ยสูตร 15-15-15 และ 46-0-0 กำจัดวัชพืชภายในแปลงปลูก และพื้นที่แนวขอบแปลง

3.) หยอดเมล็ดหลุมละประมาณ 5-10 เมล็ด ระยะห่างระหว่างหลุมประมาณ 10-15 x 10-15 ซ.ม. ขนาด แปลงทดลอง 5 x 6 ม.

4.) ทำการปลูกซ่อมหลังจากปลูก 10 วัน

5.) คัดเลือกต้นกัญชงที่เจริญเติบโตดีที่สุดให้เหลือต้น 3-5 ต้น ต่อหลุม นอกจากนั้นทำการถอนทิ้ง

3.2.1.1 บันทึกข้อมูลการเจริญเติบโตและผลผลิต ดังนี้

1.) การเจริญเติบโต โดยวัดความสูงของลำต้น ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของลำต้น และความกว้างของทรงพุ่ม ที่อายุ 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 และ 120 วัน

2.) ผลผลิตที่ได้ (ที่อายุ 75 วัน และ 90 วัน) ชั่งน้ำหนัก

- น้ำหนักต้นสด / รวมใบ กิ่ง และลำต้น
- น้ำหนักสดเฉพาะลำต้น
- น้ำหนักเส้นใยสด หลังลอกเปลือกออกจากลำต้น

- น้ำหนักเส้นใยแห้งหลังจากตากแห้งประมาณ 7 วัน

- จำนวนต้นกัญชงต่อพื้นที่ปลูก 1 ไร่

3.2.1.2 เก็บข้อมูลเชิงปริมาณและคุณภาพด้านปริมาณสารสำคัญของกัญชง ได้แก่Tetrahydrocannabinol (THC) Cannabidiol (CBD) cannabinol (CBN) โดยเริ่มเก็บตัวอย่างกัญชงได้แก่ ใบ ช่อดอก ไม่เกิน 30 เซนติเมตรจากยอด ที่อายุ 60 วัน และเก็บตัวอย่างทุก 15 วัน จนถึงระยะออกดอก ที่ระยะออกดอกเก็บตัวอย่างแยกเพศผู้ เพศเมีย นำมาตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญโดยใช้วิธีแก๊สโครมาโตกราฟี (Gas Chromatography) ตามวิธีของ UNODC

3.2.1.3 การเตรียมตัวอย่างแห้ง โดยนำตัวอย่างกัญชงมาอบแห้งในตู้อบร้อนที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง บดให้ละเอียดเก็บในถุงพลาสติกกันแสง และเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 5-8°C ขณะรอการวิเคราะห์

3.2.1.4 การเตรียมสารมาตรฐาน

สารมาตรฐานที่ใช้ ได้แก่ Delta-9-tetrahydrocannabinol (THC), Cannabidiol (CBD), 2,2,2,triphenylacetophenone

เตรียมสารละลายมาตรฐานโดยเจือจางสารมาตรฐานด้วย 0.5 mg/ml 2,2,2,triphenylacetophenone ซึ่งใช้เป็น internal standard ด้วยอัตราส่วน 1:1

3.2.1.5 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง โดยชั่งตัวอย่างแห้งบดละเอียดประมาณ 1 กรัมมาสกัดด้วยเมธานอล โดยการแช่ประมาณ 1 ชั่วโมง ปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตรด้วยเมธานอล กรองและนำสารละลายที่กรองได้มาเจือจางด้วย 0.5 mg/ml 2,2,2 triphenylacetophenone ด้วยอัตราส่วน 1:1

3.2.1.6 การวิเคราะห์สารสำคัญโดยฉีดสารละลายตัวอย่างและสารละลายมาตรฐานอย่างละ 1 ไมโครลิตร เข้าสู่เครื่อง GC-FID โดยใช้ DB-1 capillary column, 30 m X ID 0.25mm, film thickness 0.25 μm โดยมีการปรับสภาวะอุณหภูมิในเครื่องมือดังนี้

Injector temperature: 260 °C

Detector temperatre: 280°C

Oven temperature: hold at 230°C for 7 min., increase to 260°C at 10°C/min and hold at 260°C for 2 min

คำนวณหาปริมาณสาร THC และ CBD โดยใช้ peak ratio (อัตราส่วนระหว่าง peak area ของสารสำคัญกับ internal standard) ของสารสำคัญในตัวอย่าง เทียบกับ peak ratio ในสารมาตรฐาน

3.2.1.7 รวบรวมข้อมูลทั้งสายพันธุ์ที่ปลูก สภาพภูมิประเทศที่ปลูก และข้อมูลเชิงปริมาณและคุณภาพด้านปริมาณสารสำคัญของกัญชง

3.2.1.8 วิเคราะห์และประมวลผลข้อมูล

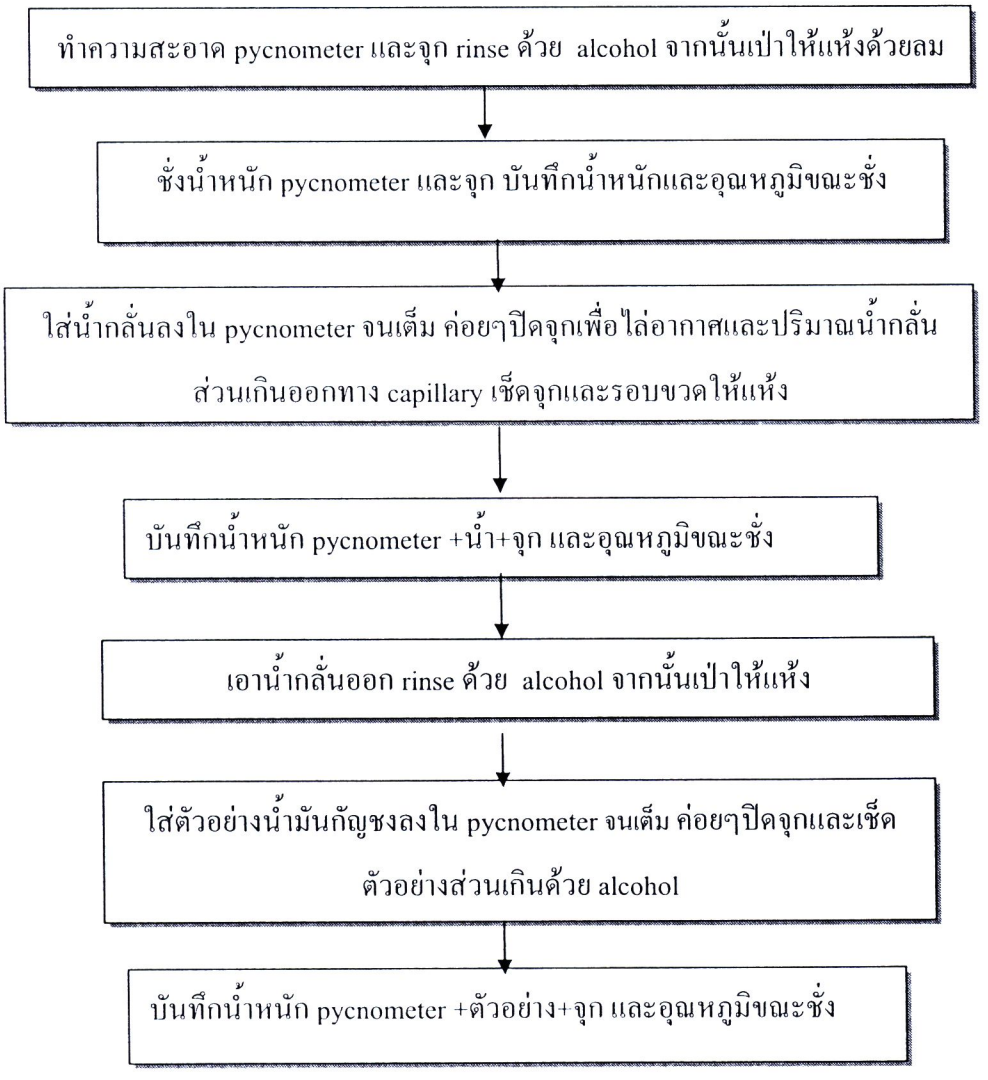
3.2.2 ตรวจสอบลักษณะทางเคมีกายภาพของน้ำมันเมล็ดกัญชง

การปลูกเฮมพ์เพื่อใช้เส้นใยนั้น ระยะเวลาการปลูก ประมาณ 90 วัน แต่ถ้าต้องการเมล็ด จะต้องใช้เวลาประมาณ 110-120 วัน ในการหีบน้ำมันนั้น จะต้องเก็บเกี่ยวแล้วนำมาเก็บไว้ประมาณ 6 เดือน เพื่อลดความชื้นในเมล็ด การหีบโดยใช้เครื่องหีบน้ำมันชนิดไฮโดรลิคที่มีคุณภาพ นำน้ำมันเมล็ดกัญชงที่ได้ตั้งทิ้งให้ตะกอนผงนอนก้น แล้วกรองให้ได้น้ำมันใส

1.) ตรวจสอบลักษณะภายนอกของน้ำมันเมล็ดกัญชง

ทำการตรวจสอบลักษณะรูปร่าง ขนาด สีและกลิ่นของเมล็ดกัญชงที่ได้ ก่อนนำไปการทดสอบลักษณะทางกายภาพ

2.) การวัดค่าความถ่วงจำเพาะ (Specific gravity) [21]



การคำนวณค่าความถ่วงจำเพาะ

$$D_{น้ำมัน} = M_{น้ำมัน} / M_{น้ำ} \times D_{น้ำ}$$

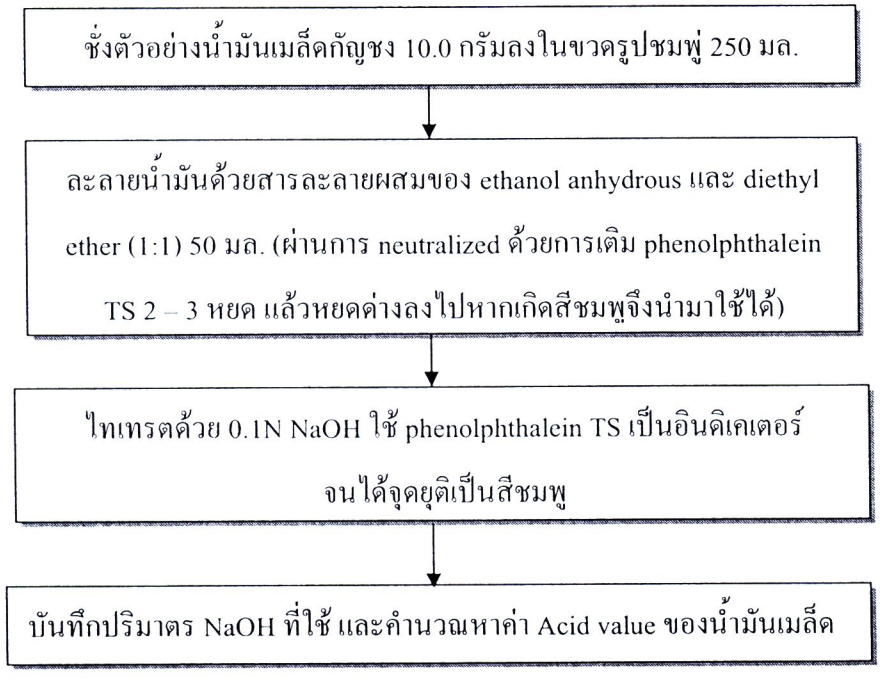
$D_{น้ำมัน}$ หมายถึง ค่าความถ่วงจำเพาะของน้ำมันที่อุณหภูมิหนึ่งๆ

$D_{น้ำ}$ หมายถึง ค่าความถ่วงจำเพาะของน้ำที่อุณหภูมิหนึ่งๆ

$M_{น้ำมัน}$ หมายถึง น้ำหนักของน้ำมัน

$M_{น้ำ}$ หมายถึง น้ำหนักของน้ำ

3.) การหาค่า Acid value ของน้ำมันเมล็ดกัญชง [22]



การคำนวณหาค่า Acid value

$$\text{Acid value} = 40V \times N/W$$

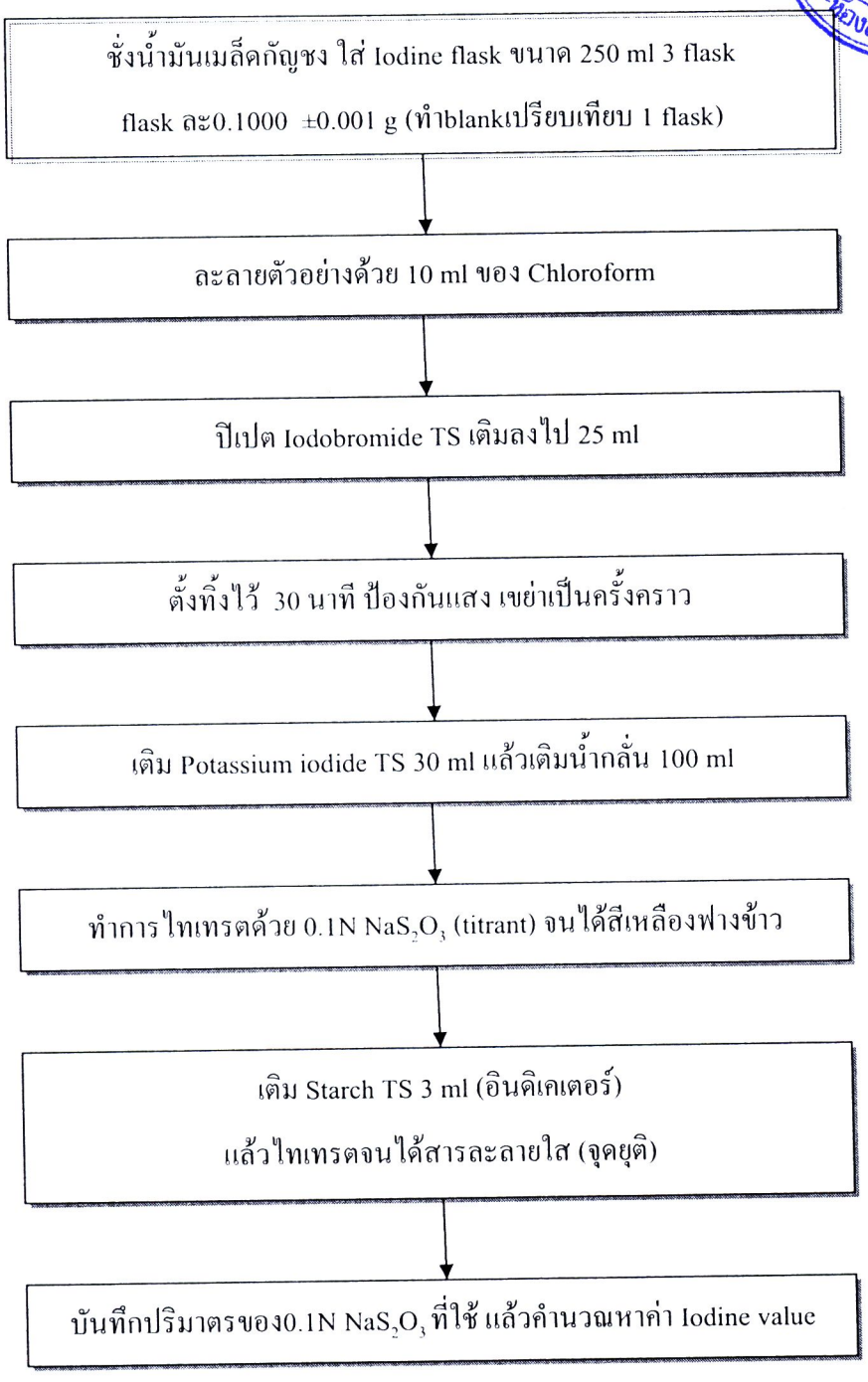
โดยที่ V หมายถึง ปริมาตรของ NaOH ที่ใช้ในการไทเทรตจนถึงจุดยุติ (ml)

N หมายถึง ความเข้มข้นที่แท้จริงของ NaOH ที่ใช้ในการไทเทรต (mol/dm^3)

W คือ น้ำหนักของสารที่ชั่ง (g)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

4.) การหาค่า Iodine value [23]



การคำนวณค่า Iodine value

$$\text{Iodine value} = \frac{126.9\,(Vb - Vs)N}{10W}$$

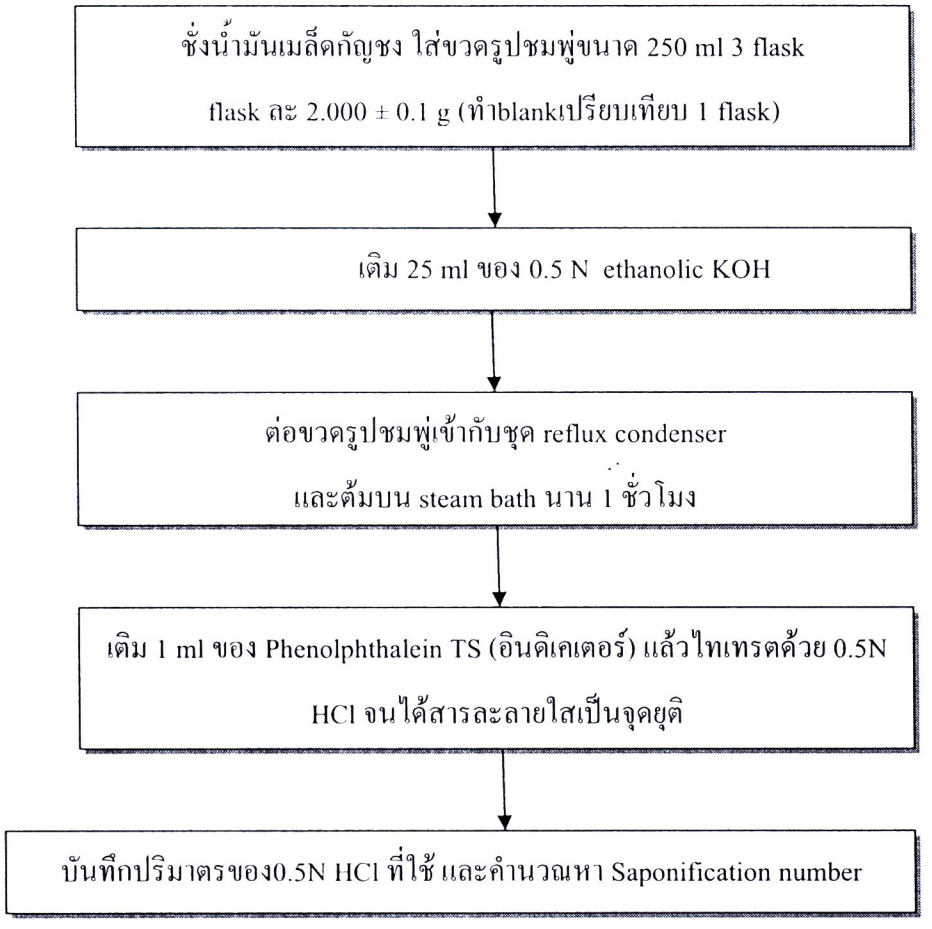
โดยที่ Vb หมายถึง ปริมาตร NaS_2O_3 ที่ใช้ในการไทเทรต black (ml)

Vs หมายถึง ปริมาตร NaS_2O_3 ที่ใช้ในการไทเทรต sample จนจุดยุติ (ml)

N หมายถึง ปริมาตร NaS_2O_3 ที่ใช้ในการไทเทรต black (ml)

W หมายถึง น้ำหลักของสารที่ชั่งมา (g)

5.) การหาค่า Saponification number [24]



การคำนวณค่า Saponification number

$$\text{Saponification number} = \frac{(Vb - Vs) \times M \times 56.1}{W}$$

โดยที่ Vb หมายถึง ปริมาตร HCl ที่ใช้ในการไทเทรต black (ml)

Vs หมายถึง ปริมาตร HCl ที่ใช้ในการไทเทรต sample จนจุดยุติ (ml)

M หมายถึง ความเข้มข้นที่แท้จริงของ HCl (mol/dm^3)

W หมายถึง น้ำหลักของสารที่ชั่งมา (g)

3.2.3. ตรวจหาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันจากเมล็ดกัญชงโดยวิธี Chromatography

โดยส่งตรวจวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณสารสำคัญ Omega-3, Omega-6, Omega-9 และ Vitamin E บริษัท ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด สาขาเชียงใหม่ 164/86 หมู่ที่ 3 ตำบลดอนแก้ว อำเภอแม่ริม จังหวัดเชียงใหม่ 50180

3.2.3.1 การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ Omega-3, Omega-6 และ Omega-9 โดยวิธี GC

GC Condition

GC Apparatus: Agilent Model 6890N (G1530N), USA

Column: Supelco® capillary, SP^{TM} -2560 (100 m x 0.25 mm i.d., 0.2 μm)

Flow rate of carrier gas: He flow 1.1 mL/min,

H_2 flow 40 mL/min

Air flow 450 mL/min

Make-up flow 45 mL/min

Spit ratio 100: 1

Detector: FID

Injection volume: 1 μl

Temperature operation: Injection Temperature 250 °C

Detection Temperature 250 °C

Oven Temperature profile: initial temp. 140 °C; hold 5 min

Increase 3°C/min to 250 °C; hold 17 min

Run time: 55 min

Standard: Fatty acid methyl esters (FAME Mix) 10 mg/mL

(วิธีทดสอบอ้างอิงตาม In-house method based on AOAC (2005), 996.06)

3.2.3.2 ปริมาณสารสำคัญ Vitamin E (α-Tocopherol) โดยวิธี HPLC

HPLC Condition

HPLC Apparatus: Agilent Model 1100, USA

Column: Hypersil® ODS, C-18 Silica, (250x 4.6 mm, 5 μm)

Mobile phase: Isocratic, Methanol : DI-water = 98 : 2

Flow rate: 1.0 mL/min

Detector: DAD at 292 nm

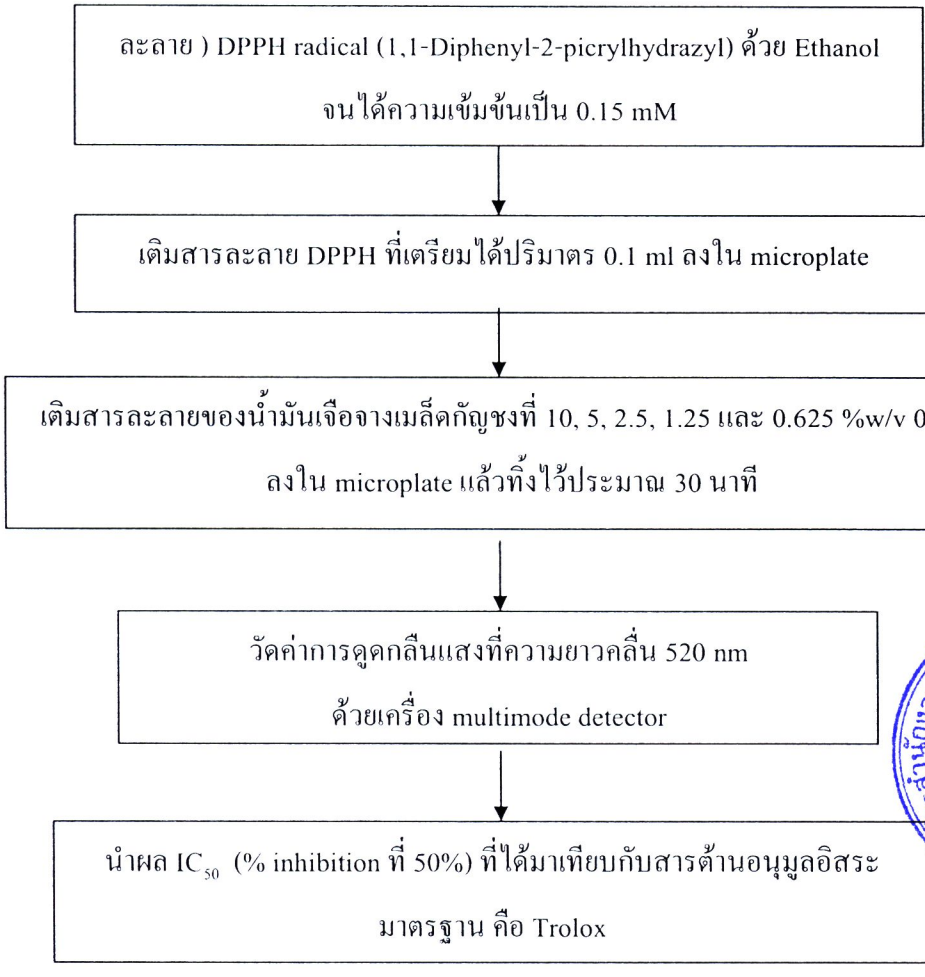
Injection volume: 20 μl

Temperature: 25 °C

Run time: 15 min

(วิธีทดสอบอ้างอิงตาม In-house method based on Liquid Chromatographic Analysis of Food and Beverage Vol.2, 1979)

3.2.4 ตรวจสอบหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยอาศัยเทคนิค DPPH assay



สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

3.3 การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้หลักสถิติ ANOVA, simple correlation และ multiple regression analysis โดยโปรแกรม SPSS for Windows version 11.0