

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้ศึกษาถึงระยะเวลาที่เหมาะสมในการเพาะปลูกต้นอ่อนทานตะวันงอก รวมถึงศึกษาความเข้มข้นของกรดกลูตามิก ที่มีผลต่อปริมาณสาร gamma amino butyric acid ดังต่อไปนี้

#### 3.1 วัสดุและอุปกรณ์

- เมล็ดพันธุ์ทานตะวัน
- กรดกลูตามิก (L-glutamic acid)
- กระดาษกรอง (Whatman เบอร์ 1)
- Petri dish 15x90 mm
- สารกาบมาตรฐาน
- ถาดเพาะ ดิน วัสดุในการปลูก

#### 3.2 ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงานวิจัย

##### 3.2.1 เตรียมวัสดุสำหรับการเพาะงอก

ก่อนการทดลอง เมล็ดพันธุ์ทานตะวันจะถูกคัดแยกสิ่งเจือปนต่างๆ เช่น เมล็ดลีบ เมล็ดเสีย ออกจากเมล็ดดีก่อน จากนั้นบรรจุเมล็ดพันธุ์ลงในถุงพลาสติก เก็บที่อุณหภูมิห้อง เพื่อรอใช้ในการทดลองถัดไป

3.2.2 ศึกษาผลของความเข้มข้นของกรดกลูตามิกต่ออัตราการงอก และลักษณะปรากฏของเมล็ดทานตะวันงอก

เมล็ดพันธุ์ทานตะวันที่ผ่านการถูกคัดเลือกมาจากข้อ 3.2.1 นำมาหาอัตราการงอกด้วยวิธี top of paper ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ ISTA (International Seed Testing Association) โดยสุ่มเมล็ดทานตะวัน 100 เมล็ดเพาะบนจานเลี้ยงเชื้อ ที่มีกระดาษกรองเบอร์ 1

รองอยู่ด้านใต้ จากนั้นเติมสารละลายกรดกลูตามิก 5 มิลลิลิตร โดยแปรความเข้มข้นเป็น 5, 10, 15, 20 และ 25 mM. ปิดฝาและบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นนับเมล็ดทานตะวันที่งอกในแต่ละ plate เพื่อหาอัตราการงอกโดยรายงานผลเป็นอัตราการงอก

นำค่าอัตราการงอกทั้ง 3 ซ้ำมาหาค่าเฉลี่ยและค่าพิสัย โดยนำค่าเฉลี่ยที่ได้ในแต่ละความเข้มข้นไปเปรียบเทียบกับตาราง ช่วงการยอมรับของ ISTA ซึ่งจะได้ค่าช่วงการยอมรับ ความเข้มข้นของกรดกลูตามิกที่จะนำมาใช้ในการเพาะได้จะต้องมีค่าพิสัยของอัตราการงอกอยู่ในช่วงการยอมรับของ ISTA (ภาคผนวก ก 1) จากนั้นเลือกความเข้มข้น 3 ระดับที่ไม่มีผลต่ออัตราการงอกและไม่ทำให้เกิดความผิดปกติกับเมล็ดทานตะวันและลักษณะปรากฏ เช่น เมล็ดทานตะวันร้าว ไม่มีกลิ่นฉุนของแอมโมเนีย เมล็ดไม่เปื่อยยุ่ย เป็นต้น มาศึกษาต่อในตอนถัดไป

คัดแยกเมล็ดทานตะวันเสีย เมล็ดลีบออกจากเมล็ดดี



สุ่มเมล็ดทานตะวัน 100 ใส่จานเพราะเชื้อ ที่มีกระดาษกรองรองอยู่



เติมสารละลายกรดกลูตามิก โดยแปรความเข้มข้นเป็น 5, 10, 15, 20 และ 25 mM



บ่มเมล็ดทานตะวันที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 16 ชั่วโมง



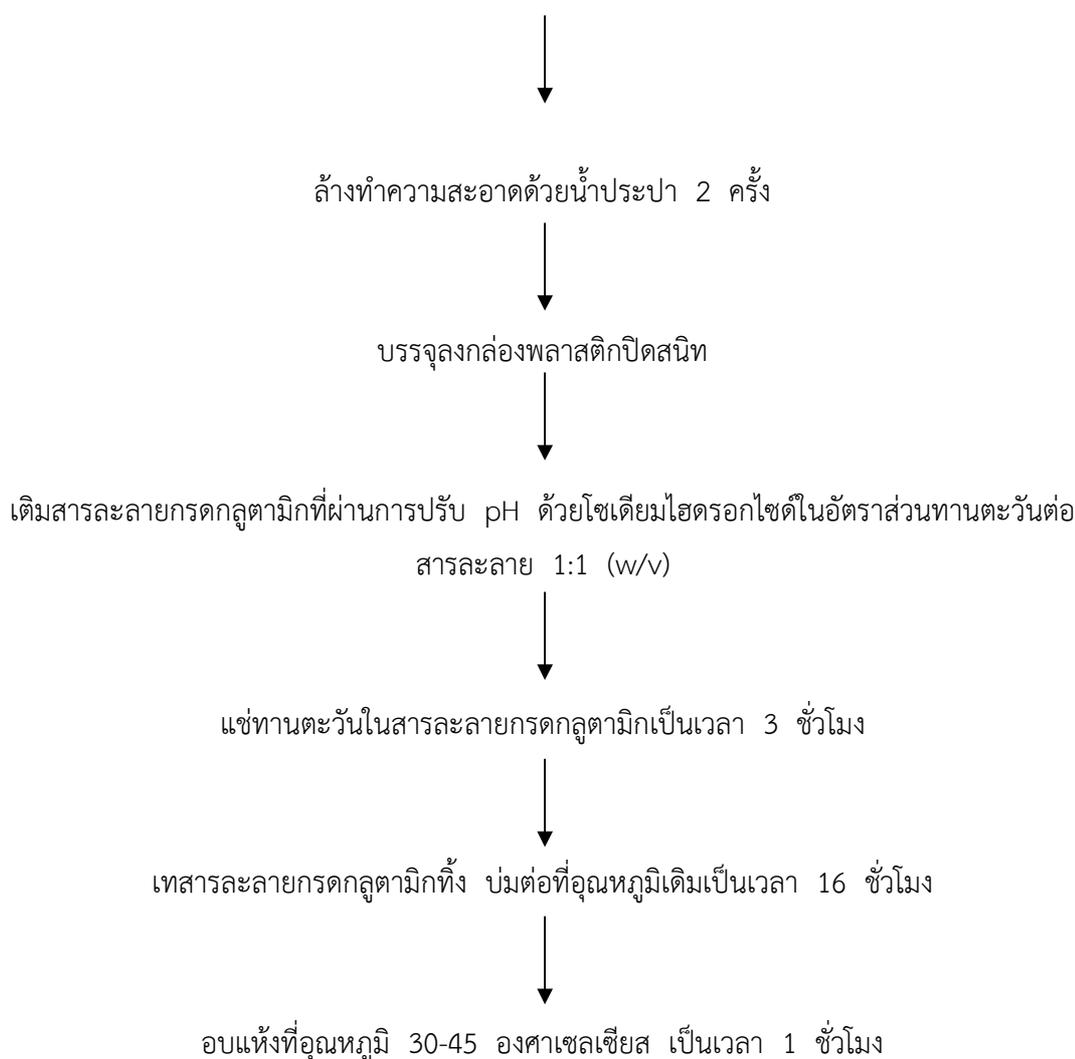
นับจำนวนเมล็ดทานตะวันที่งอกหาอัตราการงอก และสังเกตลักษณะปรากฏของข้าว

ภาพที่ 3.1 ขั้นตอนการหาอัตราการงอกของเมล็ด

### 3.2.3 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะงอกเมล็ดทานตะวัน ด้วยวิธีการเติมกรดกลูตามิก

เพาะงอกด้วยวิธีการดัดแปลงจากวิธีของ Komatsusaki และคณะ (ภาคผนวก ก 2) โดยเปลี่ยนจากน้ำกลั่นที่ใช้ในขั้นตอนการแช่เมล็ดทานตะวัน 3 ชั่วโมง เป็นสารละลายกรดกลูตามิก เท สารละลายกรดกลูตามิกออก บ่มเมล็ดทานตะวันต่อในภาชนะปิดสนิทเป็นเวลา 16 ชั่วโมง ในขั้นตอน การทดลองนี้จะแปรความเข้มข้นของกรดกลูตามิก ตามความเข้มข้นที่เลือกได้ในข้อ 3.2.2 5 ระดับคือ 5, 10, 15, 20 และ 25 mM แปรอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเป็น 30, 35, 40 และ 45 องศา เซลเซียส วิเคราะห์ตัวอย่างเมล็ดทานตะวันงอกที่ได้ดังต่อไปนี้

คัดแยกทานตะวันเมล็ดเสีย เมล็ดลีบออกจากทานตะวันเมล็ดดี



ภาพที่ 3.2 ขั้นตอนการเพาะงอกเมล็ดทานตะวันด้วยวิธีการเติมสารละลายกรดกลูตามิก

### 3.3 ศึกษาปริมาณสารกาบาในตัวอย่างเมล็ดทานตะวันงอก

#### 3.3.1 ขั้นตอนการสกัดสารกาบา

- 1) บดตัวอย่างเมล็ดทานตะวันงอก 50 กรัมให้ละเอียด
- 2) ชั่งตัวอย่างที่บดแล้ว 15 กรัม ใน centrifuge tube ขนาด 50 ml ทำการกำจัดไขมันออกจากเมล็ดทานตะวันงอกใช้ dichloromethane และ n-Hexane โดยสกัดในกรวยสกัดด้วยการเติม dichloromethane ก่อน 3 ครั้ง ครั้งละ 15 ml จากนั้นจะพบว่าไขมันจะไปรวมอยู่ที่ชั้นของ dichloromethane ให้ไขชั้น dichloromethane ออกก่อน หลังจากนั้นเก็บชั้นน้ำซึ่งมีสารกาบาอยู่ไปสกัดต่อด้วย n-Hexane 2 ครั้ง ครั้งละ 10 ml ถ้าไม่มีการกำจัดไขมันด้วย dichloromethane และ n-Hexane จะไม่พบ peak ของอนุพันธ์ของสารกาบาในการตรวจวัดเนื่องจาก sample matrix
- 3) ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ส่วนใสเก็บใส่ขวดปรับปริมาตรขนาด 20 ml
- 4) กรองสารละลายตัวอย่างที่สกัดแล้วด้วย 0.45 ไมครอน micro syringe filter
- 5) เก็บสารละลายที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอการตรวจปริมาณสารกาบา ด้วย gas chromatograph mass spectrometer

#### 3.3.2 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารกาบา



ภาพที่ 3.3 gas chromatograph mass spectrometer

นำตัวอย่างสารจากการสกัดมาทำการตรวจวิเคราะห์สารกาบาโดยใช้เครื่อง gc-ms (GC : Agilent Technologies รุ่น 6890N MS : Agilent Technologies รุ่น 5973 inert) ซึ่งความสามารถของการตรวจวิเคราะห์สารของเครื่อง gc-ms สามารถวิเคราะห์ได้ไม่ต่ำกว่า 0.002 ppm โดยสภาวะที่ใช้ในการแยกสารกาบาเป็นดังนี้

Oven เริ่มต้น 100°C ค้างไว้ 1 นาที เพิ่ม 35°C/min จนถึง 290°C ค้างไว้ 3 นาที เพิ่ม 40°C/min จนถึง 310°C ค้างไว้ 10 นาที

Injector 250°C

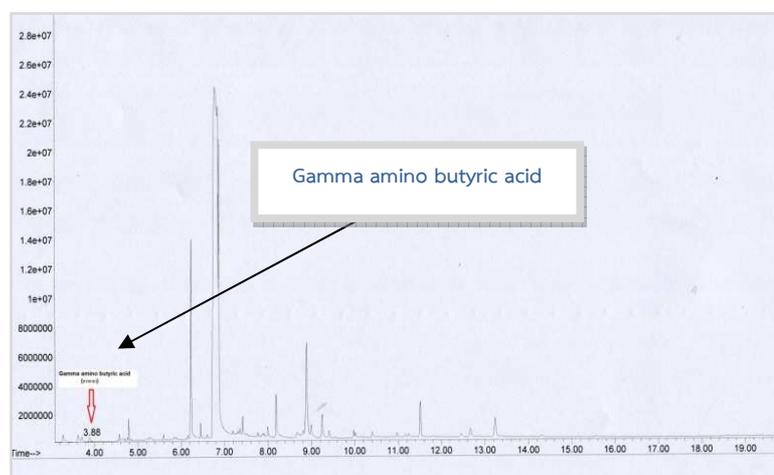
Split 10:1 Flow 1 ml/min Pressure 10.35 psi

Column HP-5ms ยาว 30 เมตร ID 0.25 mm. Film 0.25 um.

Detector 320°C

Solvent delay 3 min

Scan parameter 30-500 atomic mass unit (amu)



ภาพที่ 3.4 โครมาโทแกรมของ gamma amino butyric acid ในเมล็ดทานตะวันงอก