

บทที่ 3 วิธีการวิจัย

กิจกรรมที่ 1 การศึกษา รวบรวม คัดเลือกพันธุ์กระเทียมที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกันจากแหล่งปลูกที่สำคัญบนพื้นที่สูง

1.1 รวบรวมหัวพันธุ์กระเทียมจากแหล่งปลูกสำคัญในเขตจังหวัดแม่ฮ่องสอน เชียงใหม่ ลำพูน ลำปาง อย่างน้อย 10 แหล่งปลูก

1.1.1 จำแนกลักษณะพันธุ์

(1) การจำแนกโดยอาศัยอายุเก็บเกี่ยว โดยพิจารณาจากอายุกระเทียมที่แก่จัดพร้อมที่จะทำการเก็บเกี่ยว แบ่งออกเป็น 3 พันธุ์ ได้แก่

- พันธุ์เบา อายุเก็บเกี่ยว สั้นอยู่ในช่วง 75-90 วัน ลักษณะของพันธุ์ ดังนี้
 - ลำต้นเล็ก แข็งเหนียว ช่วงของลำต้นสูง
 - หัวมีขนาดปานกลาง แต่ละหัวประกอบด้วยกลีบประมาณ 11-13 กลีบ เนื้อในแน่นแข็ง มีกลิ่นและรสจัด
- พันธุ์กลาง เป็นพันธุ์ที่นิยมปลูกมาก อายุการเก็บเกี่ยวอยู่ในช่วง 100-120 วัน ลักษณะของพันธุ์ ดังนี้
 - ลำต้นอวบใหญ่ และเตี้ยกว่าพันธุ์เบา
 - หัวมีขนาดใหญ่กว่ากระเทียมพันธุ์เบาที่ปลูกและดูแลในสภาพเดียวกัน
- พันธุ์หนัก อายุการเก็บเกี่ยว 150 วัน ขึ้นไป ลักษณะของพันธุ์ ดังนี้
 - ลำต้นอวบอ้วน และใหญ่กว่าพันธุ์กลาง
 - หัวมีขนาดใหญ่กว่ากระเทียมพันธุ์กลางที่ปลูกและดูแลในสภาพเดียวกัน

(2) การจำแนกตามแหล่งที่มาของพันธุ์ ได้แก่ กระเทียมจากต่างประเทศ จะเรียกกระเทียมจีน กระเทียมพม่า กระเทียมศรีสะเกษ กระเทียมจากภาคกลางเรียกกระเทียมบางช้าง และกระเทียมจากภาคเหนือเรียกกระเทียมเชียงใหม่

(3) การจำแนกตามฤดูกาลเพาะปลูกและเก็บเกี่ยว นิยมใช้กับกระเทียมทางภาคเหนือ ซึ่งจะปลูก 2 รุ่นในแต่ละปี คือ

- กระเทียมดอ เป็นกระเทียมที่ปลูกและเก็บเกี่ยวก่อนการปลูกปกติ คือ ปลูกก่อนเก็บเกี่ยว ข้าวประมาณปลายเดือนตุลาคม-ต้นเดือนพฤศจิกายน ผลผลิตออกเดือน มกราคม-กุมภาพันธ์ นิยมนำมาทำกระเทียมดอง
- กระเทียมปี เป็นกระเทียมที่ปลูกและเก็บเกี่ยวตามปกติของฤดูปลูกกระเทียม คือปลูกหลังจากเก็บเกี่ยวข้าวโดยปลูกในช่วงเดือนธันวาคม-มกราคม ผลผลิตออกเดือนมีนาคม-เมษายน

1.1.2 จำแนกตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา

- สีเปลือกทั้งหัว
- รูปร่างหัว
- ขนาดหัว (เส้นผ่าศูนย์กลาง x หัว)
- น้ำหนักต่อหัวเฉลี่ย (กรัม)
- จำนวนกลีบต่อหัว

- การเรียงตัวของกลีบ
- ขนาดกลีบ (ความสูง x ความกว้างด้านข้าง x ความกว้างด้านนอกถึงด้านใน)
- สีเปลือกหุ้มกลีบ
- ลักษณะของกลีบตัดขวาง
- จำนวนชั้นของเปลือกหุ้มกลีบ

1.2 การปลูกทดสอบและคัดเลือกพันธุ์กระเทียมจากแต่ละพื้นที่

1.2.1 คัดเลือกพื้นที่และเกษตรกรเข้าร่วมทดสอบสาธิต พร้อมทั้งชี้แจงการดำเนินงาน

(1) เก็บตัวอย่างดิน 0 – 15 เซนติเมตร ในแปลงของเกษตรกรก่อนปลูกกระเทียม วิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีของดิน ได้แก่

- ความเป็นกรดเป็นด่าง (pH)
- ปริมาณอินทรีย์วัตถุ (OM)
- ปริมาณธาตุอาหารในดิน (N P K)

(2) วางแผนการปลูกทดสอบกระเทียมในแปลงร่วมกับเกษตรกร

(2.1) วิธีการปลูกทดสอบ

- เตรียมแปลงกว้างประมาณ 1.20 เมตร ความสูงของแปลงประมาณ 20 เซนติเมตร ยกแปลงเพื่อทำร่องน้ำหากพื้นที่ค่อนข้างชัน หรือทำร่องน้ำรอบๆ ขอบแปลงเพื่อระบายน้ำ
- ฝังกลีบกระเทียมหลุมละ 1 กลีบ ลึกประมาณ 1 เซนติเมตร
- ระยะปลูก 15 x 20 เซนติเมตร
- หลังปลูกกระเทียมแล้วคลุมฟางหนา 2-3 นิ้ว เพื่อควบคุมการงอกของวัชพืช และควบคุมความชื้นในดินให้เหมาะสมกับการเจริญเติบโต

(2.2) การดูแลรักษา

- การให้น้ำ โดยให้น้ำขังรอบแปลงและตัดรทุก 3-5 วัน/ครั้ง โดยสังเกตจากใบกระเทียมถ้าเริ่มเหี่ยวให้ตักน้ำรดทันที หรือให้น้ำท่วมแปลงแล้วระบายออกหรือปล่อยให้ไหลไปยังพื้นที่ที่มีระดับต่ำ

(2.3) การเก็บเกี่ยว (อายุการเก็บเกี่ยวสำหรับกระเทียมขึ้นอยู่กับพันธุ์)

- พันธุ์เบา ลักษณะใบแหลม กลีบเท่าหัวแม่มือ กลีบและหัวสีขาว กลิ่นฉุน อายุเก็บเกี่ยวประมาณ 75-90 วัน
- พันธุ์กลาง ใบเล็กและยาว ลำต้นใหญ่ หัวขนาดกลาง หัวและกลีบสีม่วง อายุเก็บเกี่ยว
- พันธุ์หนัก หรือพันธุ์จีน ลักษณะใบกว้าง ลำต้นเล็ก หัวใหญ่ กลีบโต เปลือกหุ้มสีชมพู อายุเก็บเกี่ยวประมาณ 150 วัน

กิจกรรมที่ 2 การศึกษาวิจัยคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาของพันธุ์กระเทียมจากแหล่งปลูกที่สำคัญบนพื้นที่สูง

2.1 คัดเลือกหัวพันธุ์กระเทียมจากแต่ละแหล่งปลูก เพื่อวิเคราะห์คุณสมบัติทางเภสัชวิทยา

2.2 วิเคราะห์คุณสมบัติทางเภสัชวิทยา สารกลุ่ม organosulfur compounds เช่น alliin ของกระเทียมแต่ละแหล่งปลูก จำนวน 10 พันธุ์

วิธีการวิเคราะห์คุณสมบัติทางเภสัชวิทยาในกระเทียม

1. การเตรียมตัวอย่างสารสกัดกระเทียม (ส่วนมีหัว)

การเตรียมตัวอย่างของสารสกัดกระเทียมเพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม สารประกอบฟลาโวนอยด์รวมและการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินที่ละลายน้ำได้ (วิตามินบีหนึ่ง วิตามินบีสองและวิตามินซี) นั้นทำการเตรียมตัวอย่างสารสกัดดังขั้นตอนต่อไปนี้

ชั่งตัวอย่างกระเทียมสด 100 กรัม



บดให้ละเอียด



สกัดด้วยเอทานอลที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส พร้อมกับเขย่าที่ความเร็ว 300 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 3 ชั่วโมง สกัดทั้งหมด 3 รอบ



นำสารละลายที่ได้จากการสกัดมารวมกัน



ระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยโดยการลดความดัน



ชั่งน้ำหนักสารสกัดที่ได้

2. การเตรียมตัวอย่างสารสกัดกระเทียม (ส่วนไม่มีหัว)

การเตรียมตัวอย่างของสารสกัดกระเทียมเพื่อวิเคราะห์ปริมาณ Diallyl disulfide และ Diallyl trisulfide ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ Allicin ที่ละลายได้ในไขมัน รวมทั้งวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดไขมันนั้น ทำการเตรียมตัวอย่างสารสกัดดังขั้นตอนต่อไปนี้

ชั่งตัวอย่างกระเทียมสด 100 กรัม



บดให้ละเอียด



สกัดด้วยเฮกเซนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พร้อมกับเขย่าที่ความเร็ว 300 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 3 ชั่วโมง สกัดทั้งหมด 3 รอบ



นำสารละลายที่ได้จากการสกัดมารวมกัน



ระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยโดยการลดความดัน



ชั่งน้ำหนักสารสกัดที่ได้

3. การตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมนั้นใช้วิธี Folin-Ciocalteu (Saenjum *et al.*, 2010) ซึ่งอาศัยการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของสารประกอบฟีนอลิก ในการเปลี่ยนสารละลาย Folin-Ciocalteu ที่มีสีเหลือง (Molybdotung-stophosphoric heteropolyanion reagent) ในสถานะที่เป็นต่างให้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงิน (Molybdotungstophosphate blue) ซึ่งสามารถวิเคราะห์หาปริมาณได้โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 725 นาโนเมตร ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

เตรียม Folin-Ciocalteu stock solution และ Saturated sodium bicarbonate



เตรียม Gallic acid ซึ่งเป็นสารละลายมาตรฐานสำหรับการทดสอบ เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน



Reaction mixture ประกอบด้วยน้ำปราศจากไอออน 1.5 มิลลิลิตร สารละลาย Saturated sodium bicarbonate 300 ไมโครลิตร สารละลาย Folin-Ciocalteu 100 ไมโครลิตรและตัวอย่าง หรือสารมาตรฐาน 100 ไมโครลิตร



วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV/VIS Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 725 นาโนเมตร



คำนวณหาปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกรวมของสารสกัดตัวอย่างจากกราฟมาตรฐาน Gallic acid โดยคำนวณโดยใช้ Gel หรือ Cream base เป็นกลุ่มควบคุม

4. การตรวจวิเคราะห์สารประกอบฟลาโวนอยด์รวม

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมจะใช้เทคนิค UV/Vis-Spectrophotometry โดยดัดแปลงวิธีของ Shen *et al.*, 2010 โดยมีขั้นตอนการทดสอบดังนี้

ซึ่งตัวอย่างสารสกัด 0.1 กรัม เติมน้ำ 4 มิลลิลิตร



เติม 5% NaNO_2 0.3 มิลลิลิตร



ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที แล้วเติม 10% AlCl_3 ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร



ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที แล้วเติม 1M NaOH 2 มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรด้วยเอทานอลจนครบ 10 มิลลิลิตร



ผสมสารละลายให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที

นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร



คำนวณหาปริมาณสารกลุ่มฟลาโวนอยด์โดยรวมของสารสกัดจากกราฟมาตรฐาน Quercetin

5. การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบีหนึ่ง บีสองและวิตามินซี

นอกจากการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมในสารสกัดหยาบกระเทียมที่เตรียมด้วยเอทานอลแล้ว จะทำการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบีหนึ่ง บีสองและวิตามินซี ด้วยเทคนิค Reversed-phase HPLC ผลการวิเคราะห์ปริมาณปริมาณวิตามินบีหนึ่ง บีสองและวิตามินซี ในสารสกัดกระเทียม

6. การวิเคราะห์ปริมาณ Diallyl disulfide และ Diallyl trisulfide ในสารสกัดกระเทียม

Diallyl disulfide และ Diallyl trisulfide เป็นสารอนุพันธ์ที่เกิดจากการสลายตัวของ Allicin ในกระเทียม เนื่องจาก Allicin เป็นสารที่มีความคงตัวต่ำ นอกจากนั้นยังมีรายงานวิจัยจำนวนมากที่แสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ทางชีวภาพของ Diallyl disulfide และ Diallyl trisulfide นำตัวอย่างสารสกัดกระเทียมจากข้อ 1 มาวิเคราะห์ปริมาณ Diallyl trisulfide ด้วยเทคนิค Ion-pair reversed-phased HPLC โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ Diallyl trisulfide ซึ่งสั่งซื้อจากบริษัท Sigma, Co., Ltd. ประเทศสหรัฐอเมริกา ผลการวิเคราะห์ Diallyl trisulfide

7. การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดไขมัน

นำตัวอย่างสารสกัดกระเทียมจากข้อ 2 มาวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดไขมันด้วยเทคนิค GLC เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Caproic acid, Caprylic acid, Capric acid, Lauric acid, Myristic acid, Myristoleic acid, Palmitic acid, Palmitoleic acid, Stearic acid, Oleic acid, Linoleic acid, Gamma linolenic acid, Linolenic acid, Arachidic acid, Eicosaenoic acid, Eicosadienoic acid, Eicosatrienoic acid, Arachidonic acid, Erucic acid, และ Nervonic acid โดยผลตรวจชนิดและปริมาณของกรดไขมัน

สถานที่ดำเนินการวิจัย

1. จังหวัดแม่ฮ่องสอน: อำเภอเมืองแม่ฮ่องสอน อำเภอแม่สะเรียง และอำเภอแม่ออนน้อย
2. โครงการพัฒนาพื้นที่สูงแบบโครงการหลวงห้วยเป่า อ.เชียงดาว จ.เชียงใหม่
3. โครงการขยายผลเพื่อแก้ปัญหาพื้นที่อย่างยั่งยืนขุนตื้นน้อย อ.อมก๋อย จ.เชียงใหม่
4. จังหวัดลำพูน: อำเภอบ้านโฮ่ง