

บทที่ 3 วิธีการวิจัย

3.1 วิธีการวิจัย

3.1.1 การศึกษาและพัฒนาการผลิตชาอัสสัม (*Camellia sinensis* var. *assamica*) บนพื้นที่สูง

พื้นที่ดำเนินงาน : พื้นที่โครงการหลวงและโครงการพัฒนาพื้นที่สูงแบบโครงการหลวง
ที่เป็นแหล่งปลูกชาอัสสัมที่สำคัญ อย่างน้อย 5 แห่ง

วิธีดำเนินงาน :

1) การสำรวจ รวบรวม และศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและสารสำคัญของชาอัสสัม
จากแหล่งปลูกสำคัญบนพื้นที่สูง

1.1) รวบรวมข้อมูลแหล่งปลูกชาอัสสัมที่สำคัญในพื้นที่โครงการหลวงและโครงการ
พัฒนาพื้นที่สูงแบบโครงการหลวง จากแหล่งข้อมูลต่างๆ เช่น รายงาน/เอกสาร ข้อมูลพื้นที่รายแปลง
ของ สวพส. การสอบถามจากเจ้าหน้าที่และผู้ที่เกี่ยวข้อง เป็นต้น โดยบันทึกข้อมูล เช่น พื้นที่ปลูก
ระดับความสูงของพื้นที่ สายพันธุ์ชาอัสสัม และอายุต้น เป็นต้น

1.2) คัดเลือกพื้นที่จากข้อ 1.1) อย่างน้อย 5 แห่ง สำหรับการเก็บข้อมูลการปลูก
ชาอัสสัมจากแหล่งปลูกสำคัญในพื้นที่โครงการหลวงและโครงการพัฒนาพื้นที่สูงแบบโครงการหลวง
ตลอดจนการเก็บตัวอย่างใบชาอัสสัมจากพื้นที่ที่คัดเลือก

1.2.1) คัดเลือกพื้นที่ปลูกชาอัสสัมที่สำคัญในพื้นที่โครงการหลวงและโครงการ
พัฒนาพื้นที่สูงแบบโครงการหลวง อย่างน้อย 5 แห่ง

1.2.2) เก็บข้อมูลเชิงลึกของการปลูกชาอัสสัมจากพื้นที่ที่คัดเลือก เช่น รูปแบบ
การปลูก วิธีการจัดการแปลงปลูก การเกี่ยวผลผลิต การใช้ประโยชน์ เหตุผล/แรงจูงใจในการปลูก
ปัญหาและข้อจำกัด เป็นต้น โดยการรวบรวมข้อมูลจากเอกสาร การสัมภาษณ์ การใช้แบบสอบถาม
หรือการสังเกตการณ์ เป็นต้น

1.2.3) เก็บตัวอย่างใบชาอัสสัมจากพื้นที่ที่คัดเลือก โดยวางแผนการทดลองแบบ
2x2 Factorial in RCBD ทวนซ้ำ 3 ครั้ง แบ่งเป็น 2 ปัจจัย ดังนี้

ปัจจัยที่ 1 วิธีการเก็บใบชา (A) 2 ลักษณะ

a_1 = เก็บแบบชา (1 ยอดตูม 2 ใบบาน)

a_2 = เก็บแบบเมี่ยง (ใบที่ 4-6 ถัดลงมาจากยอดชา)

ปัจจัยที่ 2 อายุต้น (B) 2 ช่วงอายุ

b_1 = อายุไม่เกิน 50 ปี

b_2 = อายุ 50 ปีขึ้นไป

A	ซ้ำ	B			ผลรวม	ผลรวมของ A
		b_1	b_2	b_3		
a_1	1	y_{111}	y_{121}	y_{131}	$T_{1.1}$	
	2	y_{112}	y_{122}	y_{132}	$T_{1.2}$	
	3	y_{113}	y_{123}	y_{133}	$T_{1.3}$	
ผลรวม		$T_{1.}$	$T_{1.}$	$T_{1.}$	$T_{1..}$	$T_{1..}$
a_2	1	y_{211}	y_{221}	y_{231}	$T_{2.1}$	
	2	y_{212}	y_{222}	y_{232}	$T_{2.2}$	
	3	y_{213}	y_{223}	y_{233}	$T_{2.3}$	
ผลรวม		$T_{2.}$	$T_{2.}$	$T_{2.}$	$T_{2..}$	$T_{2..}$
ผลรวมของ B		$T_{.1}$	$T_{.2}$	$T_{.3}$		$T_{...}$

ภาพที่ 4 การเก็บตัวอย่างใบชาอัสสัมตามแผนการทดลองแบบ 2x2 Factorial in RCBD



ภาพที่ 5 วิธีการเก็บตัวอย่างใบชาแบบยอด (Young tea leaves) และแบบเมี่ยง (Mature tea leaves)

- หมายเหตุ: 1) สำหรับต้นชาอัสสัมที่มีอายุต้นมากกว่า 100 ปีขึ้นไป ทำการเก็บตัวอย่างใบชาตามลักษณะใบชาที่พบดังปัจจัยที่ 1 (ยอดชาหรือใบเมี่ยง) อย่างน้อย 1 วิธีการ ทั้งนี้เพื่อใช้เป็นข้อมูลเปรียบเทียบคุณสมบัติต่างๆ กับใบชาที่ทำการศึกษา
- 2) การเก็บตัวอย่างใบชาทั้ง 2 ลักษณะดังปัจจัยที่ 1 อาจถูกเก็บในสวนเดียวกันหรือสวนที่ปลูกในบริเวณใกล้เคียงกัน ทั้งนี้เพื่อให้ได้ปริมาณตัวอย่างที่เพียงพอต่อการนำไปวิเคราะห์ (ไม่น้อยกว่า 5 กิโลกรัมสดต่อตัวอย่าง)

1.3) ศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและสารสำคัญของชาอัสสัม โดยนำตัวอย่างใบชาอัสสัมจากพื้นที่ที่คัดเลือกในข้อ 2) มาทำการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์/สารสำคัญ และฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ดังนี้

1.3.1) ลักษณะทางกายภาพและร้อยละของสารสกัด

1.3.2) สมบัติทางเคมีและวิเคราะห์คุณภาพเบื้องต้นของสารสกัดชาอัสสัม ดังนี้

(1) ปริมาณสารพอลิฟีนอลรวม (Total polyphenol) โดยทำปฏิกิริยากับสาร Folin-Ciocalteu และวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer

(2) ปริมาณสารสำคัญหลัก (Major component) หรือสารออกฤทธิ์ (Active component) โดยวิธี HPLC

1.3.3) ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา/สารสำคัญของชาอัสสัม เช่น

(1) ฤทธิ์ต้านจุลชีพที่เป็นตัวแทนของจุลินทรีย์ฤทธิ์ต้านจุลชีพที่เป็นตัวแทนของจุลินทรีย์ก่อโรคต่างๆ เช่น แบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร แบคทีเรียก่อโรคผิวหนัง แบคทีเรียก่อโรคช่องปาก และยีสต์ราก่อโรค

(2) ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันหรืออนุมูลอิสระ (Antioxidant activity) โดยใช้วิธีการที่ศึกษาที่เหมาะสม เช่น ABTS assay, FRAP หรือ Lipid peroxidation assay

(3) ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนส (Collagenase enzyme inhibition) เพื่อประเมินความสามารถในการลดเลือนริ้วรอย (Anti-wrinkle)

(4) ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Inhibition of tyrosinase enzyme activity)

(5) ฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ α -amylase และ α -glucosidase ของสารสกัด (ฤทธิ์ลด/ยับยั้งภาวะเมแทบอลิกซินโดรม ซึ่งมีความสัมพันธ์กับโรคเบาหวาน ไขมัน ความดัน)

(6) ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกลไกการเกิดภาวะความดันสูง

1.4) จัดทำข้อมูลพื้นที่ปลูกชาอัสสัมเชิงแผนที่ (Mapping)

1.5) ประมวลและสรุปผลการศึกษา

2) การศึกษาแนวทางการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากชาอัสสัมที่มีอัตลักษณ์เฉพาะถิ่น

2.1) คัดเลือกชุมชนในพื้นที่โครงการพัฒนาพื้นที่สูงแบบโครงการหลวงที่มีผลิตภัณฑ์ชาอัสสัมและมีโอกาสในการต่อยอดพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ชาอัสสัมที่มีอัตลักษณ์เฉพาะถิ่น จำนวน 2 แห่ง

2.2) ศึกษามาตรฐาน/ข้อกำหนดที่เกี่ยวข้องกับผลิตภัณฑ์ชาอัสสัมของชุมชนที่คัดเลือก เช่น มาตรฐานสินค้าเกษตร มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน (มผช.) และประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 196) พ.ศ. 2543 ว่าด้วยเรื่อง ชา เป็นต้น

2.3) ศึกษาแนวทางการพัฒนากระบวนการผลิตและคุณภาพของผลิตภัณฑ์ชาอัสสัมของชุมชนที่คัดเลือก ตามมาตรฐาน/ข้อกำหนดของผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวข้อง โดยอาศัยกระบวนการมีส่วนร่วมของชุมชน เช่น

- การปรับปรุงคุณภาพวัตถุดิบใบชาสดตามมาตรฐานสินค้าเกษตร สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ

- การพัฒนากระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์ชาอัสสัมโดยใช้หลักเกณฑ์วิธีการที่ดีเบื้องต้น (Primary GMP) ตามประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา และประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 196) พ.ศ. 2543 ว่าด้วยเรื่อง ชา

2.4) ตรวจวิเคราะห์คุณภาพตัวอย่างผลิตภัณฑ์ชาอัสสัมของชุมชน ได้แก่ ความชื้น คาเฟอีน เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค (*Salmonella* spp. และ *Staphylococcus aureus*) โลหะหนัก (ตะกั่วและ สารหนู) เป็นต้น

2.5) ศึกษาแนวทางการพัฒนากระบวนการผลิตและคุณภาพของผลิตภัณฑ์ชาอัสสัมของชุมชนที่คัดเลือก ตามมาตรฐาน/คุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวข้อง โดยอาศัยกระบวนการมีส่วนร่วมของชุมชน เช่น

- การปรับปรุงคุณภาพวัตถุดิบใบชาสดตามมาตรฐานสินค้าเกษตร สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ

- การพัฒนากระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์ชาอัสสัมโดยใช้หลักเกณฑ์วิธีการที่ดีเบื้องต้น (Primary GMP) ตามมาตรฐานคณะกรรมการอาหารและยา เป็นต้น

2.6) ประมวลผล วิเคราะห์ข้อมูล และสรุปผลการศึกษา

3) การศึกษาแนวทางการขึ้นทะเบียนสิ่งบ่งชี้ทางภูมิศาสตร์ (GI) ของแหล่งผลิตชาอัสสัมคุณภาพสูง

3.1) ศึกษาและวิเคราะห์เงื่อนไขการขึ้นทะเบียนสิ่งบ่งชี้ทางภูมิศาสตร์ (GI) ของไทย กล่าวคือ พระราชบัญญัติคุ้มครองสิ่งบ่งชี้ทางภูมิศาสตร์ พ.ศ. 2546 เปรียบเทียบกับกฎหมายสิ่งบ่งชี้ทางภูมิศาสตร์และการรับรองผลิตภัณฑ์พิเศษซึ่งรับรองการผลิตด้วยวิธีดั้งเดิมของสหภาพยุโรป ตามระเบียบเลขที่ 1151/2012 ว่าด้วยระบบมาตรฐานสำหรับผลิตภัณฑ์การเกษตรและผลิตภัณฑ์อาหาร เพื่อแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างภูมิปัญญาท้องถิ่นอาหารกับสิ่งบ่งชี้ทางภูมิศาสตร์ และการรับรองผลิตภัณฑ์พิเศษซึ่งรับรองการผลิตด้วยวิธีดั้งเดิม เพื่อการวิเคราะห์แนวทางในการคุ้มครองภูมิปัญญาท้องถิ่น

3.2) คัดเลือกแหล่งปลูกชาอัสสัมคุณภาพสูงในพื้นที่โครงการพัฒนาพื้นที่สูงแบบโครงการหลวง จำนวน 2 แห่ง เพื่อวิเคราะห์โอกาสและแนวทางการขึ้นทะเบียนสิ่งบ่งชี้ทางภูมิศาสตร์ (GI) ของแหล่งผลิตชาอัสสัมคุณภาพสูง

3.3) ประมวลผลและสรุปผลการศึกษา

3.1.2 การศึกษาวิจัยดินฮั้งดอย (*Daiswa polyphylla* (Smith) Raf.) พืชสมุนไพรหายากบนพื้นที่สูง เพื่อพัฒนาให้เกิดคุณค่าทางเศรษฐกิจ

พื้นที่ดำเนินงาน : ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงและโครงการพัฒนาพื้นที่สูงแบบโครงการหลวง อย่างน้อย 10 แห่ง

1) การสำรวจแหล่งกำเนิดและการกระจายตัวของดินฮั้งดอยบนพื้นที่สูง

1.1) สำรวจแหล่งกำเนิดและการกระจายตัว โดยการสอบถามชุมชนหรือเจ้าหน้าที่ในพื้นที่

1.2) จัดทำแผนที่แหล่งกำเนิดและการกระจายตัวของดินฮั้งดอยบนพื้นที่สูง อย่างน้อย

10 แห่ง

1.3) การศึกษาความสัมพันธ์ของปัจจัยสิ่งแวดล้อม อย่างน้อย 3 แห่ง

1.3.1) ศึกษาและบันทึกสภาพแวดล้อมที่ดินฮั้งดอยเจริญเติบโต ได้แก่ อุณหภูมิ ความชื้น และความเข้มแสง

1.3.2) เก็บตัวอย่างดินที่ดินฮั้งดอยเจริญเติบโตและวิเคราะห์คุณสมบัติดินบางประการ โดยใช้ชุดทดสอบดินแบบง่าย Soil Test Kit โดยมีรายละเอียดคือ

(1) การวิเคราะห์ค่าความเป็นกรดหรือด่าง (pH) ในดิน โดยวิธีการดังต่อไปนี้

(1.1) ตักดิน ใส่หลอดพลาสติก ผสมกับน้ำกลั่นให้เข้ากัน ในอัตรา 1:1

(1.2) ทิ้งให้ดินตกตะกอน

(1.3) ใช้เครื่องวัดค่า pH สำหรับวัดกรดหรือด่าง แบบดิจิตอล (pH Meter) จุ่มปลายลงไปในการละลาย ให้พอท่วมหัววัด จากนั้นอ่านค่า pH ของสารละลายตัวอย่าง ค่าความเป็นกรดหรือด่าง (pH) ของดิน ซึ่งผลที่ได้คือ มีความเป็นกรดโดยเฉลี่ย คือ 6.07

(2) การวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัส (P) ในดิน โดยวิธีการดังต่อไปนี้

(2.1) ตักดิน ประมาณ 1 กรัม หรือ 1 ช้อน ใส่ลงในขวดพลาสติก

(2.2) ใช้หลอดฉีดยาคูดยาน้ำยา P1 จำนวน 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวด ปิดฝาเขย่าทันที เป็นเวลา 1 นาที

(2.3) กรองสารละลายด้วยกระดาษกรองและกรวยกรอง นำขวดพลาสติกไปให้รองรับสารละลายที่กรองได้

(2.4) เติมน้ำยาพัฒนาสี โดยผสมน้ำยา P2 จำนวน 10 มิลลิลิตร กับ ผงพัฒนาสี จำนวน 1 หลอด ปิดฝา เขย่าให้ละลาย

(2.5) เติมน้ำยาพัฒนาสีจำนวน 4 หลอด หรือให้เท่ากับจำนวน ตัวอย่างดิน โดย

หลอดที่ 1 เติมน้ำยามาตรฐาน P1 จำนวน 1 มิลลิลิตร

หลอดที่ 2 เติมน้ำยามาตรฐาน P2 จำนวน 1 มิลลิลิตร

หลอดที่ 3 เติมน้ำยามาตรฐาน P3 จำนวน 1 มิลลิลิตร

หลอดที่ 4 เติมน้ำยาพัฒนาสี (จากข้อ 3) จำนวน 1 มิลลิลิตร

(2.6) เติมน้ำยาพัฒนาสี (จากข้อ 4) ลงไปทุกหลอด หลอดละ 1 มิลลิลิตร

(2.7) เติมน้ำยา P3 จำนวน 3 มิลลิลิตร ลงไปทุกหลอด ปิดฝา และเขย่าให้ เข้ากัน ทิ้งไว้ 15 นาที

(2.8) เปรียบเทียบสีของตัวอย่างดิน (หลอดที่ 4) กับสีของน้ำยามาตรฐาน (หลอดที่ 1-3) และประเมินปริมาณของฟอสฟอรัสในตัวอย่างดิน ซึ่งผลที่ได้ คือ มีฟอสฟอรัส (P) เป็น กลาง

(3) วิเคราะห์ปริมาณโพแทสเซียม (K) ในดิน โดยวิธีการดังต่อไปนี้

(3.1) ตักดิน ประมาณ 3 กรัม หรือ 3 ช้อน ใส่ลงในขวดพลาสติก

(3.2) ใช้หลอดฉีดยาคูดยาน้ำยา K1 จำนวน 12 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวด ปิดฝาเขย่าทันที เป็นเวลา 15 นาที

(3.3) กรองสารละลายด้วยกระดาษกรองและกรวยกรอง นำขวดพลาสติก ไปให้รองรับสารละลายที่กรองได้

(3.4) เติมน้ำยาพัฒนาสีจำนวน 4 หลอด หรือให้เท่ากับจำนวน ตัวอย่างดิน โดย

หลอดที่ 1 เติมน้ำยามาตรฐาน K1 จำนวน 1 มิลลิลิตร

หลอดที่ 2 เติมน้ำยามาตรฐาน K2 จำนวน 1 มิลลิลิตร

หลอดที่ 3 เติมน้ำยามาตรฐาน K3 จำนวน 1 มิลลิลิตร

หลอดที่ 4 เติมน้ำยาพัฒนาสี (จากข้อ 3) จำนวน 1 มิลลิลิตร

(3.5) เติมน้ำยา K2 จำนวน 0.5 มิลลิลิตร หรือ 10-12 หยด ลงไปทุกหลอด

(3.6) เติมน้ำยา K3 จำนวน 1 มิลลิลิตร ลงไปทุกหลอด ปิดฝา และเขย่า ให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 2 นาที

(3.7) เปรียบเทียบสีของตัวอย่างดิน (หลอดที่ 4) กับสีของน้ำยามาตรฐาน (หลอดที่ 1-3) และประเมินปริมาณของโพแทสเซียมในตัวอย่างดิน ซึ่งผลที่ได้คือ มีโพแทสเซียม (K) ค่อนข้างสูง

(4) วิเคราะห์ปริมาณอินทรีย์วัตถุ (OM) โดยวิธีการดังต่อไปนี้

(4.1) ใช้ช้อนขนาดเล็กตักดินที่ต้องการวิเคราะห์ประมาณ 0.25 กรัม หรือ 1 ช้อน ใส่ลงในขวดพลาสติก

(4.2) ใช้หลอดฉีดยาดูดน้ำยา OM จำนวน 10 มิลลิลิตร ใส่ลงไปในขวดแล้วปิดฝาเขย่าด้วยมือเป็นเวลา 30 นาที

(4.3) กรองสารละลายด้วยกระดาษกรองและกรวยกรอง นำขวดพลาสติกใบใหม่รองรับสารละลายที่กรองได้

(4.4) ดูดสารละลายที่กรองได้ ใส่หลอดพลาสติกประมาณ 2-3 มิลลิลิตร

(4.5) นำสารละลายที่สกัดได้จากตัวอย่าง เปรียบเทียบกับสีของสารละลายที่สกัดได้จากตัวอย่างดินมาตรฐาน OM1, OM2 และ OM3 ซึ่งผลที่ได้คือ มีอินทรีย์วัตถุ (OM) สูง

1.4) วิเคราะห์และสรุปผล

2) ศึกษาวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและสารสำคัญของดินฮังดอยบนพื้นที่สูง

2.1) เก็บรวบรวม/เตรียมตัวอย่าง สำหรับใช้ศึกษาฤทธิ์ อย่างน้อย 10 แห่ง

2.2) ศึกษาวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 10 แห่ง แห่งละ 1 ตัวอย่าง

2.2.1) เตรียมตัวอย่างสำหรับการศึกษาวิเคราะห์

(1) นำดินฮังดอยมาทำการลดขนาด และสกัดด้วยตัวทำละลายและวิธีการที่เหมาะสม โดยใช้ตัวทำละลายที่มีสภาพความเป็นขั้วที่แตกต่างกัน (เช่น petroleum ether, ethyl acetate, ethanol) ด้วยวิธีการหมักหรือการสกัดต่อเนื่องโดย Soxhlet's apparatus

โดยนำตัวอย่างแห้งมาทำการบดลดขนาดพอหยาบ ชั่งสมุนไพรแห้งบดหยาบ 10 กรัม ใส่ถุงผ้าดิบที่เย็บไว้ตั้งชุดสกัด เติมตัวทำละลาย 95% Ethanol ปริมาตร 300 มิลลิลิตร สกัดจนตัวทำละลายเป็นสีใส (ใช้เวลาทั้งหมด 2 วัน) กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 แล้วนำไประเหยแห้งให้ได้สารสกัดที่เข้มข้นด้วยเครื่อง Rotary evaporator

(2) สารสกัดหยาบที่ได้ ทำการระเหยตัวทำละลายออกให้เข้มข้น เพื่อนำไปศึกษาองค์ประกอบทางเคมี และทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

2.2.2) ทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน 2 วิธีการ ได้แก่

(1) ABTS method

(1.1) เตรียม Stock ABTS solution ด้วยสารละลาย ABTS ความเข้มข้น 7 mg/mL และ Potassium persulfate ความเข้มข้น 2.45 mg/mL ที่ทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ 1 วัน และเจือจางจนมีค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 0.7-0.9 ที่ความยาวคลื่น 734 nm

(1.2) เตรียม Stock solution ของสารละลายมาตรฐาน Trolox ที่ความเข้มข้น 1.0 mg/mL แล้วทำการเจือจางให้อยู่ในช่วงความเข้มข้นตั้งแต่ 0.1-1.0 mg/mL

(1.3) ผสมสารละลายข้อ (1.1) ปริมาตร 2,000 μl กับ สารละลายข้อ (1.2) ปริมาตร 20 μl ทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 734 nm

(1.4) นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้หลังการทำปฏิกิริยามาคำนวณ % Inhibition ตามสมการดังต่อไปนี้

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{[(Ac - At)/Ac] \times 100}{}$$

เมื่อ Ac = ค่าการดูดกลืนแสงของ ABTS solution

At = ค่าการดูดกลืนแสงของ สารมาตรฐาน หรือ ตัวอย่าง

(1.5) นำค่า % Inhibition และ ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน ที่ได้มา plot graph เพื่อหาความสัมพันธ์

(1.6) เตรียม Stock solution ของสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้น 5 mg/ml แล้วทำการวัดฤทธิ์ตามข้อ (3)-(5)

คำนวณ และรายงานผลเป็น TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity)

(2) DPPH method

(2.1) เตรียม Stock DPPH solution ความเข้มข้น 2.4 mg/ml ด้วย ตัวทำละลาย ethanol และเจือจางจนมีค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 0.9-1.0 ที่ความยาวคลื่น 520 nm

(2.2) เตรียม Stock solution ของสารละลายมาตรฐาน Trolox ที่ความเข้มข้น 0.1 mg/ml แล้วทำการเจือจางให้อยู่ในช่วงความเข้มข้นตั้งแต่ 0.008-0.1 mg/ml

(2.3) ผสมสารละลายข้อ (2.1) ปริมาตร 1,800 μl กับ สารละลายข้อ (2.3) ปริมาตร 200 μl ทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 520 nm

(2.4) นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้หลังการทำปฏิกิริยามาคำนวณ % Inhibition ตามสมการดังต่อไปนี้

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{[(Ac - At)/Ac] \times 100}{}$$

เมื่อ Ac = ค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH solution

At = ค่าการดูดกลืนแสงของ สารมาตรฐาน หรือ ตัวอย่าง

(2.5) นำค่า % Inhibition และ ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน ที่ได้มา plot graph เพื่อหาความสัมพันธ์

(2.6) เตรียม Stock solution ของสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้น 5 mg/ml แล้วทำการวัดฤทธิ์ตามข้อ (3)-(5)

(2.7) คำนวณ และรายงานผลเป็น TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity)

2.3) ศึกษาวิเคราะห์สารสำคัญ เช่น ซาโปนิน และสารอื่นๆ อย่างน้อย 5 แห่ง แห่งละ 1 ตัวอย่าง

2.3.1) การตรวจสอบปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิก

การตรวจสอบปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกใช้ Folin-Ciocalteu method สารสกัดของต้นฮังดอยและสาร gallic acid เตรียมให้อยู่ในความเข้มข้น 1 mg/mL เติม 500 μ L ของสารสกัดต้นฮังดอยและ gallic acid ลงในหลอดทดลอง ตามด้วย 2.5 mL ของ Folin-Ciocalteu reagent และ 2 mL ของ 7.5 % (w/v) sodium carbonate (เตรียม reagent blank ที่ไม่มี Folin-Ciocalteu reagent และ control ที่ไม่มี sample/standard) ตัวอย่างวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดที่ 760 nm คำนวณปริมาณฟีนอลิกรวม (milligrams of gallic acid equivalent (GAE) per gram dry weight (mg GAE/g))

2.3.2) การตรวจสอบสารกลุ่มซาโปนิน

(1) ตรวจสอบปริมาณซาโปนินรวม

การสกัดเพื่อตรวจสอบปริมาณซาโปนิน (Content of total crude saponin)

ชั่งตัวอย่างผงสมุนไพร 2 กรัม ใส่ในขวดก้นกลมขนาด 500 มิลลิกรัม เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 200 มิลลิลิตร สกัดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยใช้เตาให้ความร้อนในการสกัด นำไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 และล้างกากด้วยน้ำกลั่นร้อน ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

สารสกัดที่ได้ นำไปแยกด้วย 1-Butanol ด้วย Separating funnel โดยจะใช้ 1- Butanol ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ทั้งหมด 3 ครั้ง เก็บส่วน 1-Butanol นำไประเหยให้แห้งใน حمامระเหยที่รู้น้ำหนักที่แน่นอน ด้วย water bath (ทำการทดลองในตู้ดูดควัน) จากนั้นนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส และชั่งน้ำหนักคงที่ได้ จะได้น้ำหนักของสารสกัดของสารกลุ่มซาโปนิน

(2) ตรวจสอบปริมาณซาโปนินรวมด้วย spectroscopic technique

เตรียมสารสกัดต้นฮังดอยและสารมาตรฐาน diosgenin 1mg/mL ใน methanol แล้วเติมลงในหลอดทดลอง 250 μ L ตามด้วย 250 μ L 8 % vanillin reagent ที่เตรียมใน absolute ethanol และ 2.5 mL ของ 72 % sulphuric acid v/v ทำปฏิกิริยาที่ 60 °C ใน water bath เป็นเวลา 10 min (เตรียม reagent blank ที่ไม่มี vanillin reagent และ control ที่ไม่มี sample/standard) รอให้เย็นแล้วนำไปวัด spectrophotometer ที่ 544 nm จากนั้นคำนวณปริมาณซาโปนินรวม (milligrams of Diosgenin equivalent (DE) per gram dry weight (mg DE/g))

2.3.3) จัดทำ Chemical fingerprint ด้วย Thin Layer Chromatographic Technique (TLC)

การเตรียมสารมาตรฐานและตัวอย่าง

เตรียมสารมาตรฐาน ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยตัวทำละลายเอทานอล และตัวอย่างที่ความเข้มข้น 10 mg/ml ด้วยตัวทำละลายเอทานอล

วิธีการทดสอบ

นำสารละลายตัวอย่างที่เตรียมมา spot ลงบนแผ่น TLC โดย spot ให้ห่างจากขอบล่าง 1 เซนติเมตร เตรียม mobile phase ใส่ลงในภาชนะแก้วที่มีฝาปิดแล้วตั้งทิ้งไว้จนอิ่มตัว จากนั้นนำแผ่น TLC ที่ spot สารตัวอย่างแล้วมาวางลงในภาชนะแก้วที่บรรจุ solvent ที่เตรียมไว้โดยให้ตำแหน่งตัวอย่างอยู่เหนือตัวทำละลาย และปิดฝาภาชนะให้สนิท เพื่อให้ภายใน

ภาชนะอิมมัลด้วยไอของตัวทำละลาย เมื่อตัวทำละลายเคลื่อนขึ้นไปจนเกือบถึงขอบบนให้น้ำแผ่น TLC ออก แล้วผึ่งไว้ให้แห้ง ตรวจสอบแถบสารสำคัญที่ขึ้นบนแผ่น TLC ภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร บันทึกภาพและตำแหน่งของแถบสารที่ปรากฏจากนั้นคำนวณค่า Rf

2.4) วิเคราะห์เปรียบเทียบฤทธิ์/สารสำคัญ จากตัวอย่างพื้นที่ต่างๆ

2.5) ประมวลผลและสรุปผลการศึกษา

3) ศึกษาวิธีการเพิ่มกระบวนการขยายพันธุ์ต้นฮังดอย

3.1) ทดสอบการเพาะขยายพันธุ์ด้วยวิธีไม่อาศัยเพศ หรือการแบ่งเหง้า

3.1.1) รวบรวมและเตรียมเหง้าพันธุ์สำหรับทดสอบการเพาะขยายพันธุ์

3.1.2) วางแผนการทดลองแบบ RCBD 4 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ

5 ตัวอย่าง ประกอบด้วย

- GA₃ ความเข้มข้น 50 mg/l.

- GA₃ ความเข้มข้น 100 mg/l.

- GA₃ ความเข้มข้น 100 mg/l. + IBA ความเข้มข้น 100 mg/l.

- ไม่ใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต

3.1.3) ปลุกทดสอบโดย

- ใช้วัสดุรองพื้นและคลุมหน้าดิน ได้แก่ แกลบดำ

- กำจัดเชื้อโรคบริเวณแผลโดยใช้น้ำยาฟอกฆ่าเชื้อ ได้แก่ Clorox

- ปลุกภายใต้โรงเรือนทดสอบที่พรางแสงด้วย สแลนด 50 เปอร์เซ็น

- ควบคุมความชื้น โดยคลุมแปลงด้วยฟางข้าว และให้น้ำอย่างสม่ำเสมอ

3.1.4) บันทึกขนาดเหง้าก่อนทดสอบ ได้แก่ ความยาว ความกว้าง และน้ำหนักเหง้า และการเปลี่ยนแปลงหลังทดสอบหรือผลการเจริญเติบโตของต้นฮังดอย

3.1.5) สรุปผลการทดสอบ

ตารางที่ 1 พื้นที่ทดสอบการเพาะขยายพันธุ์ต้นฮังดอยด้วยวิธีแบ่งเหง้า จำนวนตัวอย่างและระยะเวลาการทดสอบปลูก

ลำดับ	พื้นที่ทดสอบ	ระดับความสูงจากระดับน้ำทะเล (เมตร)	จำนวนเหง้าที่ทดสอบ/วิธีการ	วันเริ่มทดสอบ	วันบันทึกข้อมูล	ระยะเวลา
1	บ้านปางมะโอ กก.ป่าแป๋	800	5 เหง้า	3 ก.ค. 67	9 ก.ย. 67	2 เดือน
2	บ้านแม่สายป่าเมี่ยง กก.โหล่งซอด	1,000	5 เหง้า	5 ม.ค. 67	9 ก.ย. 67	8 เดือน
3	บ้านสามหลัง ศ.ห้วยส้มป่อย	1,300	5 เหง้า	2 ม.ค. 67	13 ก.ย. 67	8 เดือน

3.2) ทดสอบการเพาะขยายพันธุ์ด้วยวิธีอาศัยเพศ หรือเมล็ด

3.2.1) รวบรวมและเตรียมเมล็ดพันธุ์สำหรับทดสอบการเพาะขยายพันธุ์

3.2.2) วางแผนการทดลองแบบ 4x4 Factorial in RCBD ประกอบด้วย 2 ปัจจัย ทวนซ้ำ 3 ครั้ง ซ้ำละ 10 ตัวอย่าง

ปัจจัยที่ 1 การจัดการเมล็ดก่อนเพาะขยายพันธุ์ 4 วิธี ได้แก่

- ไม่มีการจัดการเมล็ดก่อนทดสอบ
- แกะเปลือกหุ้มเมล็ดก่อนทดสอบ
- ใช้วิธีกล ได้แก่ ฝนเมล็ดด้วยกระดาษทรายประมาณเบอร์ 4
- แช่น้ำร้อนอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน

ปัจจัยที่ 2 การใช้และไม่ใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต 4 วิธี ได้แก่

- GA₃ ความเข้มข้น 50 mg/l.
- GA₃ ความเข้มข้น 100 mg/l.
- GA₃ ความเข้มข้น 100 mg/l. + IBA ความเข้มข้น 100 mg/l.
- ไม่ใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต

3.2.3) ปลุกทดสอบโดยใช้วัสดุปลูก ได้แก่ ขุยมะพร้าว และควบคุมความชื้น โดยคลุมแปลงด้วยฟางข้าว และให้น้ำอย่างสม่ำเสมอ

3.2.4) บันทึกอัตราการงอกหรือผลการเจริญเติบโตของต้นผู้ทดลอง

3.2.5) วิเคราะห์ข้อมูลและสรุปผลการทดสอบ

ตารางที่ 2 พื้นที่ทดสอบการเพาะขยายพันธุ์ต้นผู้ทดลองด้วยวิธีเพาะเมล็ด จำนวนตัวอย่างและระยะเวลาการทดสอบปลูก

ลำดับ	พื้นที่ทดสอบ	ระดับความสูงจากระดับน้ำทะเล (เมตร)	จำนวนเมล็ดที่ทดสอบ/วิธีการ	วันเริ่มทดสอบ	วันบันทึกข้อมูล	ระยะเวลา
1	บ้านห้วยเป้า คก.ห้วยเป้า	500	15 เมล็ด	21 ธ.ค. 66	2 ก.ย. 67	8 เดือน
2	บ้านแม่สายป่าเมี่ยง คก.โหล่งซอด	1,000	15 เมล็ด	4 ม.ค. 67	9 ก.ย. 67	8 เดือน
3	บ้านป่าเกี๊ยะ ค.ห้วยน้ำขุ่น	700	15 เมล็ด	19 มค 67	5 กย 67	7.5 เดือน
4	บ้านสามหลัง ค.ห้วยส้มป่อย	1,300	15 เมล็ด	2 ม.ค. 67	13 ก.ย. 67	8 เดือน

3.1.3 การศึกษาการอนุรักษ์ ป่าชุมชน และใช้ประโยชน์ความหลากหลายทางชีวภาพบนพื้นที่สูง

พื้นที่ดำเนินงาน : พื้นที่ศูนย์พัฒนาโครงการหลวง 1 แห่ง และโครงการพัฒนาพื้นที่สูงแบบโครงการหลวง 1 แห่ง

1) ทดสอบกระบวนการขับเคลื่อนกิจกรรมเพื่ออนุรักษ์และคุ้มครองพืชสมุนไพรบนพื้นที่สูงแบบมีส่วนร่วม ภายใต้พระราชบัญญัติคุ้มครองและส่งเสริมภูมิปัญญาการแพทย์แผนไทย

1.1) พื้นที่โครงการพัฒนาพื้นที่สูงแบบโครงการหลวง 1 แห่ง

1.1.1) คัดเลือกพื้นที่ศึกษาแนวทางการคุ้มครองสมุนไพรในพื้นที่อนุรักษ์ร่วมกับชุมชน

1.1.2) สัมภาษณ์รวบรวมข้อมูลชุมชน ด้านสมุนไพร และกิจกรรมอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง

1.1.3) สัมภาษณ์รวบรวมองค์ความรู้และภูมิปัญญาท้องถิ่น การใช้พืชท้องถิ่นและพืชสมุนไพรของชุมชน

1.1.4) สัมภาษณ์สถานภาพพืชสมุนไพร และการใช้ประโยชน์จากป่าชุมชน เช่น

- สมุนไพรที่มีค่าต่อการศึกษาวิจัย
- สมุนไพรที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ
- สมุนไพรที่อาจจะสูญพันธุ์และขาดแคลนในชุมชน
- สมุนไพรที่ชุมชนให้เป็นเอกลักษณ์ของพื้นที่ พืช/สัตว์ จากป่าที่ชุมชน

มีการใช้ประโยชน์มาก

- สมุนไพรที่ชุมชนขยายพันธุ์ยาก
- สมุนไพรที่ชุมชนต้องการปลูกฟื้นฟูในป่าชุมชน
- สมุนไพรที่ชุมชนต้องการปลูกเพิ่มในชุมชน โดยวิธีประชุมกลุ่มย่อย

(Focus Group)

1.1.5) ประเมินความพร้อมของข้อมูลและชุมชน และแนวทางการอนุรักษ์และคุ้มครองพืชสมุนไพรบนพื้นที่สูงร่วมกับชุมชน

1.2) พื้นที่ศูนย์พัฒนาโครงการหลวง 1 แห่ง

1.2.1) รวบรวม ขยายพันธุ์ และปลูกฟื้นฟูสมุนไพรท้องถิ่นสำคัญหรือมีมูลค่าทางเศรษฐกิจของชุมชน

1.2.2) สืบค้นและพัฒนาเส้นทางศึกษาสมุนไพรเพื่ออนุรักษ์/คุ้มครอง หรือท่องเที่ยวเชิงอนุรักษ์ บริเวณถิ่นกำเนิด

1.2.3) รวบรวมข้อมูลสรุปจัดทำสื่อสมุนไพรท้องถิ่นของชุมชน

2) สืบค้นมาตรการและข้อกำหนดการสนับสนุนการอนุรักษ์คุ้มครองพืชสมุนไพรของหน่วยงานอื่น

2.1) หน่วยงานราชการ

2.2) บริษัทเอกชน

2.3) หน่วยงานต่างประเทศ

3.2 สถานที่ดำเนินการวิจัย

พื้นที่ดำเนินงานของสถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูงและมูลนิธิโครงการหลวง อย่างน้อยจำนวน 12 แห่ง คือ

- 1) ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงห้วยส้มป่อย อ.แม่แจ่ม จ.เชียงใหม่
- 2) ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงวัดจันทร์ อ.กัลยาณิวัฒนา จ.เชียงใหม่
- 3) ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงห้วยน้ำขุน อ.แม่สรวย จ.เชียงราย
- 4) โครงการพัฒนาพื้นที่สูงแบบโครงการหลวงป่าแป๋ อ.แม่แตง จ.เชียงใหม่
- 5) โครงการพัฒนาพื้นที่สูงแบบโครงการหลวงโหล่งขอด อ.พร้าว จ.เชียงใหม่
- 6) โครงการพัฒนาพื้นที่สูงแบบโครงการหลวงปางมะโอ อ.เชียงดาว จ.เชียงใหม่
- 7) โครงการพัฒนาพื้นที่สูงแบบโครงการหลวงป่ากล้วย อ.แม่แจ่ม จ.เชียงใหม่
- 8) โครงการพัฒนาพื้นที่สูงแบบโครงการหลวงแม่มะลอ อ.แม่แจ่ม จ.เชียงใหม่
- 9) โครงการพัฒนาพื้นที่สูงแบบโครงการหลวงปางหินฝน อ.แม่แจ่ม จ.เชียงใหม่
- 10) โครงการพัฒนาพื้นที่สูงแบบโครงการหลวงวาวี อ.แม่สรวย จ.เชียงราย
- 11) โครงการพัฒนาพื้นที่สูงแบบโครงการหลวงแม่สลอง อ.แม่ฟ้าหลวง จ.เชียงราย
- 12) โครงการพัฒนาพื้นที่สูงแบบโครงการหลวงแม่จริม อ.แม่จริม จ.น่าน