บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1. กลุ่มตัวอย่างในการวิจัย

กลุ่มตัวอย่าง คือ ข้าวกล้องและข้าวกล้องงอกจำนวน 3 สายพันธุ์ ดังนี้

1.1 ข้าวเหนียวขาวกล้องพันธุ์ กข6 ตรา คันไถ พื้นที่ปลูก จังหวัดเชียงใหม่

1.2 ข้าวเหนียวขาวกล้องงอกพันธุ์ กข6 ตรา คันไถ พื้นที่ปลูก จังหวัดเชียงใหม่

1.3 ข้าวเหนียวดำกล้องพันธุ์สันกำแพง ตรา คันไถ พื้นที่ปลูก จังหวัดเชียงใหม่

1.4 ข้าวเหนียวดำกล้องงอกพันธุ์สันกำแพง ตรา คันไถ พื้นที่ปลูก จังหวัดเชียงใหม่

1.5 ข้าวเหนียวดำกล้องงอกพันธุ์ดอยมูเซอ ตรา B-Herbs พื้นที่ปลูก จังหวัดเชียงราย

1.6 ข้าวเหนียวดำกล้องงอกพันธุ์ดอยมูเซอ ตรา B-Herbs พื้นที่ปลูก จังหวัดเชียงราย

กลุ่มตัวอย่าง ลูกแป้งข้าวหมาก จากอำเภอไชยปราการ จังหวัดเชียงใหม่

2. สถานที่ทำการวิจัย

การวิจัยครั้งได้ทำการศึกษาวิจัยในห้องปฏิบัติการชีววิทยา ศูนย์วิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ และห้องปฏิบัติการเคมี สาขาวิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่

3. เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมี

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
2. เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Precision balance)
3. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)
4. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)

5. เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator)
6. ตู้เย็น (Refrigerator)
7. แสงอัลตราไวโอเลต (UV light source)
8. เครื่องเขย่าสารแนวราบ (Orbital shaker)
9. เครื่องวัด pH (Microprocessor pH meter)
10. ที่วัดอุณหภูมิ (Thermometer)
11. เครื่องวัดความหวาน (Hand Refractometer)
12. เครื่องวัดปริมาณแอลกอฮอล์ (Ebulliometer)
13. เครื่องเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครไตเตอร์เพลท (microtiter plate reader)
14. กระบอกตวง (Measuring cylinder)
15. หลอดทดลอง (Test tube)
16. ที่วางหลอดทดลอง (Test tube rack)
17. ถุงพลาสติก (Plastic bag)
18. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)
19. อะลูมิเนียมฟอยล์ (Aluminum foil)
20. กรวยกรองแก้ว (Glass funnel)
21. กระดาษกรอง (Filter paper)
22. แท่งแก้วคนสาร (Stirring rod
23. ขวดสีชา (Amber glass bottle)
24. ถาดหลุม (Microplate)
25. ไมโครปิเปต (Micropipette)
26. หลอดคาปิลลารี (Capillary tube)
27. บีกเกอร์ (Beaker)
28. กระจกนาฬิกา (Watch glass)
29. ปิเปตอัตโนมัติ (Auto pipette)
30. ทิป (Tip)
31. ถาดหลุมแบบก้นตัด 96 หลุม (96-well microtiter plate)

32. ขวดสเปรย์ (Spray bottle)
33. กล่องพลาสติก
34. ผ้าขาวบาง

3.2 สารเคมี

1. 80% Ethanol
2. 95% Ethanol
3. TLC (Thin layer chromatography) Silica gel $60F_{254}$
4. น้ำกลั่น
5. Ascorbic Acid ($C_6H_8O_6$)
6. DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)
7. Folin-Ciocalteu reagent
8. Sodium carbonate 10%
9. Gallic acid ($C_7H_6O_5$)

วิธีดำเนินงานวิจัย

1. การเตรียมตัวอย่างลูกแป้งข้าวหมาก: เลือกลูกแป้งข้าวหมาก จากอำเภอไชยปราการ จังหวัดเชียงใหม่ โดยพิจารณาลักษณะทางกายภาพของลูกแป้งที่ใช้ คือ เนื้อแป้ง มีเนื้อละเอียดนุ่ม สีขาวนวล กลิ่นไม่เหม็น ไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อราที่ปรากฏบนก้อนลูกแป้ง และไม่มีมอดกิน

2. การเตรียมตัวอย่างข้าวเหนียว: เตรียมตัวอย่างข้าวเหนียวขาวและข้าวเหนียวดำจากข้าวท้องถิ่น จำนวน 3 สายพันธุ์ จากข้าวเหนียวกล้องได้แก่ ข้าวเหนียวขาวกล้อง กข6 ข้าวเหนียวกล้องดำสันกำแพง และข้าวเหนียวดำกล้องดอยมูเซอ และข้าวเหนียวกล้องงอก ได้แก่ ข้าวเหนียวขาวกล้องงอก กข6 ข้าวเหนียวดำกล้องงอกสันกำแพง และข้าวเหนียวดำกล้องงอกดอยมูเซอ โดยการผสมกันในอัตราส่วนของข้าวเหนียวขาวต่อข้าวเหนียวดำ ทั้งหมด 5 อัตราส่วน คือ 1:0, 0:1, 1:3, 1:1 และ 3:1 ตามลำดับ จำนวน 9 ชุดการทดลอง ตามตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 อัตราส่วนการผสมระหว่างข้าวเหนียวขาวและข้าวเหนียวดำของข้าวแต่ละสายพันธุ์

ชุดการทดลองที่	พันธุ์ข้าว	อัตราส่วน
1	ข้าวเหนียวขาว กข6	(1:0)
2	ข้าวเหนียวดำสันกำแพง	(0:1)
3	ข้าวเหนียวดอยดำมูเซอ	(0:1)
4	ข้าวเหนียวขาว กข6 : ข้าวเหนียวดำสันกำแพง	(1:3)
5	ข้าวเหนียวขาว กข6 : ข้าวเหนียวดำสันกำแพง	(1:1)
6	ข้าวเหนียวขาว กข6 : ข้าวเหนียวดำสันกำแพง	(3:1)
7	ข้าวเหนียวขาวกล้อง กข6 : ข้าวเหนียวดำดอยมูเซอ	(1:3)
8	ข้าวเหนียวขาวกล้อง กข6 : ข้าวเหนียวดำดอยมูเซอ	(1:1)
9	ข้าวเหนียวขาวกล้อง กข6 : ข้าวเหนียวดำดอยมูเซอ	(3:1)

ขั้นตอนการผลิตข้าวหมาก (ดัดแปลงจาก อุไรวรรณ วัฒนกุล, 2555)

1. ชั่งน้ำหนักโดยน้ำหนักแห้งของข้าวเหนียวแต่ละสายพันธุ์ ทั้งข้าวเหนียวกล้องและข้าวเหนียวกล้องงอกของข้าวแต่ละสายพันธุ์ ตามตารางที่ 3.1

2. นำข้าวที่ชั่งได้ในแต่ละชุดการทดลองทั้งข้าวเหนียวกล้องและข้าวเหนียวกล้องงอกมาแช่ในน้ำกรองโดยแยกแช่ข้าวเหนียวขาว และข้าวเหนียวดำ ใช้อัตราส่วนข้าวเหนียวต่อน้ำกรอง 1:2 (ข้าวเหนียว 1,000 กรัม: น้ำกรอง 2000 กรัม)

3. จากนั้นแช่ทิ้งไว้เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง (27±2 องศาเซลเซียส) นำข้าวที่แช่แล้วมาล้างด้วยน้ำกรอง 2 ครั้ง

4. นำข้าวมาห่อด้วยผ้าขาวบาง จากนั้นนำไปนึ่งแยกโดยข้าวเหนียวขาวกล้องใช้เวลานึ่ง 30 นาที ส่วนข้าวเหนียวดำกล้องนึ่ง 45 นาที ส่วนข้าวเหนียวกล้องงอกใช้เวลานึ่ง 25 นาที และข้าวเหนียวดำกล้องงอกใช้เวลานึ่ง 30 นาที

5. นำข้าวที่นึ่งสุกจนทั่วแล้วมาล้างน้ำ 2 ครั้งจนยางของข้าวออก จากนั้นนำไปสะเด็ดน้ำ

6. นำข้าวของแต่ละชุดการทดลองมาผสมให้เข้ากันตามอัตราส่วนแล้ววัดอุณหภูมิเพื่อไม่ให้เกิน 30 องศาเซลเซียส

7. จากนั้นนำลูกแป้งมาบดจนเป็นผงละเอียด จากนั้นนำมาโรยบนข้าวแต่ละชุดการทดลอง โดยน้ำหนักของข้าวแต่ละสูตร (กรัม) ต่อปริมาณลูกแป้งข้าวหมาก (กรัม) คือ 1000:6 กรัม จากนั้นคลุกเคล้าจนทั่ว

8. ตักใส่ถุงพลาสติก บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 3 วัน จนได้ข้าวหมากแต่ละชุดการทดลอง

9. สังเกตลักษณะทางกายภาพของข้าวหมากที่ได้ในแต่ละชุดการทดลองและบันทึกผล

การศึกษาลักษณะทางกายภาพของข้าวหมาก

การทดสอบทางประสามสัมผัส นำข้าวหมากแต่ละชุดการทดลองมาทดสอบทางประสาทสัมผัส และเลือกประชากรกลุ่มทดสอบคือบุคคลทั่วไป จำนวน 30 คน ทดสอบโดยการตรวจพินิจและการชิม ตามเกณฑ์ที่มาตรฐาน มผช.ข้าวหมาก คือ ลักษณะทั่วไป สี กลิ่น รส และลักษณะเนื้อสัมผัส โดยใช้วิธีการประเมินทางประสาทสัมผัสแบบ 9-point hedonic scale ทำการปะเมินโดยการให้คะแนนตามระดับความชอบ 1 -9 โดยที่ ชอบมากที่สุด มีคะแนนเท่ากับ 9 ชอบมาก มีคะแนนเท่ากับ 8 ชอบปานกลาง มีคะแนนเท่ากับ 7 ชอบเล็กน้อยมีคะแนนเท่ากับ 6 เฉย ๆ มีคะแนนเท่ากับ 5 ไม่ชอบเล็กน้อย มีคะแนนเท่ากับ 4 ไม่ชอบปานกลางมีคะแนนเท่ากับ 3 ไม่ชอบมาก มีคะแนนเท่ากับ 2 และไม่ชอบมากที่สุด มีคะแนนเท่ากับ 1 นำผลที่ได้จากการประเมินมาวิเคราะห์ทางสถิติต่อไป

การตรวจวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) นำตัวอย่างข้าวหมากมาบดให้ละเอียดแล้วตั้งทิ้งไว้ให้ตัวข้าวตกตะกอน ทำการหาค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยเครื่อง Microprocessor pH meter จุ่มลงในตัวอย่างข้าวหมาก และอ่านค่าที่ได้ โดยปรับค่ามาตรฐานในการวัดแต่ละครั้งด้วยสารละลายมาตรฐานที่มีความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.00 และ 7.00 ตามลำดับทำโดยทำการหาค่าทั้งหมด 3 ครั้ง

การตรวจวัดปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (Total soluble solids) นำตัวอย่างข้าวหมากที่หมัก มาวัดหาปริมาณของแข็งที่ละลายโดยใช้เครื่อง Hand refractometer บดตัวอย่างข้าวหมากให้ละเอียด แล้วนำมาวัดด้วยเครื่องวัดปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ ซึ่งมีสเกลวัดค่าได้ระหว่าง 0-32 % ปรับเทียบมาตรฐานโดยใช้น้ำกลั่นปรับให้อ่านได้ 0 ก่อนการใช้วัดตัวอย่างทุกครั้ง หยดตัวอย่างข้าวหมากที่ต้องการทดสอบด้วย Dropper 1-2 หยดลงบนเลนส์ Hand refractometer ปิดฝาเลนส์ แล้วส่องไปที่ที่มีแสงสว่าง อ่านค่าที่เส้นแบ่งระหว่างสีขาวกับสีฟ้า แล้วบันทึกผล (ทำการหาค่าทั้งหมด 3 ครั้ง)

การหาปริมาณแอลกอฮอล์ โดยวิธี Ebulliometric analysis นำตัวอย่างข้าวหมากมาบีบคั้นเอาแต่น้ำ นำน้ำข้าวหมากที่ได้ในแต่ละสูตรมาหาปริมาณแอลกอฮอล์ ด้วยเครื่อง Ebulliometer โดยแบ่งการวัดออกเป็น 2 ส่วน คือ วัดจุดเดือดของน้ำบริสุทธิ์ก่อนแล้วจึงหาจุดเดือดของน้ำข้าวหมาก นำค่าจุดเดือดของน้ำบริสุทธิ์ที่ได้ไปตั้งในแผ่นอ่านเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ (Dosage de I'Alcohol dans les vins) โดยตั้งจุดเดือดของน้ำบริสุทธิ์ที่อ่านได้ หาจุดเดือดของน้ำข้าวหมากแต่ละอัตราส่วน ต้มตัวอย่างน้ำข้าวหมากจนเดือดด้วยตะเกียงแอลกอฮอล์ เมื่อถึงจุดเดือดอุณหภูมิจะคงที่ประมาณ 15-30 วินาที อ่านจุดเดือดของน้ำข้าวหมากและบันทึกผล จากนั้นอ่านค่าและบันทึกผลเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ของน้ำข้าวหมาก จากแผ่นอ่านเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ และบันทึกผล ทำเช่นเดียวกันนี้กับน้ำข้าวหมากแต่ละสูตร ทำสูตรละ 3 ครั้ง

ขั้นตอนการเตรียมน้ำข้าวหมาก น้ำข้าวหมากเข้มข้นและสารสกัดเนื้อข้าวหมาก

การเตรียมน้ำข้าวหมาก

1. นำข้าวหมากแต่ละชุดการทดลองที่หมักครบจำนวน 3 วัน มาแยกน้ำข้าวหมากและเนื้อข้าวหมากออกจากกันด้วยผ้าขาวบางแล้วบีบคั้นให้น้ำออกมาจนหมด
2. นำน้ำที่แยกได้ไปตกตะกอนด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วแยกเอาเฉพาะน้ำข้าวหมากส่วนใส จะได้น้ำข้าวหมากสด
3. สังเกตลักษณะของน้ำข้าวหมากที่ได้ แบ่งน้ำข้าวหมากที่ได้ในแต่ละชุดกการทดลอง มาใส่ขวดสีชา ปริมาตรละ 100 มิลลิลิตร แล้วแช่เย็นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ทดสอบคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระและหาปริมาณฟีนอลิกต่อไป

การเตรียมน้ำข้าวหมากเข้มข้น

1. นำน้ำข้าวหมากของทุกชุดการทดลองที่แยกได้ในการเตรียมครั้งแรก มาทำให้เข้มข้นด้วยการระเหยน้ำออกด้วยเครื่อง water bath
2. โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จนได้น้ำข้าวหมากเข้มข้น สังเกตลักษณะของน้ำข้าวหมากเข้มข้นที่ได้ของแต่ละชุดการทดลองแล้วบันทึกผล
3. หาค่าร้อยละผลผลิต (%yield) ที่ได้ของน้ำข้าวหมากเข้มข้นในหน่วยปริมาตร
4. เก็บน้ำข้าวหมากเข้มข้นไว้ในขวดสีชา แล้วแช่เย็นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ทดสอบคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระและหาปริมาณฟีนอลิกต่อไป

การเตรียมสารสกัดเนื้อข้าวหมาก

1. นำเนื้อข้าวหมากที่แยกได้ในแต่ละชุดการทดลองมาชั่งน้ำหนักของเนื้อข้าวหมากที่ได้ไปอบให้แห้งโดยใช้เครื่อง hot air oven ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2. จากนั้นนำเนื้อข้าวหมากแต่ละชุดการทดลองมาไปบดให้ละเอียด

3. นำผงเนื้อข้าวหมากที่ได้ไปสกัดด้วยเอทานอล 80% โดยใช้อัตราส่วนของผงข้าวหมากต่อปริมาตรเอทานอล 1:5 (ผงข้าวหมาก 1 กรัม: เอทานอล 5 มิลลิลิตร)

4. จากนั้นนำไปเขย่าด้วยเครื่อง orbital shaker ด้วยความเร็ว 120 รอบต่อนาที ในที่มืด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5. กรองแยกเอาส่วนที่เป็นตะกอนโดยใช้กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 เพื่อแยกเอาตะกอนที่สกัดในครั้งแรกไม่ได้มาสกัดอีกครั้ง

6. เอาตะกอนที่แยกได้ในครั้งแรกใส่ในเอทานอล 80% โดยใช้อัตราส่วนตะกอนข้าวหมากต่อเอทานอล คือ 1: 2.5 มิลลิลิตร

7. นำไปเขย่าด้วยเครื่อง orbital shaker ด้วยความเร็ว 120 รอบต่อนาที ในที่มืด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ขั้นตอนนี้ ทำซ้ำ 2 ครั้ง

8. นำส่วนที่เป็นเอทานอลในชุดการทดลองเดียวกันมาผสมรวมกันจากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายเอทานอล 80% ออกด้วยเครื่อง vacuum rotary evaporator โดยใช้อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนตัวทำละลายออกจนหมดและจะได้สารสกัดหยาบจากเนื้อข้าวหมาก

9. คำนวณหาค่าร้อยละผลผลิต (% yield) ที่ได้ ของสารสกัดแต่ละชุดการทดลอง

10. นำสารสกัดเนื้อข้าวหมากที่ได้เก็บในขวดสีชา แช่เย็นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ทดสอบคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระและหาปริมาณฟีนอลิกต่อไป

ทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิค TLC Screening for DPPH Radical Scavenger (ดัดแปลงจาก อัครสิทธิ์ บุญส่งแท้ และ สุกิจ ทองแบน, 2554)

1. นำแผ่น TLC (Thin layer chromatography) Silica gel $60F_{254}$ สำเร็จรูป มาจุดตำแหน่งของสารสกัดแต่ละชุดการทดลอง

2. จากนั้นใช้หลอด capillary ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 มิลลิเมตร ดูดสารน้ำข้าวหมาก น้ำข้าวหมากเข้มข้น และสารสกัดจากเนื้อข้าวหมากและแต่ละชุดการทดลอง หยดลงบนแผ่น TLC silica gel จากนั้นปล่อยทิ้งไว้ให้แห้ง

3. จากนั้นฉีดพ่นด้วยสารละลาย 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ ทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที

4. นำแผ่น TLC silica gel มาสังเกตการฟอกจางสีของ DPPH หากสารสกัดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะเกิดการฟอกจางสีของ DPPP จากสีม่วงเป็นสีเหลือง (ชนาธิป วารมนตรี, 2556)

5. ทิ้งไว้จนแห้งแล้วนำไปดูด้วยตาเปล่าและส่องดูภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต (UV) ที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร เพื่อตรวจสอบดูฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระเชิงคุณภาพ

การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Method (ดัดแปลงจาก อภิสรา อินทะรังษี, 2555)

1. เตรียมสารละลายมาตรฐาน DPPH ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ ในตัวทำละลาย เอทานอล 95 % (ภาคผนวก ก)

2. เตรียมสารละลายวิตามินซี ในตัวทำละลายในเอทานอล 95% แต่ละความเข้มข้น 0.100, 0.050, 0.250, 0.013, 0.006 และ 0.003 mg/ml (ภาคผนวก ก)

3. เตรียมสารละลายจากสารสกัดเนื้อข้าวหมากและน้ำข้าวหมากในตัวทำละลายในเอทานอล 95 % แต่ละความเข้มข้น 800, 400, 200, 100 และ 50 mg/ml (ภาคผนวก ก.3 ในภาคผนวก ก)

4. นำสารละลายสารสกัดจากข้าวหมากแต่ละชุดการทดลอง ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ มาอย่างละ 40 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย DPPH 0.2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเก็บไว้ในที่มืด 30 นาที

5. ดูดสารผสมในแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในจานหลุม 96-well microtiter plate นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครไตเตอร์เพลท (microtiter plate reader) และใช้เอทานอล 95% เป็นกลุ่มควบคุม (Blank) ในแต่ละความเข้มข้นจะวัดการดูดกลืนแสงซ้ำ 3 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ยจากนั้นนำไปคำนวณหาค่า %inhibition ดังสมการ

$$\%\text{inhibition} = [(A0-As)/A0] \times 100$$

โดย A0 = ค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้น

As = ค่าการดูดกลืนแสงหลังจากเติมสารตัวอย่าง

6. นำค่าความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่าง และ % inhibition ไปเทียบในสมการเส้นตรงเพื่อหาค่า IC_{50} ต่อไป โดยค่า IC_{50} คือ ค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถทำให้ความเข้มข้นของ DPPH ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์

7. นำค่าที่ได้จากการคำนวณจากสมการเส้นตรงเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระระหว่างสารสกัดข้าวหมากแต่ละชุดการทดลองกับสารละลายวิตามินซี

การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม โดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu colorimetric (ดัดแปลงจาก กรวินท์ วิชญ์บุญพิสุทธินันท์, 2556)

1. นำสาร น้ำข้าวหมาก น้ำข้าวหมากเข้มข้นและสารสกัดเนื้อข้าวหมาก ปริมาตร 400 ไมโครลิตร และสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 800 ไมโครลิตร ผสมและเขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 5 นาที

2. เติมสารละลาย sodium carbonate เข้มข้น 10% ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 4 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 90 นาที จนปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์

3. แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 nm ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครไตเตอร์เพลท (microtiter plate reader) ทำการทดลอง 3 ครั้ง

4. ทำการทดลองซ้ำเหมือนกัน ตั้งแต่ข้อ (1) ถึง (3) แต่เปลี่ยนจากสารสกัดเป็นสารละลาย Gallic acid

5. นำค่าดูดกลืนแสงของสารสกัดไปแทนค่าในสมาการเส้นตรงของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก (ภาคผนวก ก.4) และคำนวณหาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดจากสมาการ (ภาคผนวก จ)

สมการคำนวณหาปริมาณสารฟีนอลิก

$$C = c * V/m$$

โดย C = ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัด (mg/g ของสารสกัด)

c = ความเข้มข้นของ gallic acid ที่ได้จากกราฟของสารสกัด (mg/ml)

V = ปริมาตรของสารสกัดที่ใช้ (ml)

m = น้ำหนักแห้งของสารสกัด (g)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลแต่ละค่าของการทดสอบ โดยทำการทดลอง 3 ครั้ง และวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design : CRD) และนำมาผลที่ได้มาวิเคราะห์ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (+SD) และนำข้อมูลที่ได้นำมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance: ANOVA) ถ้าพบนัยสำคัญทางสถิติจะทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของข้อมูลโดยหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์แบบเพียร์สัน (Pearson Correlation Coefficient) (ภาคผนวก ญ)