หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

ตารางที่ 2.1 แสดงชื่อเครื่องมือ รุ่น และบริษัทผู้ผลิต

เครื่องมือ	รุ่น	บริษัทผู้ผลิต
1. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath Shaker)	WRT	New Brunswick Scientific Co.,Inc.,USA
2. เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary Evaporator)	RE 52	Yamato. , Japan
3.เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (Gas Chromatography)	GC - 15A	Shimadzu. , Japan
4. ตู้อบสูญญากาศ (Vacuum Drying Oven)	DP - 41	Yamato. , Japan
5. ตู้อบฆ่าเชื้อแบบแห้ง (Hot Air Oven)	Contherm Series Five	Contherm Scientific Ltd. , New Zealand
6. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)	UL 92 AK	Sanyo. , Japan
7. ตู้อบแห้ง (Oven)	UL - 80	Memmert , Geramany
8. เครื่องบด (Blender)พร้อมตะแกรงร่อนขนาด 1 มิลลิเมตร	DCFH - 48	Culatti , Geramany
9. หม้ออบความดัน (Autoclave)	KT - 30SD	Omron Tateisi Electric Co., Japan
10. กล้องจุลทรรศน์	Alphaphot - YS2	Nikon , Japan
11. กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด	JFM - 6400	Jeol , Japan

2.2 สารเคมี

ตารางที่ 2.2 แสดงรายชื่อสารเคมี และ บริษัทผู้ผลิต

ชื่อสารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	
1. โซเดียมไนเตรต (Sodium nitrate)	Commercial grade	MERCK , Germany
2. โปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Potassium hydrogen phosphate)	Commercial grade	MERCK , Germany
3. โปแตสเซียมคลอไรด์ (Potassium chloride)	Commercial grade	MERCK , Germany
4. แมกเนเซียมซัลเฟต (Magnesium sulphate)	Commercial grade	CARLO ERBA , Italy
5. เฟอร์รัสซัลเฟต (Ferrous sulphate)	Commercial grade	CARLO ERBA , Italy
6. นอร์มอลออกตาโคเซน (n - Ocatacosane)	Analytical grade	SIGMA , USA
7. เอทานอล 95% (Ethanol)	Commercial grade	กรมสรรพสามิต , ประเทศไทย
8. เฮกเซน (n - Hexane)	Commercial grade	บริษัทรวมเคมี , ประเทศไทย
9. คลอโรฟอร์ม (Chloroform)	Commercial grade	บริษัทรวมเคมี , ประเทศไทย
10. สารสกัดจากมอลล์	NESTLE	ประเทศไทย
11. เคลแนค (Kelnac)	Sankyo. Co. ltd ,	Japan

2.3 วิธีการทดลอง

2.3.1 การแยกเชื้อราสาเหตุของโรคใบจุดเปล้าน้อย

2.3.1.1 การแยกเชื้อราสาเหตุโรค (isolation)

นำใบเปล้าน้อยที่เป็นโรคใบจุด มาทำการแยกเชื้อสาเหตุให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี tissue transplanting method (ไพโรจน์ จ่วงพานิช , 2525) โดยตัดชิ้นส่วนของใบเปล้าน้อยที่เกิดโรคใบจุดบริเวณขอบแผลให้เป็นชิ้นขนาด 0.5 x 0.5 มิลลิเมตร ฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย clorox 10 % นาน 3 - 4 นาที นำชิ้นส่วนที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วไปเลี้ยงบนอาหาร water agar (WA) บ่มในตู้บ่มเชื้อ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในสภาพให้แสงฟลูออเรสเซนต์ 12 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 1 - 2 วัน จะเห็นเส้นใยเจริญออกมาจากชิ้นส่วนพืช ตัดส่วนปลายของเส้นใยโดยใช้คอร์กบอร์เรอร์ (cork borer) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร นำไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) ในสภาวะเดียวกับข้างต้น ประมาณ 2 - 3 วัน เมื่อเชื้อราเจริญดีแล้ว จึงย้ายเส้นใยลงเลี้ยงในหลอดทดลองที่มีอาหาร potato carrot agar (PCA) เพื่อเก็บไว้ใช้ในการศึกษาต่อไป

2.3.1.2 การปลูกเชื้อบนใบเปล้าน้อย (inoculation) เพื่อทำให้เกิดโรค

ปลูกเชื้อบนใบเปล้าน้อย เพื่อทำให้ใบเปล้าน้อยเกิดโรคและเพื่อพิสูจน์การเกิดโรคตามวิธีของ Koch ' s postulation ซึ่งเป็นวิธีมาตราฐานที่ยอมรับทางโรคพืช (Robert and Boothroyd , 1972 ; Agrios , 1997) โดยนำเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้จากข้อ 2.3.1.1 มาเลี้ยงบนอาหาร PCA เป็นเวลา 5 - 7 วัน ใช้คอร์กบอร์เรอร์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ตัดเส้นใยบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อรา และนำมาเลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้แสงฟลูออเรสเซนต์เป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อวัน นาน 7 - 10 วัน นำสปอร์ที่เชื้อสร้างขึ้น เตรียมให้อยู่ในรูปสปอร์แขวนลอย มีความเข้มข้น 1 x 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ทำการปลูกเชื้อด้วยวิธีฉีดพ่นสปอร์แขวนลอยลงบนใบอ่อนของต้นเปล้าน้อยที่ได้กำจัดขนที่ผิวใบแล้ว จำนวน 5 ต้น ต้นละ 20 มิลลิลิตร และ ฉีดพ่นน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วกับต้นเปล้าน้อยจำนวน 5 ต้น ซึ่งเป็นชุดควบคุม (control) นำใบเปล้าน้อยที่ปลูกเชื้อแล้ว คลุมด้วยถุงพลาสติกเพื่อให้มีความชื้นสูงตลอดระยะเวลานาน 7 วัน ตรวจผลหลังจากการปลูกเชื้อทุกวัน สังเกตอาการของโรคที่เกิดขึ้นแล้วนำมาแยกเชื้อ

และปลูกเชื้อซ้ำอีกครั้ง (re - isolation and re - inoculation) เพื่อทำการยืนยันว่าเชื้อที่แยกได้นั้นเป็นเชื้อสาเหตุของโรคตามวิธีข้อ 2.3.1.1 และเตรียมให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์สำหรับใช้ทำการทดลองต่อไป

2.3.2. ชนิดของอาหารและสภาพของแสงที่เหมาะสมในการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *G. cingulata*

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อรา 4 ชนิด คือ PDA , PCA , Malt extract agar และ Czapek 's agar (ภาคผนวก ก.) โดยดูดอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยปิเปต (pipet) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 16 x 180 มิลลิเมตร อุดปากหลอดด้วยสำลีและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นจึงเอียงหลอดที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยมุมที่เท่ากัน เพื่อทำการควบคุมพื้นที่ของผิวหน้าอาหารวุ้นเอียงให้มีพื้นที่ผิวหน้าของอาหารเท่า ๆ กัน ทิ้งให้เย็นก่อนนำไปทำการปลูกเชื้อ

การปลูกเชื้อบนหลอดอาหารวุ้นเอียงนั้น โดยการเตรียมสปอร์ให้อยู่ในรูปสปอร์แขวนลอยที่มีความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เมื่อจะทำการปลูกเชื้อ ใช้ไมโครปิเปต (micropipette) ดูดสปอร์แขวนลอย ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ปล่อยลงบนอาหารวุ้นเอียง ใช้เข็มห่วง (loop) ลากสปอร์ให้กระจายทั่วผิวหน้าอาหาร ซึ่งวิธีการดังกล่าวดัดแปลงมาจากวิธีการของ ประยูรศรี วงศ์เจริญสถิตย์ (2537) หลังจากนั้นนำหลอดที่ปลูกเชื้อแล้วไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 วัน ซึ่งเป็นระยะที่มีรายงานว่าเชื้อรามีการสร้างสปอร์มากที่สุด (Ogle , Irwin and Cameron , 1986) โดยแบ่งหลอดวุ้นเอียงเป็น 2 ชุด คือ ชุดที่ 1 เลี้ยงในที่มืดตลอดการทดลอง และ ชุดที่ 2 เลี้ยงในสภาพที่ให้แสง 12 ชั่วโมงต่อวัน

การเก็บสปอร์ ทำโดยปิเปตน้ำที่นึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่มีเชื้อราซึ่งบ่มเชื้อจนครบ 8 วัน ใช้เข็มห่วงขูดเชื้อราให้หลุดออกจากผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อเขย่าอย่างแรง แล้วใช้ผ้าก๊อซกรองเอาเส้นใยออกจะได้สปอร์แขวนลอย ล้างสปอร์ที่ติดอยู่ในหลอดทดลองและบนผ้ากรองด้วยน้ำที่นึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง วัดปริมาตรสปอร์แขวนลอยที่ได้ทั้งหมด และหาความเข้มข้นของสปอร์แขวนลอย (สปอร์ต่อมิลลิลิตร) แล้วคำนวณหาจำนวนสปอร์ ต่อ หลอดวุ้นอาหารเอียง นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ทางสถิติโดยวางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียล (Factorial Experiments) เพื่อทำการเปรียบเทียบ 2 ปัจจัย คือ ปัจจัยที่ 1 ปัจจัย

ด้านแสง ซึ่งมี 2 ระดับ คือ งดให้แสงตลอดการทดลอง (control) และ ให้แสง 12 ชั่วโมง ต่อ วัน ปัจจัยที่ 2 ปัจจัยด้านอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมี 4 ชนิด คือ PDA , PCA , Malt extract agar และ Czapek 's agar มีจำนวนซ้ำของหน่วยทดลอง (replication) เท่ากับ 12 ซ้ำ

2.3.3 ระดับความเข้มข้นของสปอร์แขวนลอยที่มีผลต่อการเกิดโรคใบจุด

2.3.3.1 การเตรียมสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *G. cingulata*

นำเชื้อรา *G. cingulata* บริสุทธิ์ ที่แยกได้จากข้อ 2.3.1 มาเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมตามวิธีการทดลองข้อ 2.3.2 โดยนำเชื้อรามาเลี้ยงบนอาหาร Czapek ' s agar ในสภาพที่ให้แสงฟลูออเรสเซนต์ 12 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 8 วัน ซึ่งเป็นระยะที่มีรายงานว่าสปอร์ของเชื้อราสามารถทำให้เกิดโรคภายหลังการปลูกเชื้อมากที่สุด (Ogle et al. , 1986) จากนั้นนำสปอร์ของเชื้อรามาเตรียมให้อยู่ในรูปสปอร์แขวนลอย โดยนำสปอร์ที่เลี้ยงมาผสมกับน้ำที่นึ่งฆ่าเชื้อ นับปริมาณสปอร์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemacytometer) ปรับความเข้มข้นของสปอร์แขวนลอยให้มีระดับความเข้มข้น 3 ระดับดังนี้ คือ 10^6 , 10^7 , 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร และน้ำที่นึ่งฆ่าเชื้อ (control) โดยแต่ละระดับความเข้มข้นมีปริมาตร 600 มิลลิลิตร เติมสารจับใบ 2 - 3 หยด แล้วนำไปฉีดพ่นบนใบเปล้าน้อยที่เตรียมไว้ในข้อ 2.3.3.2

2.3.3.2 การเตรียมต้นเปล้าน้อยที่เป็นโรคใบจุด

ใช้ต้นเปล้าน้อยที่ได้จากการขยายพันธุ์โดยการเสียบยอดเปล้าน้อยพันธุ์ IBGE2 กับต้นต่อเปล้าใหญ่ ซึ่งปลูกเตรียมไว้ในกระถางพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 16 นิ้ว ทำการตัดแต่งกิ่งเปล้าน้อยเพื่อให้เกิดการแตกใบอ่อนสำหรับใช้ในการปลูกเชื้อ และบำรุงรักษาโดยการใช้ปุ๋ยคอกและปุ๋ยวิทยาศาสตร์ ได้แก่ ปุ๋ยสูตรเสมอ (16-16-16) และ ปุ๋ยยูเรีย (46-0-0) เปล้าน้อยจะแตกใบอ่อนภายหลังจากการตัดแต่งกิ่งประมาณ 1 สัปดาห์ การปลูกเชื้อบนใบเปล้าน้อยจะเริ่มทำเมื่อใบอ่อนคู่ที่ 1 มีอายุ 2 สัปดาห์ ทั้งนี้เพื่อต้องการให้ใบอ่อนคู่อื่น ๆ มีการคลี่ใบเพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นการเพิ่มพื้นที่บนใบให้มีโอกาสสัมผัสกับสปอร์แขวนลอยมากขึ้น ทำการคลุมถุงพลาสติกก่อนการปลูกเชื้อ 2 - 3 ชั่วโมง จากนั้นนำสปอร์แขวนลอยที่เตรียมไว้ในข้อ 2.3.3.1 นำไปพ่นลงบนใบเปล้าน้อย โดยแต่ละความเข้มข้นของสปอร์แขวนลอย จะทำการพ่นต้นเปล้าน้อยจำนวน 9 ต้น ต้นละ 3 ยอด ใช้ปริมาตรของสปอร์แขวนลอยประมาณ 20 มิลลิลิตรต่อยอด

คลุมถุงพลาสติกเพื่อให้ความชื้นประมาณ 2 - 3 วัน ตรวจดูอาการของโรค และ คลุมถุงพลาสติกต่ออีกจนครบ 1 สัปดาห์ จึงนำถุงพลาสติกออก เมื่อใบอ่อนคู่ที่ 1 มีอายุ 5 สัปดาห์ จึงนำใบจากแต่ละยอดที่ปลูกเชื้อไว้ มาวัดเปอร์เซ็นต์พื้นที่ใบที่เกิดอาการโรคใบจุดทั้งหมดแล้วหาค่าเฉลี่ยซึ่งค่าที่ได้จะได้เป็นเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคใบจุดเฉลี่ยของยอดนั้น ๆ วิธีการวัดดังกล่าวนี้ดัดแปลงมาจากวิธีการประเมินของ James (1971) ที่ได้ประเมินระดับความรุนแรงของการเกิดโรคใบจุดของต้นอัลฟัลฟา (alfalfa) การวัดเปอร์เซ็นต์พื้นที่ใบเป็นโรคใบจุดนั้น จะทำโดยการนำใบเปล้าน้อยที่มีอาการของโรคเปรียบเทียบกับแผนภาพที่แสดงการเกิดโรคใบจุดของต้นอัลฟัลฟา ซึ่งมีการระบุเปอร์เซ็นต์พื้นที่ใบเป็นโรคไว้ (ภาคผนวก ข.) นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้แผนการทดลองแบบ Completely Randomize Designed (CRD) และพิจารณาความแตกต่างของเปอร์เซ็นต์พื้นที่โรคใบจุด ภายหลังการปลูกเชื้อด้วยสปอร์แขวนลอยที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน 4 ระดับ

2.3.4 การเข้าทำลายใบเปล้าน้อยของเชื้อรา *G. cingulata*

ทำการตัดแต่งกิ่งเปล้าน้อยเพื่อให้เกิดการแตกยอด โดยเมื่อใบเปล้าน้อยคู่ที่ 1 ซึ่งแตกขึ้นมาใหม่ มีอายุ 2 สัปดาห์ จึงนำมาทำการทดลอง ด้วยการแช่ใน clorox 10% นาน 2 - 3 นาที เพื่อฆ่าเชื้อที่ผิวใบ จากนั้นนำใบเปล้าน้อยที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาพันก้านใบด้วยสำลีชุบน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อ ทำการปลูกเชื้อรา *G. cingulata* บนใบเปล้าน้อยด้วยสปอร์แขวนลอยที่มีความเข้มข้น 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร และนำใบเปล้าน้อยวางบนจานเลี้ยงเชื้อที่อยู่ในกล่องพลาสติกมีฝาปิดและมีน้ำกลั่นฆ่าเชื้ออยู่ภายใน จำนวน 4 กล่อง นำแต่ละกล่องไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และ ให้แสง 12 ชั่วโมงต่อวัน โดยแต่ละกล่องมีระยะเวลาของการบ่มเชื้อแตกต่างกันดังนี้ คือ 12 , 24 , 48 , และ 60 ชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งวิธีการทดลองดังกล่าวดัดแปลงมาจากวิธีการของพีรนุช เสนีวงศ์ ณ. อยุธยา (2537) ที่ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับกลไกการเข้าทำลายใบถั่วเหลืองของเชื้อราสนิม เมื่อบ่มใบเปล้าน้อยจนครบระยะเวลาที่กำหนด จึงนำใบเปล้าน้อยที่แสดงอาการของโรคมาเตรียมตัวอย่างสำหรับนำไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope) ต่อไป

การเตรียมตัวอย่างใบเปล้าน้อยสำหรับตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนนั้น ได้ดัดแปลงวิธีการทดลองมาจาก พีรนุช เสนีวงศ์ ณ. อยุธยา (2537) โดยการตัดชิ้นส่วนของใบ

เปล้าน้อยบริเวณที่มีจุดให้มีขนาดพื้นที่ประมาณ 5 ตารางมิลลิเมตร แช่ชิ้นส่วนของใบใน 2.5% กลูตารอลดีไฮด์ (glutaraldehyde) ใน 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) pH 7.2 เป็นเวลา 1 วัน จึงล้างชิ้นพืชด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 3 ครั้ง ครั้งละ 10 - 15 นาที จากนั้นนำชิ้นพืชแช่ใน 1% ออสเมียมเตตระออกไซด์ (osmium tetraoxide) ใน 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.2 นาน 1 - 2 ชั่วโมง และล้างออกด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 3 ครั้ง ครั้งละ 10 - 15 นาที ทำการดึงน้ำออกจากชิ้นพืช (dehydrate) ด้วยการแช่ในเอธิลแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้น 30% , 50% , 70% , 90% และ 100% ความเข้มข้นละ 2 ครั้ง ตามลำดับ นาน 10 - 15 นาที ทำตัวอย่างชิ้นพืชให้แห้ง ณ. จุดวิกฤต (critical point dryer) แล้วนำไปติดบนฐาน (stub) ฉาบผิวหน้าด้วยโลหะผสมระหว่างทองคำ และ พาลลาเดียม (Au - Pd) จากนั้นจึงนำตัวอย่างที่เตรียมเรียบร้อยแล้ว ตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด ณ. ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.3.5 ความสัมพันธ์ของระดับความรุนแรงของโรคใบจุดกับปริมาณสารเปลาโนทอลที่สกัดจากใบเปล้าน้อย

ในการทดลองขั้นตอนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อต้องการทราบปริมาณสารเปลาโนทอลที่มีอยู่ในใบเปล้าน้อยที่เป็นโรคใบจุด เปรียบเทียบกับใบเปล้าน้อยปกติ โดยใบเปล้าน้อยที่เกิดโรคใบจุดนั้น ได้มาจากการปลูกเชื้อด้วยสปอร์แขวนลอย ที่ระดับความเข้มข้น 10^8 สปอร์ ต่อ มิลลิลิตร ตามวิธีการทดลองข้อ 2.3.3 และเมื่อใบคู่ที่ 1 มีอายุ 5 สัปดาห์ จึงทำการเก็บใบเปล้าน้อยและนำไปสกัดสารเปลาโนทอลเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณต่อไป

2.3.5.1 การสกัดสารเปลาโนทอลจากใบเปล้าน้อย

นำใบเปล้าน้อยที่แสดงอาการของโรคใบจุดมาประเมินระดับความรุนแรงของโรคในแต่ละยอดตามวิธีการทดลองข้อ2.3.3.2 ทำความสะอาดใบเพื่อนำมาสกัดสารเปลาโนทอลตามวิธีของ นลิน นิลอุบล และ คณะ (2537) โดยนำใบเปล้าน้อยไปอบแห้งด้วยตู้อบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 6 - 8 ชั่วโมง จากนั้นบดด้วยเครื่องบดที่มีตะแกรงร่อนขนาด 1 มิลลิเมตร ชั่งน้ำหนักผงใบเปล้าน้อยบดแห้ง 0.3 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตร เติม 95% เอธิลแอลกอฮอล์ 6 มิลลิลิตร ปิดฝาขวดรูปชมพู่ด้วยกระดาษอลูมิเนียม นำไปอุ่นในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (water bath shaker) ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เวลา 90 นาที

จากนั้นกรองผงใบเปล้าน้อยบดด้วยกระดาษกรองเบอร์1 จะได้สารสกัดจากผงใบเปล้าน้อย ทำการปรับปริมาตรของสารสกัดโดยการเติม 95% เอธิลแอลกอฮอล์ในสารสกัดจนมีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 10 มิลลิลิตร

2.3.5.2 การเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์สารเปลาโนทอล

เตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ปริมาณสารเปลาโนทอลตามวิธีของ นลิน นิลอุบล และ คณะ (2537) โดยการใช้ปิเปตดูดสารสกัดที่ปรับปริมาตรแล้ว 2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองซึ่งทราบน้ำหนักที่แน่นอน นำไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสูญญากาศแบบหมุน (rotary evaporator) แล้วนำไปอบแห้งในตู้อบสูญญากาศ (vacuum drying oven) ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 30 นาที ชั่งน้ำหนักเพื่อหาน้ำหนักแห้งของสารสกัดภายในหลอดทดลอง จากนั้นเติม 2 มิลลิลิตรของ 50% สารละลายเอธิลแอลกอฮอล์ และ 0.4 มิลลิลิตรของ 10% โซเดียมไฮดรอกไซด์ แล้วนำไปอุ่นในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (water bath shaker) ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อเปลี่ยนเอสเทอร์ของเปลาโนทอล(ester of plaunotol) ให้เป็นเปลาโนทอลอิสระ (free plaunotol) นำสารละลายที่ได้มาสกัดด้วยสารนอร์มอลเฮกเซน (n-hexane) 3 ครั้ง ครั้งละ 3 มิลลิลิตร รวมสารสกัดชั้นเฮกเซนไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสูญญากาศแบบหมุน (rotary evaporator) เติม 0.25 มิลลิลิตร ของสารละลายนอร์มอลออกตาโคเซน (n-octacosane) ที่มีความเข้มข้น 2 มิลลิกรัม ต่อ มิลลิลิตร ในคลอโรฟอร์ม ซึ่งเป็นสารละลายมาตราฐานเปรียบเทียบภายใน (internal standard) จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณสารเปลาโนทอล

2.3.5.3 การวิเคราะห์หาปริมาณสารเปลาโนทอล

การวิเคราะห์หาปริมาณสารเปลาโนทอลในสารสกัดชั้นเฮกเซนด้วยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟี (gas chromatography, G.C) ตามวิธีของ นลิน นิลอุบล และคณะ (2537) โดยใช้คอลัมน์แก้วขนาด 3 มิลลิเมตร ยาว 1 เมตร สำหรับบรรจุ 2% ซิลิโคน OV - 17 (Silicone OV - 17) บน uniport 60 / 80 mesh เป็นตัวดูดซับ ใช้ก๊าซไนโตรเจนเป็นตัวพา (carrier gas) อุณหภูมิสำหรับการฉีดตัวอย่าง (injection temperature) เท่ากับ 250 องศาเซลเซียส อุณหภูมิคอลัมน์ (column temperature) เท่ากับ 200 องศาเซลเซียส และ อุณหภูมิดีเทคเตอร์ (detector temperature) เท่ากับ 200 องศาเซลเซียส ติดตามสารที่ผ่านคอลัมน์ด้วยเครื่อง

ตรวจวัดชนิดเฟลมไอออไนเซชัน (flame ionization detector , FID.) โดยใช้ความดันไฮโดรเจนต่ออากาศสำหรับการจุดเปลวไฟเท่ากับ 1 : 2

จากสภาวะดังกล่าว สารละลายเปลาโนทอลมาตรฐาน มีรีเทนชันไทม์ (retention time) ประมาณ 7 นาที และ สารละลายมาตราฐานเปรียบเทียบภายใน มีรีเทนชันไทม์ประมาณ 11.4 นาที (รูปที่ ค-2 ภาคผนวก ค) ในการคำนวณหาปริมาณสารละลายเปลาโนทอลในตัวอย่าง โดยการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายเปลาโนทอลมาตรฐาน ซึ่งกราฟที่ใช้นั้น เป็นกราฟระหว่างน้ำหนักเปลาโนทอลเป็นมิลลิกรัมต่อหลอดทดลอง กับอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคของสารละลายเปลาโนทอลต่อสารละลายมาตราฐานเปรียบเทียบภายใน (รูปที่ค-1 ภาคผนวก ค)