

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ขั้นตอนที่ 1 ศึกษาวัตถุดิบที่เหมาะสมในการนำมาประกอบการผลิตข้าวเสริมสารต้านอนุมูลอิสระ

การศึกษาวัตถุดิบที่เหมาะสมในการนำมาประกอบการผลิตข้าวเสริมสารต้านอนุมูลอิสระจำแนกเป็น 2 ตอนย่อย ประกอบด้วย

ขั้นตอนที่ 1.1 ขั้นศึกษาบริบทของพืชผักพื้นบ้านจังหวัดกำแพงเพชรและพันธุ์ข้าวเจ้า และพันธุ์ข้าวเหนียวที่นิยมปลูกในเขตพื้นที่ จังหวัดกำแพงเพชร

ศึกษาบริบทของพืชผักพื้นบ้านจังหวัดกำแพงเพชรและพันธุ์ข้าวเจ้า และพันธุ์ข้าวเหนียวที่นิยมปลูกในเขตพื้นที่ จังหวัดกำแพงเพชรเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระโดยศึกษาจากเอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง จากสารสนเทศ ศึกษาการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากเอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง และเลือกชนิดของพืชผักพื้นบ้านจำนวน 10 ชนิด และข้าวเจ้า 2 ชนิด ข้าวเหนียว 2 ชนิดเพื่อนำไปศึกษาประสิทธิภาพการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระ โดยการเลือกแบบเจาะจงเฉพาะพืชผักที่พบได้ในจังหวัดกำแพงเพชร

ขั้นตอนที่ 1.2 ขั้นศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของวัตถุดิบ

ศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระจากพืชผักพื้นบ้านจังหวัดกำแพงเพชร จำนวน 10 ชนิด ได้แก่ ยอดอ้อย ผักก้านตง ยอดขมิ้น ผักหนาม ผักปลัง ผักกูด ยอดผักข้าว ผักอีชีก ผักอีหนู และผักพาย ข้าวเจ้า 2 ชนิด ได้แก่ ข้าวเจ้าเสาไห้ และข้าวเจ้าขาวตาแห้ง ข้าวเหนียว 2 ชนิด ได้แก่ ข้าวเหนียวกข 6 และข้าวเหนียวดอก
ดำเนินการได้ดังต่อไปนี้

1. อุปกรณ์ สารเคมี เครื่องมือ

1.1 อุปกรณ์ / เครื่องมือ

- 1) ควอร์ตเซลล์ (quart cell)
- 2) ปิเปต (measuring pipette)
- 3) หลอดทดลอง (test tube)
- 4) เครื่องกรองดูด (buchner funnel)
- 5) กรวยกรอง (funnel)
- 6) ขวดน้ำกลั่น (polyethylene wash bottle)
- 7) ช้อนตักสาร (spatular)

- 8) แท่งแก้ว (stirring rod)
- 9) หลอดหยด (dropper)
- 10) ขวดวัดปริมาตร (volumetric flasks)
- 11) ขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flasks)
- 12) ครกบด (mortar)
- 13) บีกเกอร์ (beaker)
- 14) วงแหวน (metal ring)
- 15) กระดาษกรอง (filter papers)
- 16) ขาค้าง (stand)
- 17) ขวดโพลีเอทิลีน (polyethylene bottle)
- 18) โถดูดความชื้น (desicator)
- 19) UV-Visible Spectrophotometer
- 20) เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง
- 21) ตู้อบ (oven)
- 22) เครื่องให้ความร้อน (hot plate)

1.2 สารเคมี

- 1) 3-tert-Butyl-4-hydroxyanisole (BHA : $C_{11}H_{16}O_2$)
- 2) 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH : $C_{18}H_{12}N_5O_6$)
- 3) น้ำกลั่น

2. การเตรียมสารสกัด

2.1. การเตรียมพืชตัวอย่าง

เตรียมพืชตัวอย่าง โดยยอดอ้อย ผักก้านตง ยอดขหนู ผักหนาม ผักปลัง ผักกูด ยอดผักข้าว ผักอีชีก ผักอินูน เก็บเฉพาะส่วนยอด โดยยอดอ้อยนำมาปอกให้ถึงส่วนในที่อ่อนนำไปรับประทานได้ ผักพายเก็บเฉพาะก้านดอก นำมาล้างทำความสะอาด ลดขนาด แล้วนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 7 ชั่วโมง ตามวิธีการของ Bocco et al. (1998 อ้างถึงในสุภาพร และคณะ, 2552) นำมาบดให้ละเอียดเป็นผงแล้วบรรจุในถุงพลาสติกและแช่เย็นไว้ที่อุณหภูมิ 5 ± 2 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป ส่วนข้าวเจ้า 2 ชนิดได้แก่ ข้าวเจ้าเสาไห้ และข้าวเจ้าขาวตาแห้ง ข้าวเหนียว 2 ชนิด ได้แก่ ข้าวเหนียวกข 6 และข้าวเหนียวคอ ก็นำมาล้างทำความสะอาดและเตรียมเช่นเดียวกับการเตรียมพืชตัวอย่าง

2.2 วิธีการสกัด

- 1) ชั่งตัวอย่างพืชที่ผ่านการบดละเอียด จำนวน 3 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 5 กรัม ใส่ในบีกเกอร์
- 2) จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 75 มิลลิลิตร ในแต่ละบีกเกอร์ คนให้เข้ากันแล้วปิดด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- 4) เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนดไว้ก็นำไปกรองผ่านกระดาษกรองขนาดเบอร์ 1
- 5) นำส่วนที่ใสมาทำให้แห้งโดยใช้เครื่องระเหยแห้งสุญญากาศแบบหมุน (rotary evaporator)
- 6) แล้วเก็บใส่ภาชนะที่แห้งปิดสนิทและป้องกันแสงได้ แล้วเก็บในตู้เย็น (4°C) สำหรับทำการทดลองต่อไป

3. การตรวจหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างสารสกัด

3.1 หลักการ

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) เป็นสารอนุมูลอิสระที่เสถียรและมีสี ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm สารใดก็ตามที่มีความสามารถในการจับกับอนุมูลอิสระ DPPH นี้ได้จะส่งผลให้สีของ DPPH ที่แสดงออกมามีค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ก็ลดลงด้วย (Ohtake, Tagashira, 1998) ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ หากสารสกัดพืชตัวอย่างสามารถกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ได้ ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ก็จะลดลงจากปกติ

3.2 วิธีการทดลอง

- 1) เตรียมสารละลาย DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) ให้มีความเข้มข้น 0.2 mM ในเอทานอล
- 2) นำสารละลาย DPPH ไป scan หาค่าความยาวคลื่นสูงสุด (λ_{max}) scan ที่ความยาวคลื่น 400-800 nm
- 3) เตรียมสารตัวอย่างความเข้มข้น 1 % ในน้ำ นำตัวอย่างสารสกัดมา 1 ml ผสมกับสารละลาย DPPH 2 ml ในหลอดทดลอง ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดประมาณ 30 นาที
- 4) เตรียมสารละลายควบคุม (control) โดยใช้ น้ำ ผสมกับสารละลาย DPPH 2 ml ในหลอดทดลอง ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดประมาณ 30 นาที
- 5) วัดค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างและสารละลายควบคุมที่ความยาวคลื่นสูงสุด ที่ scan ได้จาก ข้อ 2)
- 6) คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของ radical scavenging activity ดังสมการ

$$\% \text{ radical scavenging} = \frac{(\text{Absorbance Control} - \text{Absorbance Sample}) \times 100}{\text{Absorbance Control}}$$

หมายเหตุ 1. สารละลาย DPPH ต้องเตรียมใหม่ทุกวันและเก็บในที่มืดอุณหภูมิ

4 องศาเซลเซียส โดยหุ้มด้วยอลูมิเนียมฟอยล์

2. ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเทียบกับสารมาตรฐาน BHA โดยเตรียมสารละลายมาตรฐาน BHA เข้มข้น 1% ในน้ำ แล้วนำสารละลายมาตรฐาน BHA มา 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย DPPH 2 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างและสารละลายควบคุมที่ความยาวคลื่นสูงสุด ที่ scan ได้ คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของ radical scavenging activity

ขั้นตอนที่ 2 ผลิตข้าวเสริมสารต้านอนุมูลอิสระจากจากพืชผักพื้นบ้านในจังหวัดกำแพงเพชร

คัดพืชที่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงสุด 3 อันดับแรก ได้แก่ ยอดขจร ผักคันทรง ยอดอ้อย นำไปทดลองร่วมกับข้าวเจ้าเสาไห้ ข้าวเจ้าขาวตาแห้ง ข้าวเหนียวกข 6 และข้าวเหนียวดอ เพื่อผลิตข้าวเสริมสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการต่างจำนวน 3 วิธี ดังนี้

1. การเตรียมข้าวเสริมสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธีการเคลือบ

เตรียมน้ำคั้นผัก โดยนำพืชผักพื้นบ้านจำนวน 3 ชนิดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดสามอันดับแรก ได้แก่ ยอดขจร ผักคันทรง ยอดอ้อย โดยยอดอ้อยนำมาปอกให้ถึงส่วนในที่อ่อนที่นำไปรับประทานได้ นำผักมาล้างทำความสะอาด ตากให้น้ำแห้งแล้วนำมาอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง หั่นขนาดประมาณ 0.5 x 0.5 มิลลิเมตร ชั่งน้ำหนัก 10 กรัม แล้วนำมาปั่นให้ละเอียดนาน 5 นาที ส่วนน้ำผักผสมให้ชั่งน้ำหนักพืชที่หั่นเป็นชิ้นแล้ว อัตราส่วน 1:1 น้ำหนักรวม 10 กรัม นำมาปั่นให้ละเอียดนาน 5 นาที เช่นเดียวกัน คั้นให้ได้น้ำผักจนไม่มีน้ำผักเหลืออยู่ที่กาก ดังนั้นในขั้นตอนนี้จะได้น้ำคั้นผักเดี่ยว 3 ชนิด คือ ยอดขจร ผักคันทรง ยอดอ้อย และน้ำคั้นผักผสม 4 ชนิดคือ ยอดอ้อย+ผักคันทรง ยอดอ้อย+ยอดขจร ผักคันทรง+ยอดขจร และยอดอ้อย+ผักคันทรง+ยอดขจร

หลังจากนั้นนำข้าวเจ้าเสาไห้ น้ำคั้นผักบดแต่ละชนิดและกรดปาล์มติกมาผสมกันโดยใช้อัตราส่วน ข้าว 10 กรัม:พืชผักแต่ละชนิดใช้น้ำพืชที่คั้นได้ทั้งหมด:กรดปาล์มติก 4 กรัม เทส่วนผสมทั้งหมดลงในเครื่องผสมความเร็วปานกลาง ผสมนาน 2 นาที เมื่อส่วนผสมเข้ากันดีแล้ว นำมาเป่าด้วยลมร้อนอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที แล้วนำไปอบในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น เก็บตัวอย่างข้าวเสริมใส่ถุงซิปล็อคเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง คัดแปลงจากวิธีการของ Further & Lauter (1949, p. 133)

ทำการทดลองเคลือบข้าวเจ้าขาวตาแห้ง ข้าวเหนียวกข 6 และข้าวเหนียวดอ เช่นเดียวกับข้าวเจ้าเสาไห้

2. การเตรียมข้าวเสริมสารต้านอนุมูลอิสระโดยแช่น้ำพืชผัก

เตรียมน้ำพืชผัก โดยนำพืชผักพื้นบ้านที่ผ่านการเตรียมและหั่นเช่นเดียวกับน้ำคั้นผักมาชั่งน้ำหนัก 10 กรัม ใส่ในเครื่องปั่น เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร แล้วนำมาปั่นให้ละเอียดนาน 5 นาที ส่วนน้ำผักผสมให้ชั่ง

น้ำหนักพืชที่หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ อัตราส่วน 1:1 น้ำหนักรวม 10 กรัม คั้นน้ำออกด้วยผ้าขาวบางเพื่อแยกกากออก คั้นจนไม่มีน้ำผักเหลืออยู่ที่กาก นำน้ำที่คั้นได้ใส่ในภาชนะที่สะอาด และหุ้มด้วยอะลูมิเนียมฟอยด์ เก็บในตู้เย็นเพื่อใช้ในการเตรียมข้าวแช่น้ำพืชผัก ดังนั้นในขั้นตอนนี้จะได้น้ำพืชผักเดี่ยว 3 ชนิด และน้ำพืชผักผสม 4 ชนิด หลังจากนั้นนำข้าวเจ้าเสาให้ 10 กรัม ใส่ น้ำพืชผักที่ได้ คนให้ทั่ว ปิดหุ้มด้วยอะลูมิเนียมฟอยด์ แช่ไว้ในอุณหภูมิห้อง (30 ± 5 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 5 ชั่วโมง แล้วเทน้ำทิ้ง ทิ้งไว้ 5 นาที แล้วนำไปอบให้แห้งด้วยตู้อบลมร้อนแบบถาดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง เพื่อให้ข้าวแช่น้ำผักแห้งมีความชื้นไม่เกิน 13% เก็บไว้ในถุงซิปล็อกที่อุณหภูมิห้อง

ทำการทดลองเคลือบข้าวเจ้าขาวตาแห้ง ข้าวเหนียวกข 6 และข้าวเหนียวคอ เช่นเดียวกับข้าวเจ้าเสาให้

3. การเตรียมข้าวเสริมสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธีการหุง/นึ่งพร้อมข้าว

วิธีการพืชหุง/นึ่งพร้อมข้าว โดยนำพืชผักพื้นบ้านที่ผ่านการเตรียมและหั่นเช่นเดียวกับน้ำคั้นผักมา ชั่งน้ำหนัก 10 กรัม ส่วนพืชผสมใช้อัตราส่วนเดียวกันกับการผลิตข้าวเสริมสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธีข้าวเคลือบและข้าวแช่ หลังจากนั้นนำไปหุงพร้อมกับข้าว 10 กรัมด้วยหม้อหุงข้าวไฟฟ้า โดยควบคุมปริมาณน้ำที่ใช้ในการหุง และจำนวนการล้างข้าวให้เท่ากัน

ทำการทดลองหุงพร้อมข้าวเจ้าขาวตาแห้ง ข้าวเหนียวกข 6 และข้าวเหนียวคอ เช่นเดียวกับข้าวเจ้าเสาให้

4. ศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของข้าวเสริมสารต้านอนุมูลอิสระ

นำตัวอย่างข้าวเสริมสารต้านอนุมูลอิสระจากทั้ง 3 วิธี ไปสกัดตามวิธีการในข้อ 1.2 ของขั้นตอนที่ 1 และตรวจหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างสารสกัด โดยวิธี DPPH assay แล้วนำข้าวเสริมสารต้านอนุมูลอิสระทั้งหมดไปหุง ด้วยหม้อไฟฟ้า โดยควบคุมปริมาณข้าว และน้ำที่ใช้หุงน้ำให้เท่ากันและศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของข้าวเสริมสารต้านอนุมูลอิสระแต่ละชนิด

5. ศึกษาคุณสมบัติทางด้านเคมีและกายภาพข้าวเสริมสารต้านอนุมูลอิสระ

5.1 ค่าสี นำตัวอย่างข้าวเสริมสารต้านอนุมูลอิสระจากทั้ง 3 วิธี ไปวัดวิเคราะห์ค่าสี L^* , a^* และ b^* โดยด้วยเครื่องวัดสี Hunter Lab รุ่น Color flex

5.2 ปริมาณความชื้น (AOAC, 2000) นำตัวอย่างข้าวเสริมสารต้านอนุมูลอิสระจากทั้ง 3 วิธี ไปวัดวิเคราะห์ปริมาณความชื้น ดังนี้

1) อบถั่วอะลูมิเนียมในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ทำให้เย็นใน desiccator นำมาชั่งน้ำหนักที่แน่นอน

2) ชั่งตัวอย่างข้าวเสริมสารต้านอนุมูลอิสระ 3 กรัม ใส่ลงในถั่วอะลูมิเนียมที่อบแห้ง และบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน

3) นำถั่วอะลูมิเนียมที่บรรจุตัวอย่างข้าวอบที่อุณหภูมิ 105 ถึง 107 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 30 นาที นำเอามาใส่ใน desiccator ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

4) นำไปชั่งน้ำหนักอบซ้ำครั้งละ 30 นาที จนได้น้ำหนักคงที่ซึ่งค่าที่ได้จะแตกต่างกันไม่เกิน 2 มิลลิกรัม จดน้ำหนักที่น้อยที่สุดของถ้วยอลูมิเนียมและน้ำหนักตัวอย่างหลังจากอบแห้งแล้ว การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความชื้นจากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความชื้น} = \frac{\text{น้ำหนักที่หายไป (กรัม)} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}}$$

6. ศึกษาการยอมรับทางประสาทสัมผัสของผู้บริโภคชาวเสริมสารต้านอนุมูลอิสระ

คัดเลือกข้าวเสริมสารต้านอนุมูลอิสระที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดของวิธีเคลือบ และวิธีแช่ จำนวนชนิดข้าวละ 1 ชนิด แต่หากชนิดพืชซ้ำกันจะเลือกพืชที่ให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีไปเพื่อจะได้ชิมข้าวที่หลากหลายสูตร ดังนั้นจะมีตัวอย่างข้าวเสริมสารต้านอนุมูลอิสระที่นำไปทดสอบจำนวน 8 ชนิด

กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา คือนักศึกษาสาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหารและสาขาวิชาเคมี จำนวน 20 คน

ศึกษาการยอมรับทางประสาทสัมผัสของผู้บริโภคโดยการให้คะแนนความชอบ (hedonic scaling test) โดยทำการเสิร์ฟตัวอย่างผลิตภัณฑ์ ภายในระยะเวลา 10 นาที หลังการหุงเสร็จสิ้นแก่ผู้ทดสอบชิม ให้แบบฟอร์มการให้คะแนนแบบสเกลความชอบ 9 คะแนน (Nine-point hedonic scale) แก่ผู้ทดสอบชิมจำนวน 20 คน เพื่อทดสอบการยอมรับ มีค่าน้ำหนักตามเกณฑ์ต่อไปนี้

1=ไม่ชอบมากที่สุด

2=ไม่ชอบมาก

3=ไม่ชอบปานกลาง

4=ไม่ชอบเล็กน้อย

5=เฉยๆ

6=ชอบเล็กน้อย

7=ชอบปานกลาง

8=ชอบมาก

9=ชอบมากที่สุด

วิเคราะห์ผล โดยนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ค่าทางสถิติ ค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป