บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์

1. เครื่องอัลตร้าไวโอเลต-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (UV-Vis Spectrophotometer) Thermo Scientific, GENESYS 10S UV-Vis, United States of America

2. เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 4 ตำแหน่ง (4 Digit analytical balance) Sartorius, BP210S, Germany

3. เครื่องอ่านค่าไมโครเพลท (Microplate Reader) M965+, Metertech, Taiwan

4. ไมโครปิเปตต์ (Micropipette) OHAUS CORPORATION, AH-200, United States of America

3.2 สารเคมี

1. กลูโคส (Glucose, $C_6H_{12}O_6$) AR Grade, Ajax Finechem, Australia

2. 3,5-ไดไนโตรซาลิไซลิก (3,5-Dinitrosalicylic acid, $C_7H_4N_2O_7$) AR Grade, Loba, India

3. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium Hydroxide, NaOH) AR Grade, Ajax Finechem, Australia

4. โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต (Sodium Potassium Tartrate, $KNaC_4H_4O_6$) AR Grade, Loba, India

5. บีเอชที (Butylated Hydroxytoluene, $C_{15}H_{24}O$) AR Grade, Panreac Quimica, Spain

6. เมทานอล (Methanol, CH_3OH) AR. Grade, RCI Labscan, Thailand

7. สารอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (1,1-Diphenyl-2-picrylhdrazyl, $C_{18}H_{12}N_5O_6$) AR. Grade, Alfa Asesar, Japan

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

8. โฟลิน-ซีโอแคลทู (Folin-Ciocalteu's reagent) AR Grade, Merck, Germany

9. โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium Carbonate, Na_2CO_3) Com Grade, Loba, India

10. กรดแกลลิก (Gallic acid, $C_7H_6O_5$) AR Grade, Sigma-Aldrich, United States of America

3.3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.3.1 การเตรียมตัวอย่างข้าว

1) นำข้าวเปลือกพันธุ์ลายปลาทอง จากชุมชนหมู่บ้านทุ่งตามั่น ตำบลแสลง อำเภอมะขาม จังหวัดจันทบุรี หนัก 2.0 kg มาแบ่งออกเป็นสองส่วน แต่ละส่วนหนัก 1 กิโลกรัม โดยนำข้าวเปลือกส่วนแรกไปขัดสีเป็นข้าวกล้อง และนำส่วนที่สองไปแปรรูปเป็นข้าวฮาง

2) ขั้นตอนการแปรรูปเป็นข้าวฮาง เริ่มจากนำข้าวเปลือกพันธุ์ลายปลาทองมาแช่ด้วยน้ำประปาเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปนึ่ง เมื่อครบเวลา 15 นาทีแล้วให้ทำการกลับด้านและนึ่งต่ออีกเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปอบลมร้อนให้แห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงสีเป็นข้าวกล้อง

3.3.2 การเตรียมสารสกัดหยาบจากข้าว

1) นำตัวอย่างข้าวกล้อง และข้าวฮางชนิดละ 1 กิโลกรัม มาปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นน้ำผลไม้ จากนั้นนำมาสกัดโดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำการคนทุก 1 ชั่วโมง เพื่อให้ข้าวสัมผัสกับตัวทำละลายได้ทั่วถึง จากนั้นนำไปกรองด้วยผ้าขาวบางและนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปทำการระเหยแห้งด้วยวิธีการแช่เยือกแข็ง (Freeze dry) ซึ่งกระบวนการสกัดนี้ดัดแปลงจากวิธีของ

2) คำนวณหาปริมาณร้อยละผลผลิต

3.3.3 การทดสอบปริมาณความชื้น

ศึกษาปริมาณความชื้นด้วยวิธีเอโอเอซี (AOAC Method) โดยการให้ความร้อนแก่ข้าว ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1) อบถ้วยครูซิเบิลพร้อมฝาทั้งหมด 6 ถ้วย ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำเข้าโถดูดความชื้นแล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็น แล้วจึงนำไปชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 4 ตำแหน่ง

2) นำข้าวกล้อง และข้าวฮาง หนัก 2 กรัม ใส่ลงในถ้วยครูซิเบิลแต่ละถ้วย ซึ่งแบ่งออกเป็นข้าวกล้อง 3 ถ้วย และข้าวฮาง 3 ถ้วย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

3) นำถ้วยครูซิเบิลพร้อมฝาที่มีตัวอย่างข้าว มาอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หรือจนกว่าน้ำหนักคงที่ จากนั้นนำเข้าโถดูดความชื้นแล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็น และนำไปชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 4 ตำแหน่ง

4) คำนวณหาปริมาณความชื้น จากสมการ

$$\text{ปริมาณความชื้น} = \frac{\text{ผลต่างของน้ำหนักก่อนอบและหลังอบ (กรัม)}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น (กรัม)}} \times 100$$

3.3.4 การทดสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

ศึกษาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีดีเอ็นเอส (DNS method) เป็นการทดสอบโดยใช้การทำปฏิกิริยาระหว่างน้ำตาลรีดิวซ์ กับสารละลายไดไนโตรซาลิไซลิกที่มีสีเหลือง เมื่อเกิดปฏิกิริยาไดไนโตรซาลิไซลิกจะเปลี่ยนเป็นสารละลายสีส้มแดง โดยดัดแปลงจากวิธีของ Tunde (2020 : 128-143) ดังนี้

1) สร้างกราฟสารมาตรฐานกลูโคสโดย ปิเปตต์สารมาตรฐานกลูโคสความเข้มข้น 0.25, 0.2, 0.15, 0.10 และ 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลตร ใส่ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอดปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย 3,5-ไดไนโตรซาลิไซลิก ความเข้มข้น 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร และนำไปต้มบนเตาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร และสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของกลูโคส

2) ทำการทดสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของสารสกัดหยาบ โดยปิเปตต์สารสกัดหยาบข้าวกล้อง และสารสกัดหยาบข้าวฮาง ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติมสารละลาย 3,5-ไดไนโตรซาลิไซลิก ความเข้มข้น 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร และนำไปต้มบนเตาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3) คำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของสารสกัดหยาบข้าวกล้อง และสารสกัดหยาบข้าวฮาง โดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาแทนในสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานกลูโคส

3.3.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีดีพีพีเอช (DPPH)

ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีดีพีพีเอช (DPPH method) ซึ่งเป็นสารละลายที่มี สีม่วง เมื่อได้รับอิเล็กตรอน หรืออนุมูลอิสระ ไฮโดรเจนจะเปลี่ยนเป็น DPPH-H เกิดเป็นสารละลายสีเหลือง โดยดัดแปลงจากวิธีของ Singh et al. (2020 : 333-346) ดังนี้

1) ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานบีเอชที โดยปิเปตต์สารละลายมาตรฐานบีเอชทีที่ความเข้มข้นสุดท้าย 12.5, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลงในไมโครเพลท 96 หลุม ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลายดีพีพีเอชความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ

2) นำค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระมาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการต้านอนุมูลอิสระกับความเข้มข้นของสารมาตรฐานบีเอชที จากนั้นคำนวณหาค่า IC_{50}

3) ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบ โดยเปตต์สารสกัดหยาบข้าวกล้อง และสารสกัดหยาบข้าวฮางที่ความเข้มข้นสุดท้าย 125, 250, 500 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลงในไมโครเพลท 96 หลุม ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลายดีพีพีเอชความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ

4) นำค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระมาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการต้านอนุมูลอิสระกับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ จากนั้นคำนวณหาค่า IC_{50}

3.3.6 การวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธีแบรดฟอร์ด

วัดปริมาณโปรตีนในสารสกัดหยาบตามวิธีของ Bradford (1976) ดังนี้

1) สร้างกราฟมาตรฐานโปรตีนโบวินซีรั่มอัลบูมิน (BSA) ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 3, 6, 9 และ 12 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 800 ไมโครลิตร จากนั้นเติมแบรดฟอร์ดรีเอเจนต์ ลงในหลอดทดลองหลอดละ 200 ไมโครลิตรเขย่าและตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร โดยทำซ้ำ 3 ครั้ง แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงไปสร้างกราฟมาตรฐานบีเอสเอ

2) วัดปริมาณโปรตีนของสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 36 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เติมแบรดฟอร์ดรีเอเจนต์และผสมให้เข้ากัน จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร บันทึกผลการทดลองที่ได้ คำนวณค่าปริมาณโปรตีนโดยการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานโปรตีน

3.3.7 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีเอฟอาร์เอพี (FRAP)

การตรวจสอบคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ Ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assay ดัดแปลงจากวิธีของ Itharat, A., et al. (2016 : 2170) ดังนี้

1) เตรียมสารละลายเฟอรัสซัลเฟตที่ความเข้มเข้นสุดท้ายในช่วง 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลงในถาดหลุม 96 หลุม จากนั้นเติม FRAP reagent ทิ้งไว้ในที่มือ 8 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้ ไมโครเพลตรีดเดอร์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และนำค่าที่ได้มาพล็อตกราฟมาตรฐาน รายงานผลเป็น (μg of Fe (II)/mg สารสกัด) หรือ FRAP value

2) เตรียมสารละลายโทลอกที่ความเข้มข้น 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลงในถาดหลุม 96 หลุม จากนั้นเติม FRAP reagent ทิ้งไว้ในที่มือ 8 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้ไมโครเพลตรีดเดอร์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และนำค่าที่ได้มาพล็อตกราฟมาตรฐาน รายงานผลเป็น (μg of Trolox/mg สารสกัด) หรือ TEAC value

3) เจือจางตัวอย่างสารสกัดข้าวกล้องและข้าวฮางที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำมา 20 ไมโครลิตร ผสมกับ FRAP reagent ทิ้งไว้ในที่มือ 8 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้ไมโครเพลตรีดเดอร์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และนำค่าที่ได้มาคำนวนหาค่า TEAC value และ FRAP value

3.3.8 การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม

การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมด้วยวิธีโฟลิน-ซีโอแคลทู (Folin-Ciocalteu) โดยดัดแปลงจากวิธีของ Huang, H. et al. (2018 : 1366) ดังนี้

1) สร้างกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก โดยปิเปตต์สารมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความเข้มข้น 12.5, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองปริมาตร 200 ไมโครลิตร และเติมสารละลายโฟลิน-ซีโอแคลทู ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตรต่อปริมาตร 1000 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 20 โดยมวลต่อปริมาตร ปริมาตร 800 ไมโครลิตร และนำไปบ่มในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 740 นาโนเมตร โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

2) สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของกรดแกลลิก

3) ทำการทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบโดย ปิเปตต์สารสกัดหยาบข้าวกล้อง และสารสกัดหยาบข้าวฮาง ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองปริมาตร 200 ไมโครลิตร และเติมสารละลายโฟลิน-ซีโอแคลทู ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตรต่อปริมาตร 1000 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 20 โดยมวลต่อปริมาตร ปริมาตร 800 ไมโครลิตร และนำไปบ่มในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 740 นาโนเมตร โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

4) คำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบข้าวกล้อง และสารสกัดหยาบข้าวฮาง ในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด โดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาแทนในสมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก

3.3.9 การทดสอบการยอมรับทางประสาทสัมผัส

ทำการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสโดยใช้ข้าวกล้องและข้าวฮางหุงสุกที่อัตราส่วนข้าวสารต่อน้ำเท่ากับ 1 : 4 โดยใช้อาสาสมัครกลุ่มผู้ทดสอบเป็นนักศึกษาคหกรรมศาสตร์ที่ผ่านการฝึกฝน จำนวน 30 คนด้วยวิธีการให้คะแนนความชอบ 9 ระดับ (9 Point Hedonic Scale) ให้คะแนนตั้งแต่ 1-9 (1 หมายถึงชอบน้อยที่สุด ไปถึง 9 หมายถึงชอบมากที่สุด) ในด้านสี กลิ่น เนื้อสัมผัส รสชาติ และความชอบโดยรวม