บทที่ 3

วิธีการวิจัย (Methodology)

วิธีดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/ เก็บข้อมูล

พื้นที่ในเขตจังหวัดสมุทรสงครามเป็นพื้นที่ลุ่มปากแม่น้ำ มีแม่น้ำสามสายไหลผ่าน นับว่าเป็นเขตที่ดินมีความสมบูรณ์ เหมาะสมแก่การเพาะปลูก โดยเฉพาะไม้ผลเศรษฐกิจ เช่น ลิ้นจี่ ส้มโอ มะพร้าว เป็นต้น อย่างไรก็ตามจังหวัดสมุทรสงครามก็ยังปลูกผักและสมุนไพรพื้นบ้าน หากแต่ปลูกในปริมาณน้อย เพื่อบริโภคและจำหน่ายในท้องถิ่นเท่านั้น ผักและสมุนไพรที่บริโภค แปรรูป และจำหน่ายส่วนมากถูกนำเข้ามาจากจังหวัดใกล้เคียง เช่น ราชบุรี และกรุงเทพมหานคร

การประเมินคุณประโยชน์ทางอาหารของผัก และสมุนไพรพื้นบ้านในจังหวัดสมุทรสงคราม มีลำดับขั้นตอน และวิธีการดังนี้

1. การสำรวจข้อมูลพื้นฐาน และการเก็บพืชตัวอย่าง (Plant material collection)

การเก็บตัวอย่างผัก และสมุนไพรพื้นบ้าน ดำเนินการโดยความร่วมมือกับ สำนักงานสาธารณสุขจังหวัด สำนักงานเกษตรจังหวัดสมุทรสงคราม สำนักงานเกษตรอำเภออัมพวา ซึ่งคณะผู้วิจัยได้รับข้อมูลเบื้องต้นของตัวอย่าง เช่น พื้นที่ที่ปลูกผัก และสมุนไพร, ปริมาณผลผลิตที่ได้ในปีล่าสุด และการติดต่อผู้เชี่ยวชาญด้านสมุนไพรพื้นบ้านของชุมชน ในการให้ความช่วยเหลือผู้วิจัยในการเก็บตัวอย่าง เป็นต้น ตัวอย่างที่เก็บได้ถูกแบ่งเป็น 2 ส่วนที่สด (fresh portion) เพื่อนำไปส่งตรวจวิเคราะห์หาคุณประโยชน์ทางอาหาร และส่วนแห้ง (dried portion) ซึ่งเตรียมโดยอบแห้งที่อุณหภูมิ 45 °C และบดให้ละเอียด เพื่อเก็บไว้ศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพในเชิงลึกต่อไป (ซึ่งอาจจะวิจัยต่อยอดจากงานวิจัยครั้งนี้)

2. การประเมินคุณค่าทางโภชนาการ (Evaluation of nutritive values)

2.1. **การประมาณค่าปริมาณของงน้ำในตัวอย่าง** (Proximal analysis of water content)

ดำเนินการโดยวิธีของ The official methods of analysis of AOAC International, 16th ed. (Cunnit, 1995) ตัวอย่างสดนำมาหาปริมาณน้ำ โดยอบตัวอย่างที่อุณหภูมิ 105 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง บดและบรรจุส่วนที่เหลือในภาชนะมิดชิด เก็บภาชนะไว้ในที่แห้งและเย็น เพื่อใช้สำหรับวิเคราะห์อื่นต่อไป สำหรับปริมาณน้ำของตัวอย่าง (Water content) คำนวณจากน้ำหนักทั้งหมดลบด้วยน้ำหนักแห้ง แล้วคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ ของน้ำต่อน้ำหนักสด (Wet weight basis)

2.2. **การวัดปริมาณโปรตีนอย่างหยาบ** (Crude protein determination)

ดำเนินการโดยวิธี Kjeldahl method ใช้เครื่อง Buchi digestion unit (B-435) และ distillation unit (B-323) (Buchi, Switzerland) อธิบายอย่างย่อ คือ ตัวอย่างแห้ง 0.2 g ถูกย่อยด้วย conc. H_2SO_4 เติม selenium/copper sulfate mixture 3 g ใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา การย่อยใช้เวลาต่อเนื่องครึ่งชั่วโมง โดยสีของ mixture เปลี่ยนเป็นสีเขียวใส จากนั้นเติม 32% NaOH จำนวน 60 ml กลั่นเป็นเวลา 3 นาที เก็บส่วนที่กลั่นไว้ใน flask ที่มี 2 % Boric acid solution ที่มี methylene blue และ methyl red เป็น indicators จำนวน 60 ml จากนั้น titrate ด้วย 0.1 N H_2SO_4 solution เมื่อถึงจุดสิ้นสุด (end point) สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีม่วง ปริมาณโปรตีนหยาบคำนวณ (N × 6.25) และแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ ของน้ำต่อน้ำหนักสด (Wet weight basis)

2.3. **การวัดปริมาณไขมันอย่างหยาบ** (Crude fat determination)

สกัดตัวอย่างแห้ง 1 g ด้วย petroleum ether จำนวน 25 ml ใน Goldfisch apparatus (Labconco, U.S.A.) เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง จากนั้นระเหยสารละลายออกที่อุณหภูมิ 105 °C ชั่งส่วนที่เหลือคำนวณ และแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ ของน้ำต่อน้ำหนักสด (Wet weight basis)

2.4. **การวัดปริมาณไฟเบอร์** (Dietary fiber determination)

วัดปริมาณไฟเบอร์ที่ไม่ละลายน้ำ (Insoluble dietary fiber) โดยวิธีของ the AOAC Official Method 991.42 (Cunnit, 1995) จากการย่อยตัวอย่างโดยใช้เอนไซม์ amyloglucosidase เข้มข้น จำนวน 0.1 ml ส่วนปริมาณไฟเบอร์ที่ละลายน้ำ (Soluble dietary fiber) โดยวิธีของ the AOAC Official Method, 993.19 ซึ่งดัดแปลงมาจากการวิเคราะห์ไฟเบอร์ที่ไม่ละลายน้ำ ปริมาณไฟเบอร์ทั้งหมดคำนวณได้จากผลรวมของไฟเบอร์ที่ไม่ละลายน้ำ และที่ละลายน้ำ

2.5. การวัดปริมาณเถ้ารวม (Total ash content)

เผาตัวอย่างแห้ง 1 g ด้วย muffle furnace ที่อุณหภูมิ 525°C จนได้เถ้า จากนั้นนำมาชั่งและคำนวณ และแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ ของน้ำต่อน้ำหนักสด (Wet weight basis)

2.6. การวัดปริมาณคาร์โบไฮเดรต (Carbohydrate determination)

ปริมาณคาร์โบไฮเดรต คำนวณจากน้ำหนักสดลบด้วย ปริมาณน้ำ ปริมาณโปรตีนอย่างหยาบ ปริมาณไฟเบอร์รวม และปริมาณเถ้ารวม

2.7. การวัดปริมาณแคลเซียม (Calcium determination)

การวัดปริมาณแคลเซียม และโพแทสเซียมตามเกณฑ์ของ The AOAC International methods of analysis (1995) โดยนำตัวอย่างแห้ง 1 g มาเผาด้วย muffle furnace 525°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นจากนั้นหยด deionized water จำนวน 10 หยด และเติมกรด nitric acid จำนวน 3-4 ml กรด nitric acid ที่มีมากเกินไปจะถูกระเหยออกด้วย hot plate ที่อุณหภูมิ 100-120°C จากนั้นนำตัวอย่างมาเผาต่อด้วย furnace เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เถ้าที่ได้จะนำมาละลายด้วย hydrochloric acid จำนวน 10 ml จากนั้นนำมาปรับปริมาตรด้วย deionized water จนได้ปริมาตร 50 ml ด้วย volumetric flask เติม lanthanium จำนวน 10,000 μg/ml ในทุกตัวอย่างรวมถึงสารมาตรฐาน เพื่อป้องกันการเกิดปัจจัยรบกวนทางเคมี (chemical interferences) นำตัวอย่างที่เตรียมเสร็จแล้ว มาวิเคราะห์ด้วย atomic absorption spectrophotometer วัดค่าการดูดกลืนแสงที่จำเพาะกับแคลเซียม และโพแทสเซียม โดยเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงที่ลำดับความเข้มข้นต่างๆของสารมาตรฐาน

2.8. การวัดปริมาณวิตามินซี และเบต้าแคโรทีน

(Vitamin C and β-carotene determination)

การวัดปริมาณวิตามินซี และ เบต้าแคโรทีน ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ดัดแปลงมาจากวิธีของ Zhao และคณะ (2004) อธิบายโดยย่อ คือ

2.8.1. การเตรียมตัวอย่าง

การสกัดตัวอย่างสำหรับวิตามินซี: ตัวอย่างแห้ง 0.1 mg ตกตะกอนโปรตีนด้วย 60% methanol/ 1 mM EDTA mixture จำนวน 400 μl ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ด้วยความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 8 นาที ถ่ายส่วนใสลงบน polypropylene tube จากนั้นระเหยให้แห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน ส่วนที่แห้งคือส่วนที่สกัดได้นั้น นำมาละลายด้วย methanol จำนวน 100 μl

การสกัดตัวอย่างสำหรับ เบต้าแคโรทีน : ตัวอย่างแห้ง 0.1 mg ตกตะกอนโปรตีนออกโดยใช้ ethanol จำนวน 100 μl และสกัดต่อด้วย choloroform จำนวน 600 μl โดยเขย่าเป็นเวลา 5 นาที ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยง นำส่วนที่เป็นชั้นสารละลายมาระเหยให้แห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน ส่วนที่แห้งคือส่วนที่สกัดได้นั้น นำมาละลายด้วย methanol จำนวน 100 μl

นำส่วนสกัดสำหรับวิเคราะห์วิตามินซี และส่วนสกัดสำหรับวิเคราะห์เบต้าแคโรทีนมาผสมกัน เพื่อวิเคราะห์โดย HPLC ต่อไป

2.8.2. เครื่องมือ HPLC ที่เป็น automated system และมี detector เป็น photo diode array ที่วัดค่าดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 200-400 nm (บริษัท Water, U.S.A.) ส่วน columnที่ใช้ คือ LiChrospher 100 RP-18 column ขนาด 125 × 4 mm I.D.; ขนาด particle 5μm (บริษัท Merck, Germany) ตัวชะที่ใช้แยก(mobile phase) คือ methanol-acetonitrile-tetrahydrifuran (75: 20: 5, v/v/v) ที่อัตราการไหล (Flow rate) 1.2 ml/min

2.8.3. หลักจากวิเคราะห์วิตามินซี และ เบต้าแคโรทีน โดย HPLC แล้ว ปริมาณของสารในตัวอย่างจะแสดงค่าเป็น peak area ของกราฟแยก (chromatogram) ค่าที่ได้นำไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน (Standard calibration curves) ซึ่งเตรียมจากสารมาตรฐานของวิตามินแต่ละชนิด ที่หลายๆระดับความเข้มข้น