บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1. ตัวอย่าง

1.1 เมล็ดฟักทอง(*Cucurbita maxima* Duchesne) ซื้อจากตลาดสามย่าน กรุงเทพฯ นำมาล้างให้สะอาดและปล่อยไว้ให้แห้ง ก่อนที่จะนำไปวิเคราะห์

1.2 เมล็ดกระถิน(*Leucaena leucocephala* de wit)ได้จากการเก็บฝักกระถินที่แก่จัดจากต้นกระถินในบริเวณคณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย นำมาแกะเอาเมล็ดกระถินภายใน

1.3 ใบกระถิน(*Leucaena leucocephala* de wit)ซื้อยอดใบกระถินอ่อน จากตลาดสามย่าน กรุงเทพฯ

2. สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

2.1 Copper sulphate เป็น analytical reagent ผลิตโดย E. Merck, Germany

2.2 Potassium sulphate เป็น analytical reagent ผลิตโดย E. Merck, Germany

2.3 Sulphuric acid เป็น analytical reagent ผลิตโดย E. Merck, Germany

2.4 Boric acid เป็น analytical reagent ผลิตโดย E. Merck, Germany

2.5 Modified methyl red เป็น analytical reagent ผลิตโดย May & Baker, England

2.6 Diethyl ether เป็น analytical reagent ผลิตโดย Ridel-De Haenag Seelze-Hannoi, Germany

2.7 Sodium hydroxide เป็น analytical reagent ผลิตโดย E. Merck, Germany

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.8 Ethanol เป็น analytical reagent ผลิตโดย E. Merck, Germany

2.9 Calcium sulphate dihydrate เป็น analytical reagent ผลิตโดย J.T. Baker Chemicals, Holland

2.10 Hydrochloric acid เป็น analytical reagent ผลิตโดย E. Merck, Germany

2.11 Trichloroacetic acid เป็น analytical reagent ผลิตโดย May & Baker, England

2.12 Ferric chloride เป็น analytical reagent ผลิตโดย Farmitalia carlo errba, Italy

2.13 Sodium sulphate เป็น analytical reagent ผลิตโดย E. Merck, Germany

2.14 Nitric acid เป็น analytical reagent ผลิตโดย E. Merck, Germany

2.15 กระดาษกรองเบอร์ 2, 3 และ 542 ผลิตโดย Whatman Limited, England

2.16 Mimosine ผลิตโดย Sigma Chemical Company, USA.

2.17 Activated charcoal เป็น analytical reagent ผลิตโดย E. Merck, Germany

2.18 (Benzoyl-dl-arginine-p-nitroanilide) HCl (BAPA) เป็น analytical reagent ผลิตโดย E. Merck, Germany

2.19 Dimethyl formamide เป็น analytical reagent ผลิตโดย E. Merck, Germany

2.20 Trypsin เป็น analytical reagent ผลิตโดย E. Merck, Germany

2.21 Acetic acid เป็น analytical reagent ผลิตโดย E. Merck, Germany

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. วิธีการวิจัย

1. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของพืชตัวอย่าง

ทำการสุ่มตัวอย่างมาเพื่อวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางอาหาร โดยนำตัวอย่างแต่ละชนิดมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบด(Blender, Aloha electric) แล้วนำมาวิเคราะห์ ดังนี้

1.1 หาปริมาณความชื้น(97)

การหาปริมาณความชื้นในตัวอย่างอาหารโดยวิธีของ A.O.A.C. 1980 วิเคราะห์โดยการวัดน้ำหนักที่หายไปของตัวอย่าง เมื่อนำตัวอย่างมาอบจนได้น้ำหนักคงที่ในตู้อบ(Memmert Germany) ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส

1.2 หาปริมาณไขมัน(97)

หาปริมาณไขมันในตัวอย่างโดยวิธีของ A.O.A.C. 1980 โดยการสะกัดไขมันด้วยอีเธอร์ จากนั้นจึงระเหยอีเธอร์ออกไป ชั่งหาปริมาณไขมันที่สะกัดออกมาได้

1.3 หาปริมาณเส้นใยอาหาร(97)

นำตัวอย่าง(ถ้ามีปริมาณไขมันสูง จะต้องสะกัดไขมันออกก่อน) มาชั่งให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน จากนั้นจึงนำมาย่อยด้วยกรด 30 นาทีและด่าง 30 นาที จะเหลือส่วนที่เป็นเส้นใยอาหารอยู่นำมากรองและล้าง อบให้แห้ง ที่ 100 องศาเซลเซียส

1.4 หาปริมาณเถ้า(97)

นำตัวอย่างมาชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอน แล้วนำไปเผาที่ 450 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง(Muffle Furnace, Gallenkamp) หรือจนกลายเป็นเถ้าสีขาวหรือสีเทา จึงนำไปชั่งหาปริมาณเถ้าที่ได้

1.5 หาปริมาณโปรตีน(Kjeldahl method)(97)

หาปริมาณโปรตีนในตัวอย่างอาหารและโปรตีนสะกัด โดยอาศัยหลักการเปลี่ยนไนโตรเจนจากโปรตีน เป็นแอมโมเนียมซัลเฟตโดยปฏิกิริยาออกซิเดชั่น จากนั้นจึงทำให้ แอมโมเนียมซัลเฟตสลายตัวเป็นก๊าซแอมโมเนียโดยใช้ด่าง นำไปกลั่น

เก็บไอของแอมโมเนียด้วยกรดบอริก ใช้เครื่องมือBuchi 322/342 แล้วไทเทรตหาปริมาณไนโตรเจนด้วยกรดซัลฟุริก จากปริมาณไนโตรเจนที่ได้ จะคำนวณหาปริมาณโปรตีนได้ต่อไป

1.6 หาปริมาณคาร์โบไฮเดรต(97)

หาโดยการหักลบปริมาณความชื้น ไขมัน โปรตีน เส้นใยอาหาร และเถ้าออก ที่เหลือจะเป็นปริมาณคาร์โบไฮเดรต

2. การสะกัดโปรตีนจากพืช

สะกัดโปรตีนจากตัวอย่างพืชทั้ง 3 ชนิด คือ เมล็ดฟักทอง, เมล็ดกระถิน และใบกระถินโดยนำตัวอย่างมาบดให้ละเอียดโดยใช้เครื่องบด(Blender, Aloha electric) จากนั้นจึงนำตัวอย่างมาชั่ง และเติมน้ำในอัตราส่วน ตัวอย่าง 100 กรัม ต่อน้ำ 1000 มิลลิลิตร ปล่อยทิ้งไว้อย่างน้อย 24 ชั่วโมง โดยเก็บไว้ในตู้เย็น จึงนำมากรองโดยใช้ผ้าขาวบาง นำน้ำที่กรองได้ซึ่งต่อไปนี้จะเรียกว่าสารละลาย-ตัวอย่าง มาตกตะกอนโปรตีน ด้วยวิธีการ 3 วิธีคือ

2.1 ตกตะกอนโปรตีนด้วยความร้อน(33)

นำสารละลายตัวอย่างแต่ละชนิดมาต้มจนเดือดเป็นเวลา 15 นาที โปรตีนจะตกตะกอนแยกตัวออกมา ตั้งทิ้งไว้ให้โปรตีนตกตะกอนนอนก้น แล้วจึงรินน้ำส่วนที่ใสทิ้งไป ส่วนที่เหลือนำมาแยกตะกอนโปรตีน โดยใช้เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge, Clements) ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นำโปรตีนที่สะกัดได้มาอบให้แห้งที่ 60 องศาเซลเซียส ในตู้อบ(Memmert, Germany)

2.2 ตกตะกอนด้วยเกลือแคลเซียมซัลเฟต(33)

นำสารละลายตัวอย่างมาต้มจนเกือบเดือดแล้วเติมเกลือแคลเซียมซัลเฟตลงไปคนให้ละลาย จนได้สารละลายอิ่มตัวของแคลเซียมซัลเฟต(ความเข้มข้น 0.03 โมล/ลิตร)ซึ่งจะทำให้โปรตีนแยกตัวตกตะกอนออกมา จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้ตะกอนนอนก้น จึงรินน้ำส่วนที่ใสทิ้งไปส่วนที่เหลือนำมาแยกเอาตะกอนโปรตีนออกมา โดยใช้เครื่องหมุนเหวี่ยง ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาทีและล้างด้วยน้ำ นำโปรตีนที่สะกัดได้ไปอบให้แห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

2.3 ตกตะกอนโปรตีนโดยการปรับความเป็นกรด-เบส(8)

นำสารละลายตัวอย่างมาปรับให้มีความเป็นกรดที่พีเอช 4 โดยใช้กรดเกลือความเข้มข้น 1 นอร์แมล จะมีโปรตีนบางส่วนตกตะกอนออกมา ตั้งทิ้งไว้ให้ตะกอนนอนก้น รินน้ำส่วนที่ใสเก็บไว้ นำส่วนที่เหลือมาแยกเอาตะกอนของโปรตีนออกมา โดยใช้เครื่องหมุนเหวี่ยง(Centrifuge, Clements) ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เทน้ำส่วนที่ใสมารวมกับส่วนแรกเก็บตะกอนโปรตีนที่สะกัดได้ จากนั้นนำเอาน้ำส่วนที่ใสทั้งหมด มาปรับให้มีความเป็นกรดที่พีเอช 5 โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 นอร์แมล จะได้โปรตีนอีกส่วนหนึ่งตกตะกอนออกมา เก็บตะกอนโดยใช้วิธีการเดิม แล้วนำตะกอนทั้งสองส่วนมารวมกัน ล้างด้วยน้ำ นำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสในตู้อบ การที่เลือกใช้พีเอช 4 และ 5 นี้ เนื่องจากที่พีเอชนี้ ประจุไฟฟ้ารวมโดยเฉลี่ยของโปรตีนส่วนใหญ่จะเป็นศูนย์ ทำให้โปรตีนละลายน้ำได้น้อย จึงตกตะกอนออกมา(31) ซึ่งจากการทดลองจะเห็นได้ชัดเจนว่าที่พีเอชอื่นๆ สังเกตไม่เห็นตะกอนของโปรตีนเลย

3. การหาปริมาณกรดอะมิโน(98)

นำตัวอย่างมาสะกัดไขมันออก จากนั้นจึงนำมาทำปฏิกิริยาออกซิเดชั่นด้วยกรดเปอร์ฟอร์มิก จากนั้นจึงนำมาไฮโดรไลซ์ด้วยกรดเกลือ นำสารละลายที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะมิโน ด้วยเครื่องวิเคราะห์กรดอะมิโน (Amino acid analyzer, Hitachi 835-50) ซึ่งวิธีการนี้จะไม่สามารถหาปริมาณทริพโตแฟนได้ เนื่องจากทริพโตแฟนจะถูกทำลายในระหว่างการไฮโดรไลซ์ด้วยกรดเกลือ

4. การหาค่าของ Amino acid score(104)

จากปริมาณกรดอะมิโนที่หาได้ในแต่ละตัวอย่าง จะสามารถนำไปคำนวณหา Amino acid score โดยเปรียบเทียบกับกรดอะมิโนในโปรตีนมาตรฐาน FAO/WHO คือ

$$\text{Amino acid score} = \frac{\text{มิลลิกรัมของกรดอะมิโนใน 1 กรัม ของโปรตีน} \times 100}{\text{มิลลิกรัมของกรดอะมิโนใน 1 กรัมของโปรตีนมาตรฐาน}}$$

จากค่าของ Amino acid score ที่ได้ของกรดอะมิโนแต่ละตัวจะทราบว่ากรดอะมิโนตัวใดเป็น Limiting amino acid ตัวแรกและตัวที่สอง โดยที่ Limiting amino acid ตัวแรก จะหมายถึงกรดอะมิโนที่มี Amino acid score ต่ำที่สุด และ Limiting amino acid ตัวที่สอง ก็จะเป็นกรดอะมิโนที่มี Amino acid score ต่ำเป็นอันดับสอง ซึ่งโดยทั่วไปแล้ว จะให้ความสำคัญกับ Limiting amino acid ตัวแรกและตัวที่สองเท่านั้น

5. การหาปริมาณสารด้านคุณค่าทางโภชนาการ

5.1 การหาปริมาณทริพซิน อินฮิบิเตอร์(52, ภาคผนวก ข)

นำสารละลายตัวอย่างมาเติมสารละลายทริพซิน 2 มิลลิลิตร และสารละลายบีเอพีเอ(BAPA) 5 มิลลิลิตร บ่ม(incubate)ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จึงหยุดปฏิกิริยาด้วยกรดน้ำส้ม 1 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ไปกรองและวัดการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตรด้วยเครื่อง Ultraviolet Spectrophotometer (Unicam SP. 1800) ซึ่งเป็นเครื่องวัดการดูดกลืนแสง จากนั้นเราจะทราบความสามารถของทริพซิน อินฮิบิเตอร์(Trypsin inhibitor activity) โดยวัดเป็นหน่วยของทริพซินที่ถูกยับยั้ง(Trypsin inhibited unit, TIU) โดย 1 TIU มีค่าเท่ากับการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นจากเดิมทุกๆ 0.01 ที่ 410 นาโนเมตร

5.2 การวิเคราะห์หาปริมาณไฟเตต(89, ภาคผนวก ข)

สะกัดไฟเตตจากตัวอย่างแต่ละชนิด ด้วยกรดไตรคลอโรอะเซติค ความเข้มข้น 3% แล้วนำไปเติมเฟอร์ริกคลอไรด์เพื่อให้เหล็กเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับไฟเตตเป็นตะกอนแยกตัวออกมา ละลายตะกอนด้วยกรดไนตริกเข้มข้น จากนั้นจึงวิเคราะห์หาปริมาณเหล็กโดยวิธี Flame Atomization ด้วยเครื่อง Atomic absorption spectrophotometer(Shimadzu AA-650) จากปริมาณเหล็กที่วัดได้ สามารถคำนวณเป็นปริมาณไฟเตตได้ โดยคูณด้วยแฟกเตอร์ 2.98

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5.3 การวิเคราะห์หาปริมาณมิโมซีน(100, ภาคผนวก ข)

สะกัดมิโมซีนในตัวอย่างด้วยกรดเกลือ กำจัดสิ่งปนเปื้อนในสารละลายที่ได้โดยใช้ถ่านกัมมันต์(Activated charcoal) จากนั้นจึงเติมสารละลายของเฟอร์ริกคลอไรด์เพื่อให้เกิดเป็นสารละลายสีม่วงแดง แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 535 นาโนเมตรด้วยเครื่อง Ultraviolet Spectrophotometer (Unicam SP 1800) และคำนวณหาความเข้มข้นของมิโมซีนได้ จากกราฟมาตรฐาน

4. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ(106)

ในการวิจัยครั้งนี้ วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน แบบ Completely randomized design ซึ่งเหมาะสมที่จะใช้กับข้อมูลที่เหมือนกันมากไม่แตกต่างกัน แต่มีปัจจัยอื่นๆ ที่ทำให้ผลการทดลองแตกต่างกันไป ในที่นี้ก็คือ ผลของการสะกัดโปรตีนโดยวิธีต่างๆ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย