บทที่ 3
วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 วัตถุดิบ

3.1.1 ข้าวเจ้าพันธุ์พิษณุโลก 2 เก็บเกี่ยวใหม่ ได้รับจาก หสน. โรงสีไฟสิงหวัฒน์

3.1.2 ข้าวเจ้าพันธุ์ชัยนาท 1 เก็บเกี่ยวใหม่ ได้รับจาก หสน. โรงสีไฟสิงหวัฒน์

3.1.3 ข้าวเจ้าพันธุ์ชัยนาท 2 เก็บเกี่ยวใหม่ ได้รับจาก หสน. โรงสีไฟสิงหวัฒน์

3.1.4 ข้าวเจ้าพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เก็บเกี่ยวใหม่ ได้รับจาก หสน. โรงสีไฟสิงหวัฒน์

3.1.5 ข้าวเหนียวพันธุ์สันป่าตอง เก็บเกี่ยวใหม่ ได้รับจาก หสน. โรงสีไฟสิงหวัฒน์

3.1.6 ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 เก็บเกี่ยวใหม่ ได้รับจาก หสน. โรงสีไฟสิงหวัฒน์

3.2 สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัยนี้ใช้แบบ Analytical grade

3.2.1 Ethyl alcohol (Merck)

3.2.2 Bromothymol blue (Merck) (Australia)

3.2.3 Potassium hydroxide (Merck) (Australia)

3.2.4 Dianisidine (Sigma) (United States of America)

3.2.5 Phosphate buffer 0.05 M pH 5.8 เตรียมจากส่วนผสมของสารละลาย 0.05 M Sodium phosphate monobasic และ 0.05 M Sodium phosphate dibasic ในสัดส่วน 92:8 โดยปริมาตร ปรับ pH ให้ได้ 5.8 ตามวิธีการของ Merck

3.2.6 Guaiacol (Sigma) (China)

3.2.7 Hydrogen peroxide (APS) (Australia)

3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์

3.3.1 UV-Vis spectrophotometer (single beam) รุ่น UV 2100

3.3.2 Micro-plate reader รุ่น KGW-961

3.3.3 Auto-pipette

3.3.4 เครื่องแก้วทางวิทยาศาสตร์ หลอดทดลอง บีกเกอร์ ขวดรูปชมพู่ ขวดปรับปริมาตร แท่งแก้วคนสาร ฯลฯ

3.3.5 ชั้นวางหลอดทดลอง

3.3.6 Tips สำหรับ Auto-pipette

3.3.7 96-well micro-plates ชนิดพลาสติก

3.4 วิธีดำเนินงานวิจัย

3.4.1 เก็บตัวอย่างข้าวใหม่ (เก็บเกี่ยวใหม่) ที่นิยมซื้อขายและปลูกในประเทศไทย มีศักยภาพทางเศรษฐกิจจำนวน 6 พันธุ์ ประกอบด้วยข้าวเจ้า 4 พันธุ์ ได้แก่ ขาวดอกมะลิ 105 พิษณุโลก 2 ชัยนาท 1 และ ชัยนาท 2 และข้าวเหนียว 2 พันธุ์ ได้แก่ สันป่าตอง และ กข 6

3.4.2 แบ่งข้าวทุกพันธุ์ที่ทำการศึกษาออกเป็น 2 ส่วน โดยเก็บรักษาในรังพลาสติก ส่วนแรกเก็บรักษาในสภาพข้าวเปลือก ส่วนที่ 2 เก็บรักษาในสภาพข้าวสาร โดยเก็บในสภาพอุณหภูมิห้องที่ 25 – 30 องศาเซลเซียส ตามสภาวะการเก็บรักษาทั่วไปของโรงสีที่เข้าร่วมโครงการ สุ่มตัวอย่างมาทดสอบทุก 2 สัปดาห์ต่อเนื่องกันจนครบ 6 เดือน โดยในส่วนของข้าวสารสุ่มตัวอย่างมาตรวจสอบได้ทันที แต่ในส่วนของตัวอย่างที่เก็บในสภาพข้าวเปลือก จะนำไปสีด้วยเครื่องสีแบบขัดขาวขนาดเล็ก (หสน. โรงสีไฟสิงหวัฒน์) ก่อนนำมาตรวจสอบทันที

3.4.3 ใช้วิธีการแบบที่ 1 (Method 1) ในการทดสอบความใหม่-เก่าของข้าว โดยเตรียมน้ำยาตรวจสอบข้าวเก่าที่พัฒนาโดยกลุ่มคลัสเตอร์ข้าวพิษณุโลก ซึ่งเป็นสารละลายอินดิเคเตอร์ bromothymol blue ใน ethyl alcohol ที่มีการปรับ pH ให้เป็นกลาง ตามวิธีการที่ได้อธิบายโดยคงศักดิ์ ศรีแก้ว (2551) ดัดแปลงจากวิธีของ Takashi *et al.* (2006) ซึ่งทำได้โดย ชั่ง bromothymol blue มา 0.3 กรัม ละลายใน ethyl alcohol 150 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นลงไปอีก 50 มิลลิลิตร จะได้ stock solution เตรียม working solution โดยการเจือจางในน้ำกลั่นโดยใช้สัดส่วน 1 : 30 จากนั้นปรับ pH ให้เป็นกลาง (7.0) โดยใช้สารละลาย โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์

3.4.4 ใช้น้ำยาตรวจสอบข้าวเก่าแบบที่ 1 จากข้อ 3.4.3 ตรวจสอบข้าวทั้งสองกลุ่ม (จากข้อ 3.4.2) ทุก 2 สัปดาห์ ติดต่อกันเป็นเวลา 6 เดือน โดยนำข้าว 10 กรัม ใส่หลอดทดลอง จากนั้นเติมน้ำยาทดสอบลงไป 20 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 5 นาที แล้วนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 615 nm และวัดอีกครั้งที่ความยาวคลื่น 690 nm แล้วหาค่าความต่าง

3.4.5 ใช้น้ำยาตรวจสอบข้าวเก่าแบบที่ 1 ทดสอบในระดับเมล็ดเดี่ยว (single grain) ทำการตรวจสอบทุก 2 สัปดาห์ ติดต่อกันเป็นระยะเวลา 6 เดือน เช่นเดียวกันข้อ(3.4.2) โดยสุ่มตัวอย่างเมล็ดข้าวมาอย่างน้อย 96 เมล็ด ใส่ใน micro-plate เติมน้ำยาตรวจสอบแบบที่ 1 และทิ้งไว้ 5 นาที สังเกตสีด้วยตา แล้ววัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง micro-plate reader

3.4.6 คำนวณค่าดัชนีความใหม่-เก่าของข้าวจากการใช้วิธีการตรวจสอบแบบที่ 1 ตามสมการต่อไปนี้

$$\text{Fresh-aged rice index (Method 1)} = A_{615\ nm} - A_{690\ nm} \qquad (3.1)$$

โดย $A_{615\ nm}$ = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 615 nm

$A_{690\ nm}$ = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 690 nm

3.4.7 ใช้วิธีการแบบที่ 2 (Method 2) ในการทดสอบความใหม่-เก่าของข้าว โดยเตรียมน้ำยาสำหรับตรวจวัดกิจกรรมของเอ็นไซม์เพอร์ออกซิเดส ซึ่งประกอบด้วยสารละลายผสมระหว่าง dianisidine (ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตรใน ethyl alcohol) guaiacol (ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตรใน ethyl alcohol) และ H_2O_2 (ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตรใน ethyl alcohol) ตามวิธีที่ได้อธิบายไว้โดย Chen and Chen (2003) ทำการตรวจสอบทุก 2 สัปดาห์ ติดต่อกันเป็นเวลา 6 เดือน โดยนำข้าว 2.5 กรัม ใส่หลอดทดลอง จากนั้นเติมสารละลาย dianisidine ลงไป 1.5 มิลลิลิตร guaiacol 2 มิลลิลิตร และ H_2O_2 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ให้เกิดสีที่ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6 นาที แล้วนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 385 nm

3.4.8 ใช้น้ำยาตรวจสอบข้าวเก่าแบบที่ 2 ทดสอบในระดับเมล็ดเดี่ยว (single grain) ทำการตรวจสอบทุก 2 สัปดาห์ ติดต่อกันเป็นระยะเวลา 6 เดือน เช่นเดียวกับข้อ(3.4.7) โดยสุ่มตัวอย่างเมล็ดข้าวมา 96 เมล็ด ใส่ใน micro-plate เติมน้ำยาตรวจสอบแบบที่ 2 ลงไป 150 ไมโครลิตรต่อหลุม ซึ่งประกอบด้วย dianisidine 63.4 ไมโครลิตร guaiacol 84.5 ไมโครลิตร และ H_2O_2 2.1 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ให้เกิดสีที่ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6 นาที สังเกตด้วยตา แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่อง micro-plate reader ที่ความยาวคลื่น 385 nm

3.4.9 คำนวณค่าดัชนีความใหม่-เก่าของข้าวจากการใช้วิธีการตรวจสอบแบบที่ 2 ตามสมการต่อไปนี้

$$\text{Fresh-aged rice index (Method 2)} = 1/A_{385\ nm} \qquad (3.2)$$

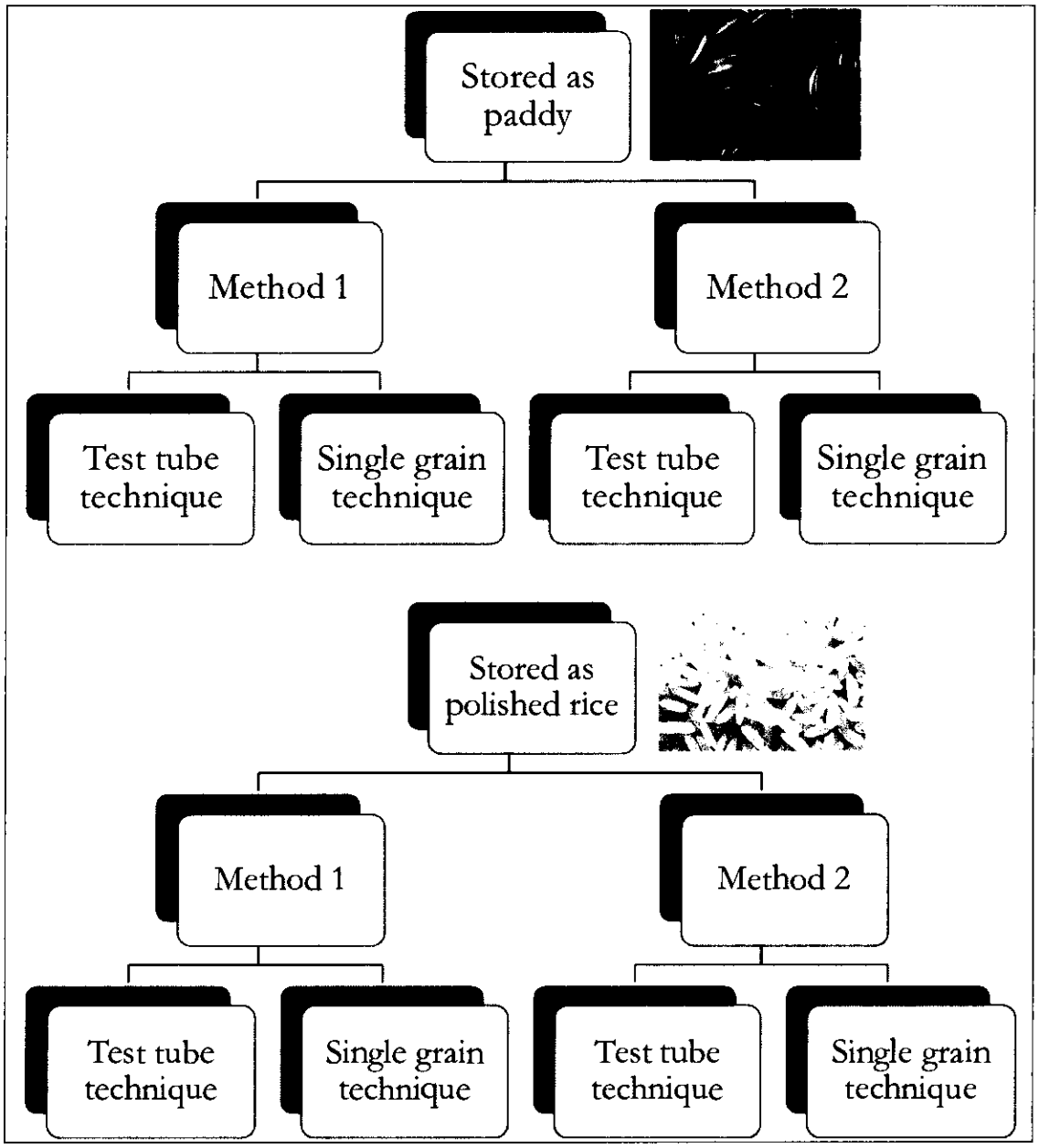
โดย $A_{385\ nm}$ = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 385 nm

3.4.10 นำค่าดัชนีความใหม่-เก่าของข้าวไปจัดทำเป็นกราฟเส้นตรง จากนั้นวิเคราะห์หาสมการถดถอยเชิงเส้น โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Microsoft Excel version 2007

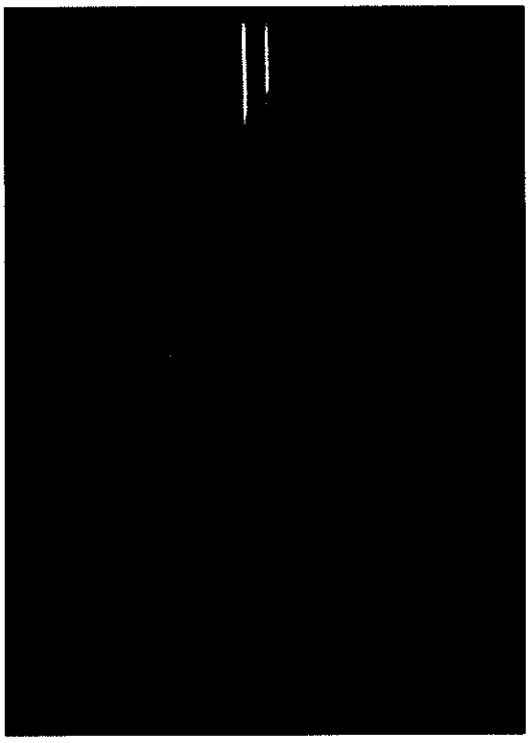
3.4.11 ถ่ายภาพผลการทดสอบ ทั้งในส่วนของการใช้น้ำยาตรวจสอบแบบที่ 1 และแบบที่ 2 ทั้งในระดับหลอดทดลอง และในระดับเมล็ดเดี่ยว จากนั้นทำการวิเคราะห์ภาพเพื่อหาความเข้มสีและค่าสี โดยการใช้โปรแกรมวิเคราะห์ภาพ ImageJ (วิธีการวิเคราะห์แสดงไว้ในภาคผนวก ก.) (Sheffield, 2007)

3.4.12 วิเคราะห์ผลที่ได้ เพื่อประเมินศักยภาพในการนำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรม

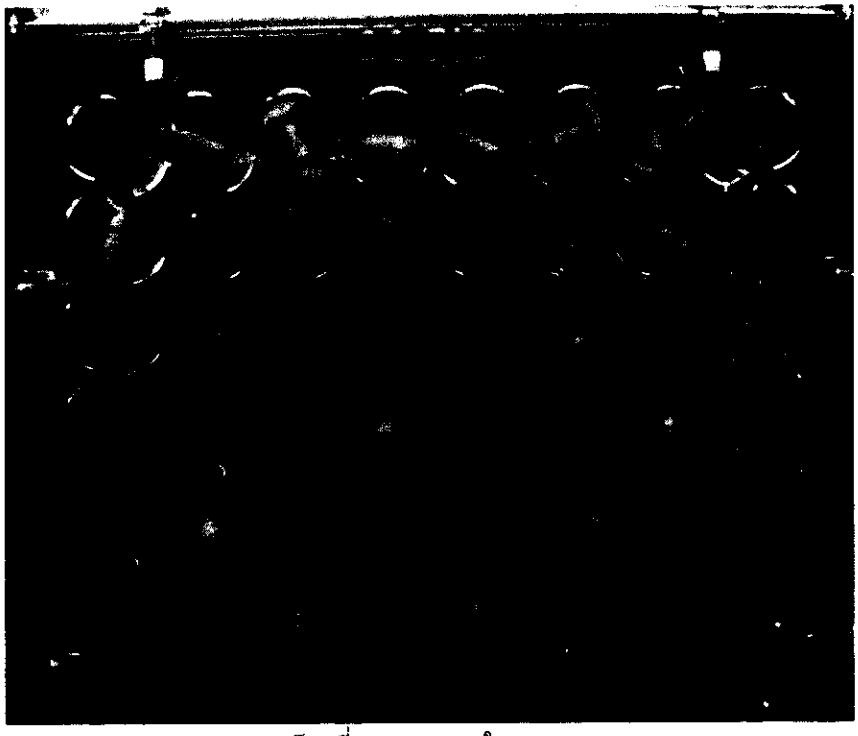
เพื่อให้เข้าใจภาพรวมของการวิเคราะห์ได้ดีขึ้น ภาพที่ 3.1 แสดงขั้นตอนการดำเนินงานวิจัยทั้งหมด และในส่วนของภาพที่ 3.2 แสดงตัวอย่างการตรวจสอบในระดับหลอดทดลองและระดับเมล็ดเดี่ยว



ภาพที่ 3.1 ขั้นตอนการดำเนินการวิจัยในภาพรวม



แบบหลอดทดลอง



แบบเมล็ดเดี่ยว ทดสอบใน micro-well

ภาพที่ 3.2 ลักษณะการตรวจสอบในหลอดทดลองและในระดับเมล็ดเดี่ยว