บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ของ HEWLETT PACKARD
2. เครื่องไฮเพอร์ฟอร์มานลิควิด โครมาโตกราฟี (High Performance Liquid Chromatography) ของ Waters ประกอบด้วย
   - 2.1 เครื่องกำจัดฟองก๊าซ (Waters In-Line Degasser AF)
   - 2.2 ปั๊มความดันสูง (Waters 600 Pump)
   - 2.3 เครื่องควบคุมการทำงานของปั๊ม (Waters 600 Controller)
   - 2.4 ดีเทคเตอร์ (Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector)
   - 2.5 คอมพิวเตอร์ (Compaq)
   - 2.6 คอลัมน์ (Nova-Pak C18, 60°A, 4μm, 3.9 x 300 มิลลิเมตร ของ Waters
   - 2.7 พรีคอลัมน์ (Nova-Pak 4μm, 60°A, C18 Guard-Pak Inserts ของ Waters)
   - 2.8 กระดาษกรองตัวทำละลายเคลื่อนที่ (PTFE Membrane 0.45μm, 47 มิลลิเมตร ของ Waters)
   - 2.9 ไซริง ฟิลเตอร์(Disposable Syringe Filter, PTFE, 13 มิลลิเมตร, 0.45 ไมโครเมตร ของ Chrom Tech)
   - 2.10 Manual Injector ขนาด 20 ไมโครลิตร ของ Rheodyne 7725i
3. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ของ KUBOTA 1120
4. เครื่องระเหยสูญญากาศ ชนิดหมุน (Rotary Evaporator) ของ EYELA
5. เครื่อง Vortex
6. เครื่องดูดสูญญากาศ (Vacuum Pump) ของ GAST
7. เครื่องปั่น (Blender)
8. กรวยแยก (Separatory Funnel) ขนาด 500 มิลลิลิตร
9. กรวยบุชเนอร์ (Buchner Funnel)
10. ฟิลเตอร์ฟลาส (Filter Flask) ขนาด 500 มิลลิลิตร
11. คอลัมน์แก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร ยาว 30 เซนติเมตร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

12. กระดาษกรอง (Whatman Filter Paper ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 125 มิลลิเมตร)

13. กระบอกฉีดยาปราศจากเชื้อแบบใช้ครั้งเดียว (Syringe) ขนาด 10 มิลลิลิตร ของ NIPRO

14. Autopipette ขนาด 100-1000 ไมโครลิตร ของ Eppendrof

ขนาด 20-200 ไมโครลิตร ของ Nichiryo

ขนาด 1000-5000 ไมโครลิตร ของ BIO-RAD

15. เข็มฉีดยาแบบปราศจากเชื้อ ขนาด 21G x 1.5 นิ้ว (0.8x40 มิลลิเมตร) ของ NIPRO

16. ถุงมือยางสำหรับตรวจโรค ของ Sempermade

17. จักรยานวัดงาน (Ergometer Bicycle) ของ Monark

18. นาฬิกาจับเวลา (Stop Watch)

19. เครื่องกำกับจังหวะ (Metronome)

20. เครื่องวัดความดัน (Auto Blood Pressure Monitor T8 Model) ของ Omron

21. เครื่องวัดอัตราการเต้นของหัวใจ (Polar IR Interface Required for Computer Communication)

สารเคมี

1. เฮกเซน (Hexane) AR Grade ของ J.T. Baker

2. อะซิโตน (Acetone) AR Grade ของ Fisher Chemicals

3. 1,1- ไดฟีนิล-2-ไพคริลไฮดราซิล (1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl (DPPH)) ของ SIGMA

4. ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane) HPLC Grade ของ Fisher Chemicals

5. เมธานอล (Methanol) HPLC Grade ของ LAB-SCAN

6. อะซิโตไนไตร์ (Acetonitile) HPLC Grade ของ LAB-SCAN

7. เมธานอล (Methanol) AR Grade ของ LAB-SCAN

8. วิตามินเออะซิเตท (All Trans-Retinol Acetate) ของ SIGMA

9 วิตามินอีอะซิเตท (DL-α-Tocopherol Acetate) ของ SIGMA

10. เบตา-แคโรทีน ของ SIGMA

11. ลูทีน (Xanthophyll (Lutein; α-Carotene-3, 3'-Diol)) ของ SIGMA

12. ปิโตรเลียมอีเทอร์ (Petroleum Ether) AR Grade ของ J.T. Baker

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

13. โปแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (Potassium Hydroxide) ของ BDH
14. โพรพิลแกลเลท (Propyl Gallate) ของ Fluka
15. โซเดียมซัลเฟตคริสตัล (Sodium Sulphate Crystals) ของ CARLO ERBA
16. ไฮโฟล์ซูเปอร์เซล (Hyflo Super Cel)) ของ Fluka
17. แมกนีเซียมออกไซด์ (Magnesium Oxide) ของ Merck
18. เอทิลแอลกอฮอล์ (Ethyl Alcohol Absolute) AR Grade ของ CARLO ERBA

วิธีดำเนินการ

1. การเก็บตัวอย่างเลือดจากกลุ่มตัวอย่าง

1.1 กลุ่มตัวอย่าง ในการวิจัยนี้ใช้กลุ่มตัวอย่างนิสิตเพศชายของมหาวิทยาลัยบูรพา จำนวน 38 คน อายุระหว่าง 22-26 ปี โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มตัวอย่างที่ออกกำลังกายประจำ 20 คน ซึ่งเป็นกลุ่มที่ออกกำลังกายอยู่ระหว่าง 3- 5 วัน/สัปดาห์ และกลุ่มตัวอย่างที่ไม่ได้ออกกำลังกายประจำ 18 คน ซึ่งเป็นกลุ่มที่ออกกำลังกายน้อยกว่า 3 วัน/สัปดาห์ โดยกลุ่มตัวอย่างทุกคนมีสุขภาพแข็งแรงและไม่มีโรคประจำตัว รวมทั้งงดเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ 1 สัปดาห์ก่อนการเก็บตัวอย่าง (ภาคผนวก ก) ในการทำวิจัยครั้งนี้ได้ผ่านการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย มหาวิทยาลัยบูรพา เมื่อวันที่ 3 สิงหาคม พ.ศ. 2548

1.2 การประเมินภาวะโภชนาการก่อนเก็บตัวอย่างเลือด (Dietary Assessment) ทำการสำรวจปริมาณและชนิดของอาหารที่กลุ่มตัวอย่างรับประทานภายใน 24 ชั่วโมง (24-Hour Recall) ก่อนทำการเก็บตัวอย่างเลือด 2 วัน รวมทั้งสำรวจความถี่และชนิดอาหารที่กลุ่มตัวอย่างรับประทานในเวลา 1 เดือน (Food Frequency) ก่อนเข้าร่วมงานวิจัย (ภาคผนวก ก) ชั่งน้ำหนักและวัดส่วนสูงของกลุ่มตัวอย่างก่อนการออกกำลังกาย เพื่อใช้ในการคำนวณหาค่าดรรชนีมวลกาย (Body Mass Index, BMI) ของกลุ่มตัวอย่าง

1.3 การทดลองออกกำลังกายแบบแอโรบิค กลุ่มตัวอย่างออกกำลังกายแบบแอโรบิค โดยการปั่นจักรยานวัดงานหลังจากรับประทานอาหารมื้อสุดท้ายอย่างน้อย 3 ชั่วโมง โดยเริ่มจากการอบอุ่นร่างกายที่ความหนัก 50% ของอัตราการเต้นหัวใจสูงสุด นาน 3 นาที จากนั้นเพิ่มความหนักเป็น 60-70% ของอัตราการเต้นหัวใจสูงสุด นาน 10 นาที และลดความหนักเป็น 50-60% ของอัตราการเต้นหัวใจสูงสุด จนครบ 30 นาที (Burke, 1998)

1.4 การเก็บตัวอย่างเลือด เก็บตัวอย่างเลือดจากกลุ่มตัวอย่างทั้งก่อนและหลังการออกกำลังกายปริมาตร 10 มิลลิลิตร เก็บเลือดที่ได้ในหลอดทดลองหุ้มฟอยด์เพื่อป้องการไม่ให้สารต้าน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

อนุมูลอิสระถูกทำลายด้วยแสง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เพื่อแยกเก็บซีรัม โดยซีรัมที่ได้เก็บในหลอดหุ้มฟอยด์ในตู้ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์ (Yakushina & Taranova, 1995)

2. การวิเคราะห์ปริมาณและชนิดของสารต้านอนุมูลอิสระในซีรัม โดยวิธี Spectrophotometry

2.1 การหาเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาในการหาระดับสารต้านอนุมูลอิสระในซีรัมด้วย DPPH ใช้สารละลาย 1 x 10^{-4} โมลาร์ DPPH [1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl] 1500 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยากับซีรัม 100 ไมโครลิตร และ 0.1 โมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 5.6 100 ไมโครลิตร นำไป Vortex นาน 1 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เพื่อแยกตะกอนโปรตีนออก ดูดส่วนใสไปวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ที่เวลาต่าง ๆ เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสงเมื่อเวลานานขึ้น โดยเปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของคอนโทรล (Swatsitang, 2003)

2.2 การหาระดับสารต้านอนุมูลอิสระทั้งหมดในซีรัมด้วย DPPH ใช้ซีรัมที่เก็บจากกลุ่มตัวอย่าง 100 ไมโครลิตร ในการหาระดับสารต้านอนุมูลอิสระในซีรัม โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ที่เวลา 10 นาทีหลังจากใส่ซีรัม ตามที่ได้จากข้อ 2.1 ใช้วิตามินซี เป็นตัวแทนของสารต้านอนุมูลอิสระในการทำกราฟมาตรฐาน (Standard Curve) เพื่อใช้ในการหาความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระ (ตารางภาคผนวก ค-1)

3. การหาปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมดในซีรัม ตกตะกอนโปรตีนในซีรัม โดยใช้ซีรัม 600 ไมโครลิตร เติม 15% โปแทสเซียมไฮดรอกไซด์ในเอธานอล 600 ไมโครลิตร เพื่อตกตะกอนโปรตีนและกำจัดกรดไขมันออกจากซีรัม นำไป Vortex นาน 10 นาที จากนั้นเติมเฮกเซน 1200 ไมโครลิตร เพื่อสกัดแคโรทีนอยด์ทั้งหมดในซีรัม นำไป Vortex นาน 10 นาที และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บชั้นเฮกเซนปริมาตร 1000 ไมโครลิตร ซึ่งอยู่ชั้นบนของหลอด นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร หาความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ทั้งหมดในซีรัมโดยใช้ค่า Extinction Coefficient (E1%, 1cm) ของแคโรทีนอยด์ในเฮกเซนซึ่งเท่ากับ 2500 (Dawson, Elliott, Elliott, & Jones, 1969)

4. การหาปริมาณของเบตา-แคโรทีน เบตา-คริพโทแซนทีน ลูทีน ไลโคพีน วิตามินอี และวิตามินเอ ในซีรัมโดยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์มานลิควิด โครมาโตกราฟี (HPLC)

4.1 การหาค่ารีเทนชันไทม์ของสารมาตรฐานในกลุ่มแคโรทีนอยด์ โดยใช้สารละลายมาตรฐานเบตา-แคโรทีนและลูทีนของ SIGMA สารละลายมาตรฐานไลโคพีนได้จากการสกัด

มะเขือเทศและสารละลายมาตรฐานเบตา-คริพโทแซนทีนได้จากการสกัดมะละกอพันธุ์พื้นเมือง (ภาคผนวก ค) วิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ซึ่งประกอบด้วย Manual Injector ขนาด 20 ไมโครลิตร ของ Rheodyne 7725i คอลัมน์ Nova-Pak C18, 4 ไมโครเมตร ขนาด 3.9 x 300 มิลลิเมตร และดีเทคเตอร์ Dual λ Absorbance Detector ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร (Single Wavelength) โดยตัวทำละลายเคลื่อนที่ (Mobile Phase) ที่ใช้ประกอบด้วย อะซิโตไนไตร์: ไดคลอโรมีเทน: เมธานอล (75: 15: 10) กรองตัวทำละลายเคลื่อนที่ผ่าน PTFE Membrane 0.45 ไมโครเมตร 47 มิลลิเมตร อัตราการไหล (Flow Rate) ของตัวทำละลายเคลื่อนที่ขณะวิเคราะห์คือ 1.0 มิลลิลิตร/นาที (Yakushina & Taranova, 1995)

4.2 การหาค่ารีเทนชันไทม์ของสารมาตรฐานในกลุ่มวิตามิน โดยใช้วิตามินอีอะซิเตท (DL-α-Tocopherol Acetate) และวิตามินเออะซิเตท (All Trans-Retinol Acetate) ของ SIGMA และทำการกำจัดอะซิเตทออก โดยวิธี Saponification จะได้ DL-α-Tocopherol และ All Trans-Retinol นำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC โดยใช้สภาวะเดียวกับการวิเคราะห์หาค่ารีเทนชันไทม์ของสารมาตรฐานกลุ่มแคโรทีนอยด์ แต่เปลี่ยนการวัดค่าการดูดกลืนแสงเป็นความยาวคลื่น 292 นาโนเมตร สำหรับวิตามินอี และความยาวคลื่น 325 นาโนเมตร สำหรับวิตามินเอ โดยใช้ดีเทคเตอร์ Dual λ Absorbance Detector ในรูปแบบที่เป็น Dual Wavelength ซึ่งสามารถทราบค่ารีเทนชันไทม์ของวิตามินทั้งสองตัวได้พร้อมกันในการฉีดเพียงครั้งเดียว (Yakushina & Taranova, 1995)

4.3 การเตรียมซีรัมและการวิเคราะห์ซีรัมด้วย HPLC สกัดสารที่จะวิเคราะห์จากซีรัม โดยใช้ซีรัม 1200 ไมโครลิตร เติม 15% โปแทสเซียมไฮดรอกไซด์ในเอธานอล 1200 ไมโครลิตร นำไป Vortex นาน 10 นาที เติมเฮกเซน 2400 ไมโครลิตร นำไป Vortex นาน 10 นาที และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บชั้นเฮกเซนปริมาตร 2000 ไมโครลิตร นำไประเหยแห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน จากนั้นนำไปละลายด้วยตัวทำละลายเคลื่อนที่ (Mobile Phase) 200 ไมโครลิตร และฉีดเข้า HPLC เพื่อวิเคราะห์หา แคโรทีนอยด์และวิตามินในซีรัม โดยแยกฉีดเป็นสองครั้ง ในการฉีดครั้งแรกจะเป็นการวิเคราะห์หาสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ซึ่งดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ส่วนในครั้งที่สองจะเป็นการวิเคราะห์หาวิตามินอี และวิตามินเอ ซึ่งดูดกลืนแสงที่ 292 นาโนเมตร และ 325 นาโนเมตร โดยจะใช้สภาวะเดียวกับการหาค่ารีเทนชันไทม์ของสารมาตรฐานนั้น ๆ (Yakushina & Taranova, 1995) คำนวณหาความเข้มข้นของสารแต่ละตัวจากกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐาน แต่ละตัวที่ฉีดเข้า HPLC (ภาคผนวก ค)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

1. การเปรียบเทียบค่าภายในกลุ่มตัวอย่าง โดยการเปรียบเทียบความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระในซีรัม แคโรทีนอยด์ทั้งหมดในซีรัม เบตา-แคโรทีน เบตา-คริพโทแซนทีน ลูทีน ไลโคพีน วิตามินอี และ วิตามินเอในซีรัม ก่อนการออกกำลังกายและหลังการออกกำลังกายภายในกลุ่มตัวอย่างเดียวกัน โดยวิธี Paired Sample T-Test ซึ่งใช้โปรแกรม SPSS Version 11.5 ในการวิเคราะห์ (กัลยา วานิชย์บรรชา, 2548)

2. การเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของสารต้านอนุมูลอิสระในซีรัม แคโรทีนอยด์ทั้งหมดในซีรัม เบตา-แคโรทีน เบตา-คริพโทแซนทีน ลูทีน ไลโคพีน วิตามินอีและวิตามินเอในซีรัม ก่อนและหลังการออกกำลังกายระหว่างกลุ่มตัวอย่าง โดยวิธี Independent Sample T-Test ของโปรแกรม SPSS Version 11.5 ในการวิเคราะห์ (กัลยา วานิชย์บรรชา, 2548)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University