# บทที่ 3
# วิธีการดำเนินการวิจัย

การศึกษาลักษณะทางกายภาพและคุณค่าทางอาหารของเมล็ดบัวสาย (Nymphaea lotus Linn.) จากอำเภอปากพนัง จังหวัดนครศรีธรรมราชในครั้งนี้ มีการกำหนดประชากรและกลุ่มตัวอย่าง การกำหนดตัวแปรที่ศึกษา วางแผนศึกษาลักษณะทางกายภาพและวิเคราะห์คุณค่าทางอาหาร วิธีการศึกษาลักษณะทางกายภาพและวิธีวิเคราะห์คุณค่าทางอาหาร การเก็บรวบรวมข้อมูล และวิธีการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติดังนี้

## การกำหนดประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

ประชากรที่ทำการศึกษาครั้งนี้เป็นเมล็ดบัวสายในอำเภอปากพนัง จังหวัดนครศรีธรรมราช โดยทำการศึกษา 3 กลุ่มตัวอย่างคือ ตัวอย่างที่ 1 เมล็ดบัวสายจากบัวสายดอกสีขาวปนชมพูที่ได้จากบ่อปลูก บ้านเลขที่ 59 หมู่ที่ 8 ตำบลปากแพรก ตัวอย่างที่ 2 เมล็ดบัวสายจากบัวสายดอกสีขาวปนชมพูที่ได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติ หมู่ที่ 8 ตำบลปากแพรก และตัวอย่างที่ 3 เมล็ดบัวสายจากบัวสายดอกสีม่วงปนชมพูที่ได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติ หมู่ที่ 4 ตำบลขนาบนาก อำเภอปากพนัง จังหวัดนครศรีธรรมราช ซึ่งเมล็ดบัวสายทั้ง 3 กลุ่มเป็นผลผลิตในปี 2552-2553

## การกำหนดตัวแปรที่ศึกษา

ตัวแปรที่ใช้ในการศึกษาวิจัยแบ่งเป็น 3 กลุ่มคือ

1. ตัวแปรอิสระ (independent variables) ได้แก่ ชนิดและแหล่งที่มาของเมล็ดบัวสาย
2. ตัวแปรตาม (dependent variables) ได้แก่ ลักษณะทางกายภาพ สี ขนาด และการพองตัว ปริมาณพลังงานรวม ความชื้น โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต เยื่อใย เถ้า แคลเซียม ฟอสฟอรัส และเหล็ก ของเมล็ดบัวสาย
3. ตัวแปรควบคุม (control variable) ได้แก่ ช่วงอายุของเมล็ดบัวสาย ปี 2552 จากอำเภอปากพนัง จังหวัดนครศรีธรรมราช

## การวางแผนศึกษาลักษณะทางกายภาพและวิเคราะห์คุณค่าทางอาหารของเมล็ดบัวสาย

### 1. การวางแผนศึกษาลักษณะทางกายภาพของเมล็ดบัวสาย

การศึกษาลักษณะทางกายภาพของเมล็ดบัวสาย จะศึกษาสี ขนาด และการพองตัวในน้ำที่อุณหภูมิห้องและที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส โดยวางแผนการวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพของเมล็ดบัวสาย ดังแสดงในภาพที่ 25

- เมล็ดบัวสายดอกสีขาวปนชมพูจากบ่อปลูก กำหนดให้เป็นตัวอย่างที่ 1 (T1)
- เมล็ดบัวสายดอกสีขาวปนชมพูจากแหล่งน้ำธรรมชาติ กำหนดให้เป็นตัวอย่างที่ 2 (T2)
- เมล็ดบัวสายดอกสีชมพูม่วงปนขาวจากแหล่งน้ำธรรมชาติ กำหนดให้เป็นตัวอย่างที่ 1 (T3)

→ สีของเมล็ดบัวสาย ด้วย colorimeter โดยการวัดค่าความสว่าง (L*), ค่าความเป็นสีแดง (a*) และค่าความเป็นสีเหลือง (b*)

→ ขนาดของเมล็ดบัวสาย ด้วยตะแกรงร่อนขนาด 1 มิลลิเมตร

→ การพองตัวในน้ำที่อุณหภูมิห้อง โดยชั่งน้ำหนักก่อนและหลังการแช่น้ำที่อุณหภูมิห้อง

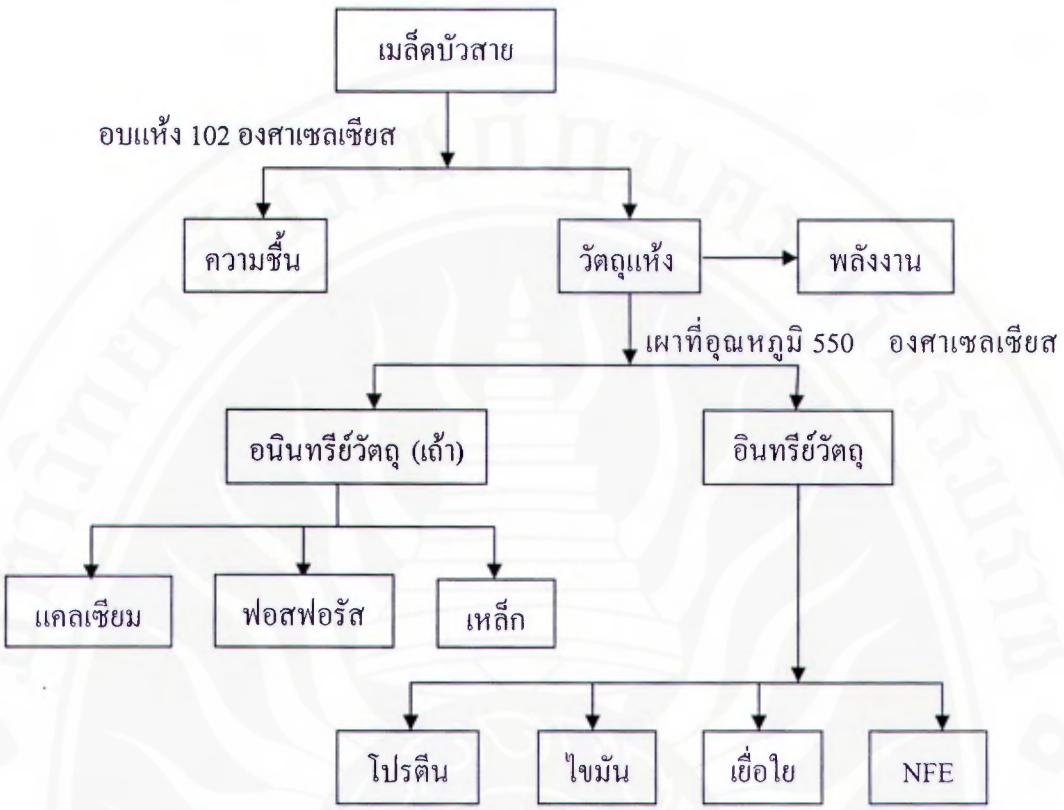
→ การพองตัวในน้ำที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส (สุก) โดยชั่งน้ำหนักก่อนและหลังการต้มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส

→ บันทึก วิเคราะห์ และสรุปผลการศึกษาเมล็ดบัวสาย

ภาพที่ 25 การวางแผนศึกษาลักษณะทางกายภาพของเมล็ดบัวสาย

### 2. การวางแผนวิเคราะห์คุณค่าทางอาหารของเมล็ดบัวสาย

การวิจัยนี้ได้กำหนดแผนวิเคราะห์คุณค่าทางอาหารของเมล็ดบัวสายด้วยวิธี proximate analysis วิเคราะห์พลังงานของเมล็ดบัวสายด้วย bomb calorimeter ยี่ห้อ gallenkamp รุ่น cab 101.ab1.c วิเคราะห์แร่ธาตุแคลเซียมและเหล็ก โดยดัดแปลงจากวิธี official method 927.02 (AOAC 2000) ด้วยเครื่อง atomic absorption spectrophotometer (AAS) ยี่ห้อ perkin elmer รุ่น 3110 และวิเคราะห์ฟอสฟอรัส ด้วย spectrophotometer ยี่ห้อ perkin elmer รุ่น landa 12 ตัวอย่างละ 5 ซ้ำ มีแผนการวิเคราะห์คุณค่าทางอาหารของเมล็ดบัวสายแผน ดังแสดงในภาพที่ 26




ภาพที่ 26 แสดงแผนการวิเคราะห์คุณค่าทางอาหารของเมล็ดบัวสาย

## วิธีการศึกษาลักษณะทางกายภาพและวิเคราะห์คุณค่าทางอาหารของเมล็ดบัวสาย

**1. การศึกษาลักษณะทางกายภาพของเมล็ดบัวสาย**

1.1 เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษาลักษณะทางกายภาพ ได้แก่

1.1.1 เครื่องวัดสี colorimeter ยี่ห้อ Hunter lab รุ่น color flex 45/0

1.1.2 ตะแกรงร่อน (testinกรัม sieve) ยี่ห้อ W.S. Tyler ขนาด 1 มิลลิเมตร

1.1.3 เตาไฟฟ้า (hot plate & stirrer) ยี่ห้อ Jenway รุ่น 1203

1.1.4 เครื่องชั่งไฟฟ้า (balance) ยี่ห้อ Sartorius รุ่น BP 210S

1.1.5 เครื่องแก้ว

1.2 วิธีการศึกษาลักษณะทางกายภาพของเมล็ดบัวสาย

1.2.1 สี มีขั้นตอนการวัดค่าสีของเมล็ดบัวสายแสดงดังภาพที่ 27 โดยใช้เครื่อง colorimeter ยี่ห้อ Hunter lab รุ่น color flex 45/0 แสดงดังภาพที่ 28 ใช้ระบบ CIE L* a* b* เริ่มต้นด้วยการปรับมาตรฐานเครื่อง (calibration) โดยใช้แผ่นเทียบมาตรฐานสีดำและสีขาว ภายใต้สภาวะที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางของ port size เท่ากับ 0.50 นิ้ว ค่าองศาการมอง (observer) เท่ากับ 10 องศา

แหล่งกำเนิดแสง (illumination) คือ $D_{65}$ ซึ่งเป็นหลอดไฟที่ใช้แทนแสงธรรมชาติตอนเที่ยงวัน (noon daylกรัมht) จากนั้นบรรจุเมล็ดบัวสายลงในภาชนะแก้วใส (glass sample cup หรือ petri dish) ขนาด 2.5 นิ้ว หนา 10 มิลลิเมตร วางแผ่นดิสก์เคลือบสีขาวปิดทับให้ผิวหน้าตัวอย่างเรียบเสมอกัน เพื่อให้การสะท้อนแสงชัดเจน แล้วจึงวางภาชนะแก้วใสที่บรรจุเมล็ดบัวสายลงบนเครื่อง ครอบด้วยภาชนะทึบแสงเพื่อป้องกันแสงจากภายนอก กดปุ่มทำงาน แล้วจึงอ่านค่า L* (lightness), a* (redness-greenness) และ b* (yellowness-blueness) (เฉลิมชัย ประเวศตระกูลชัย, 2553) บันทึกผล จากจอแสดงผล ตัวอย่างละ 5 ซ้ำ

เปิดเครื่องวัดค่าสี

↓

ปรับมาตรฐานเครื่อง โดยใช้แผ่นเทียบมาตรฐานสีดำและสีขาว

↓

บรรจุเมล็ดบัวสายลงในภาชนะแก้วใส ขนาด 2.5 นิ้ว หนา 10 มิลลิเมตร
เกลี่ยให้ผิวหน้าตัวอย่างเรียบเสมอกัน ปิดด้วยแผ่นดิสก์เคลือบสีขาว ครอบด้วยภาชนะทึบแสง

↓

กดปุ่มให้เครื่องทำงาน

↓

อ่านค่า L*, a* และ b*

↓

บันทึกผลจากจอแสดงผล

ภาพที่ 27 ขั้นตอนการวัดค่าสีของเมล็ดบัวสาย

ภาพที่ 28 เครื่อง colorimeter ยี่ห้อ Hunter lab รุ่น color flex 45/0

1.2.2 ขนาด มีขั้นตอนการวัดขนาดของเมล็ดบัวสาย แสดงดังภาพที่ 29 เนื่องจากเมล็ดบัวสายมีขนาดเล็กมาก จึงใช้วิธีการวัดขนาดโดยการร่อนเมล็ดผ่านตะแกรงร่อนมาตรฐานที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรูเท่ากับ 1 มิลลิเมตร แสดงดังภาพที่ 30 เพื่อคำนวณหาค่าร้อยละของน้ำหนักเมล็ดบัวสายที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเมล็ดโตกว่า 1 มิลลิเมตร โดยการชั่งเมล็ดบัวสาย 1 กรัม ใส่ลงในตะแกรงขนาด 1 มิลลิเมตร เขย่าตะแกรงให้เมล็ดบัวสายที่มีขนาดเล็กกว่า 1 มิลลิเมตร ลอดผ่านลงไปในภาชนะที่รองรับ ชั่งน้ำหนักของเมล็ดบัวสายที่เหลือค้างอยู่บนตะแกรง ตัวอย่างละ 5 ซ้ำ นำมาคำนวณหาค่าร้อยละของน้ำหนักของเมล็ดบัวสายที่มีขนาดโตกว่า 1 มิลลิเมตร โดยใช้สูตร

$$\text{ร้อยละของน้ำหนักของเมล็ดบัวสายที่มีขนาดโตกว่า 1 มิลลิเมตร} = \frac{M1 - M2}{M1} \times 100$$

เมื่อ M1 = น้ำหนักของเมล็ดบัวสายทั้งหมด

M2 = น้ำหนักของเมล็ดบัวสายที่ลอดผ่านตะแกรง

ชั่งเมล็ดบัวสาย 1 กรัม

↓

ใส่ลงในตะแกรงที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางรูขนาด 1 มิลลิเมตร เขย่าตะแกรง

↓

ชั่งน้ำหนักของเมล็ดบัวสายที่ลอดผ่านตะแกรง

↓

บันทึกผลและคำนวณหาร้อยละของน้ำหนักของเมล็ดบัวสายที่มีขนาดโตกว่า 1 มิลลิเมตร

ภาพที่ 29 ขั้นตอนการวัดขนาดของเมล็ดบัวสาย

ภาพที่ 30 ตะแกรงร่อน (sieve) ยี่ห้อ W.S. Tyler ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรู 1 มิลลิเมตร

1.2.3 การพองตัวของเมล็ดบัวสาย มีขั้นตอนการวัดการพองตัวของเมล็ดบัวสายในน้ำที่อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส แสดงดังภาพที่ 31 โดยการวัดค่าความสามารถในการอุ้มน้ำเป็นค่าร้อยละของน้ำหนักเมล็ดบัวสายที่เพิ่มขึ้นหลังแช่น้ำที่อุณหภูมิห้องและร้อยละของน้ำหนักเมล็ดบัวสายที่เพิ่มขึ้นหลังการต้มด้วยเตาไฟฟ้า ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Sathe และ Salunkhe (1981) โดยการชั่งน้ำหนักเมล็ดบัวสายแห้ง 1 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ เติมน้ำ 20 มิลลิลิตร วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 ชั่วโมง รินน้ำทิ้งโดยคว่ำบีกเกอร์บนตะแกรง เป็นเวลา 15 นาที ชั่งน้ำหนัก แสดงดังภาพที่ 32 ตัวอย่างละ 5 ซ้ำ นำค่าเฉลี่ยน้ำหนักเมล็ดบัวสายที่ได้ไปคำนวณหาร้อยละน้ำหนักเมล็ดบัวสายที่เพิ่มขึ้นหลังการแช่น้ำที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้สูตร

$$\text{ร้อยละน้ำหนักเมล็ดบัวสายที่เพิ่มขึ้นหลังการแช่น้ำที่อุณหภูมิห้อง} = \frac{M2 - M1}{M1} \times 100$$

เมื่อ M1 = น้ำหนักเมล็ดบัวสายก่อนแช่น้ำ

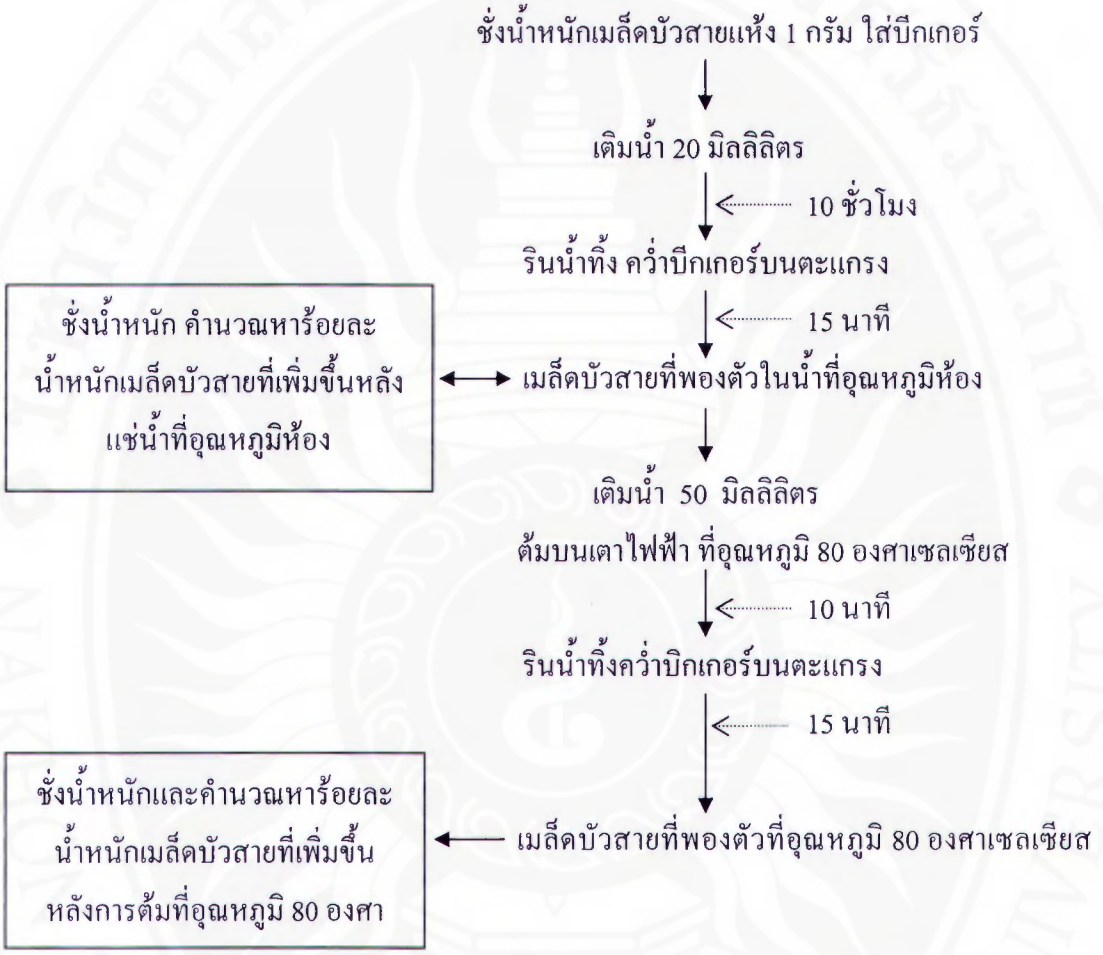
M2 = น้ำหนักเมล็ดบัวสายที่เพิ่มขึ้นหลังแช่น้ำที่อุณหภูมิห้อง

ส่วนการวิเคราะห์การพองตัวในน้ำที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นการวิเคราะห์การพองตัวภายหลังจากแช่น้ำที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 ชั่วโมง ด้วยการเติมน้ำปริมาตร 50 มิลลิลิตร ต้มบนเตาไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที รินน้ำทิ้งโดยคว่ำบีกเกอร์บนตะแกรง เป็นเวลา 15 นาที ชั่งน้ำหนัก ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างละ 5 ซ้ำ นำค่าเฉลี่ยน้ำหนักเมล็ดบัวสายที่ได้ไปคำนวณหาร้อยละน้ำหนักเมล็ดบัวสายที่เพิ่มขึ้นหลังการต้มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส โดยใช้สูตร

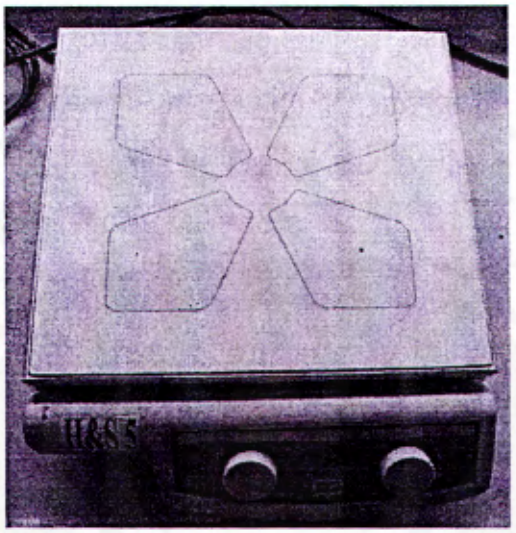
ร้อยละน้ำหนักเมล็ดบัวสายที่เพิ่มขึ้นหลังการต้มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส $= \frac{M2 - M1}{M1} \times 100$

เมื่อ M1 = น้ำหนักเมล็ดบัวสายก่อนแช่น้ำ

M2 = น้ำหนักเมล็ดบัวสายที่เพิ่มขึ้นหลังการต้มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส




ภาพที่ 31 ขั้นตอนการวัดการพองตัวของเมล็ดบัวสายในน้ำที่อุณหภูมิห้องและที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 32 เตาไฟฟ้า (hot plate & stirrer) ยี่ห้อ Jenway รุ่น 1203

**2. การวิเคราะห์คุณค่าทางอาหารของเมล็ดบัวสาย**

การวิเคราะห์คุณค่าทางอาหารของเมล็ดบัวสาย จะทำการวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณความชื้น โปรตีน ไขมัน เยื่อใย คาร์โบไฮเดรต เถ้า แคลเซียม เหล็ก ฟอสฟอรัส และพลังงานของเมล็ดบัวสาย ซึ่งใช้เครื่องมือและอุปกรณ์และวิธีการวิเคราะห์ มีรายละเอียดดังนี้

1) เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณค่าทางอาหารของเมล็ดบัวสาย

1.1) เครื่องชั่งไฟฟ้า (balance) ยี่ห้อ Sartorius รุ่น BP 210S

1.2) ตู้อบลมร้อน (hot air oven) ยี่ห้อ Mettler toledo รุ่น AT400

1.3) โถดูดความชื้น (desiccator)

1.4) เครื่องบดละเอียด (blender) ยี่ห้อ Purichawon รุ่น MC15

1.5) เตาเผา (muffle furnace) ยี่ห้อ Sartorius รุ่น cwt 1300

1.6) เตาไฟฟ้า (hot plate & stirrer) ยี่ห้อ Jenway รุ่น 1203

1.7) เครื่องย่อยโปรตีน (digestion unit) ยี่ห้อ Buchi รุ่น B-426

1.8) เครื่องกำจัดไอกรด ยี่ห้อ Velp scientifica

1.9) ตู้ควัน (super flow fume cupboard) ยี่ห้อ Major

1.10) เครื่องวิเคราะห์ไนโตรเจน (nitrogen analyzer) ยี่ห้อ Buchi รุ่น B-323

1.11) เครื่องทำความเย็น (cooling) ยี่ห้อ Scientific promotion

1.12) เครื่องสกัดไขมัน (soxhlet extraction) ยี่ห้อ Buchi รุ่น B-426

1.13) เครื่องสกัดเยื่อใย (soxhlet fiber) ยี่ห้อ Velp scientifica

1.14) เครื่องอะตอมมิกแอบซอร์พชันสเปกโทรมิเตอร์ (atomic absorption spectrophotometer หรือ AAS) ยี่ห้อ Perkin Elmer รุ่น 3110

1.15) เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ยี่ห้อ Perkin elmer รุ่น landa 12

1.16) เครื่องออโต้บอมบ์แคลอริมิเตอร์ (auto bomb calorimeter) ยี่ห้อ gallenkamp รุ่น cab 101.ab1.c

1.17) หลอดย่อย (digesting tube)

1.18) บีกเกอร์ (beaker)

1.19) ปิเปต (pipette)

1.20) ขวดชมพู่ (flask)

1.21) ภาชนะโลหะ

2) สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณค่าทางอาหารของเมล็ดบัวสาย

2.1) สารเคมีสำหรับวิเคราะห์โปรตีน ได้แก่

(1) sulfuric acid ($H_2SO_4$) conc.

(2) sodium hydroxide (NaOH) 32 %

(3) selenium mixture หรือ 5% $CuSO_4$ + 95% $K_2SO_4$

(4) boric acid ($H_3BO_3$) 2 %

(5) mixinกรัม indicator (0.2% methyl red และ 0.1% methylene blue)

(6) hydrochloric acid (HCl) 0.1 N

2.2) สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ไขมัน

(1) petroleum ether

2.3) สารเคมีสำหรับวิเคราะห์เยื่อใย

(1) $H_2SO_4$ 1.25%

(2) NaOH 1.25%

(3) acetone

2.4) สารเคมีสำหรับวิเคราะห์แคลเซียม เหล็ก และฟอสฟอรัส

(1) น้ำกลั่นที่ปราศจากไอออน (deionized water)

(2) nitric acid ($HNO_3$) 1 N

(3) nitric acid ($HNO_3$) 3 N

(4) lanthanum oxide ($La_2O_3$) 99.99 % (AAS quality)

(5) lanthanum chloride ($LaCl_3$) 1% โดยมวลต่อปริมาตร

(6) lanthanum stock solution 1,000 ไมโครกรัม

(7) สารละลายแคลเซียม (Ca) มาตรฐาน

(8) สารละลายเหล็ก (Fe) มาตรฐาน

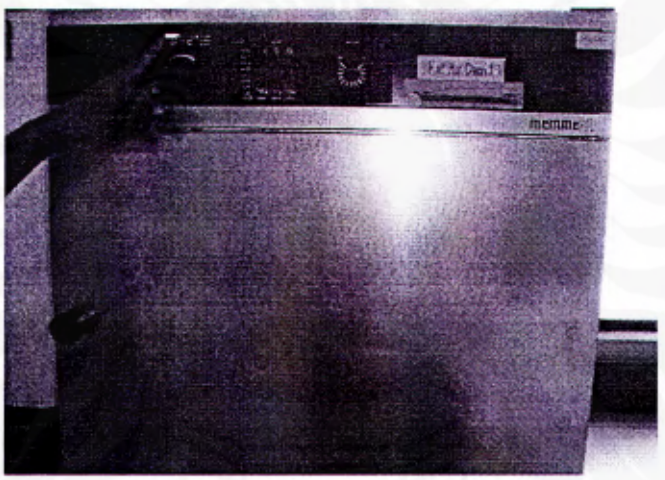
(9) สารละลาย ฟอสฟอรัส ( P) มาตรฐาน

(10) น้ำยาเบร์ยทู (Bray II)

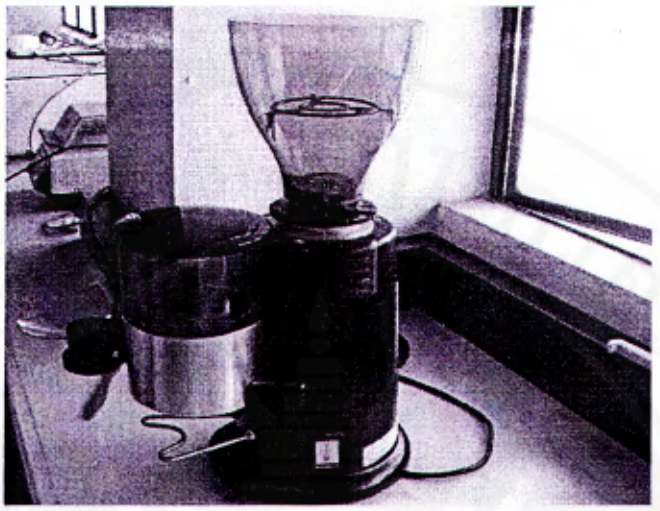
(11) กรดแอสคอร์บิค (Ascorbic acid)

3) การเตรียมตัวอย่างและการวิเคราะห์คุณค่าทางอาหารของเมล็ดบัวสาย

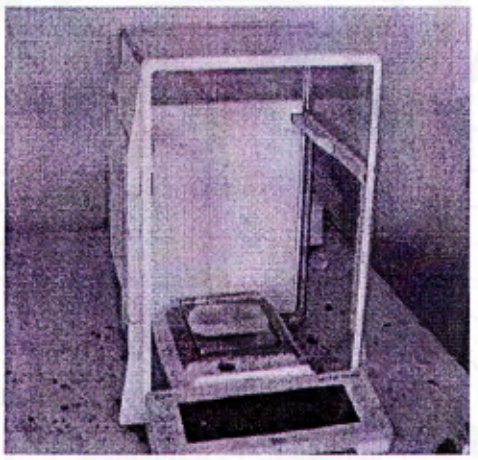
เตรียมตัวอย่างเมล็ดบัวสาย โดยการนำเมล็ดบัวสายไปอบแห้งในตู้อบลมร้อน แสดงดังภาพที่ 33 และบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดตัวอย่างดังภาพที่ 34 ชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้า ดังภาพที่ 35 นำไปอบแห้งอีกครั้งจนมีน้ำหนักคงที่ ใส่กล่องพลาสติกและเก็บไว้ในโถดูดความชื้นดังภาพที่ 36 สำหรับใช้ในการวิเคราะห์คุณค่าทางอาหารของเมล็ดบัวสายต่อไป



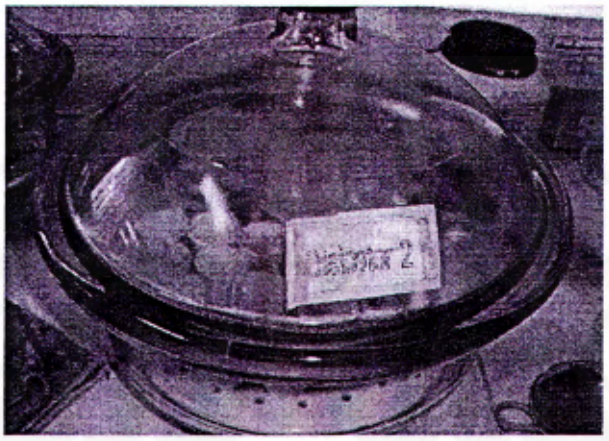
ภาพที่ 33 ตู้อบลมร้อน (hot air oven) ยี่ห้อ mettler toledo รุ่น AT400



ภาพที่ 34 เครื่องบดละเอียด (blender) ยี่ห้อ Purichawon รุ่น MC15



ภาพที่ 35 เครื่องชั่งไฟฟ้า (balance) ยี่ห้อ Sartorius รุ่น BP 210S



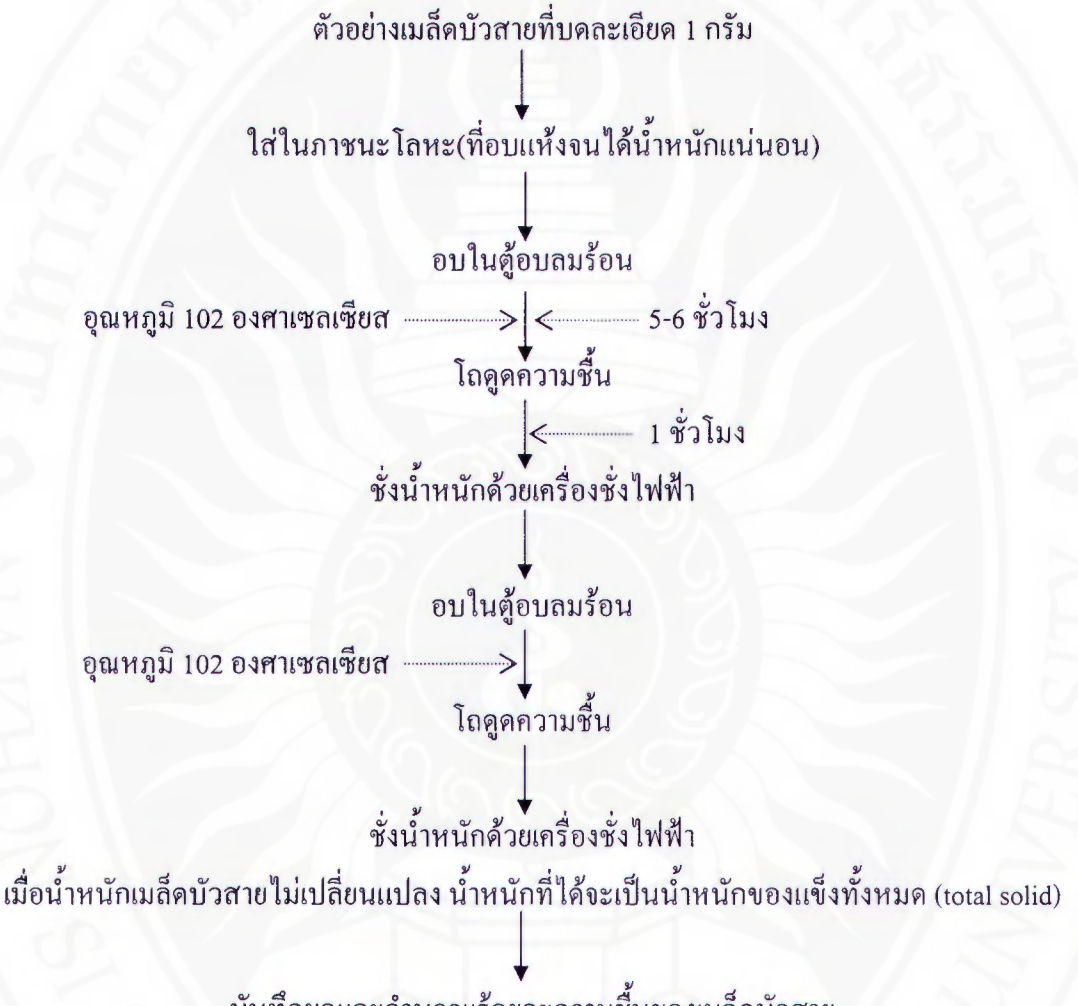
ภาพที่ 36 โถดูดความชื้น (desiccator)

(1) การวิเคราะห์ปริมาณความชื้นของเมล็ดบัวสาย โดยวิธีทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 102 องศาเซลเซียส ในตู้อบไฟฟ้า ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีมาตรฐาน official method 973.08 (AOAC, 2000) ขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณความชื้นของเมล็ดบัวสายแสดงดังภาพที่ 37 โดยการนำตัวอย่างเมล็ดบัวสายที่บดละเอียด 1 กรัมใส่ในภาชนะโลหะ (ที่อบแห้งจนได้น้ำหนักแน่นอน) ดังภาพที่ 38 อบในตู้อบลมร้อน ที่อุณหภูมิ 102 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-6 ชั่วโมง ปล่อยทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้นเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำการชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้า หลังจากนั้นจึงนำเมล็ดบัวสายไปอบที่อุณหภูมิ 102 องศาเซลเซียส และชั่งน้ำหนักอีกครั้งจนได้น้ำหนักคงที่ ส่วนของแข็งที่เหลือหลังจากน้ำในเมล็ดบัวสายระเหยออกไปหมดแล้วเรียกว่า ของแข็งทั้งหมด (total solid) ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างละ 5 ซ้ำ บันทึกผลและคำนวณร้อยละความชื้นของเมล็ดบัวสายได้จากสูตร

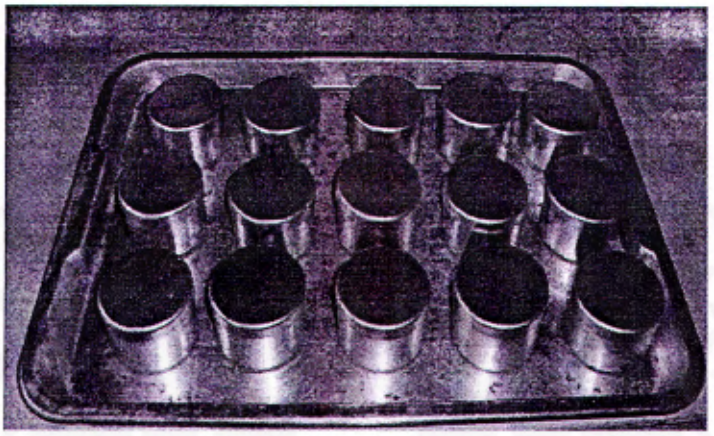
$$\text{ปริมาณความชื้น (\%)} = \frac{M1 - M2}{M1} \times 100$$

เมื่อ M1 คือ น้ำหนักของเมล็ดบัวสาย (กรัม) ก่อนอบในตู้อบลมร้อน

M2 คือ น้ำหนักของเมล็ดบัวสาย (กรัม) หลังอบในอบลมร้อน




ภาพที่ 37 ขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณความชื้นของเมล็ดบัวสาย



ภาพที่ 38 ภาชนะโลหะ

(2) การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ด้วยวิธี Kjeldahl method ซึ่งเป็นการหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในรูปของโปรตีนหยาบ (crude protein) ที่มีทั้งโปรตีนและสารประกอบอื่นๆ ที่ไม่ใช่โปรตีนแต่มีไนโตรเจน ได้แก่ เอไมด์ (amind) เกลือแอมโมเนีย (ammonium salt) และยูเรีย (urea) รวมอยู่ด้วย ขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน แสดงดังภาพที่ 39 ซึ่งทำการวิเคราะห์โดยการนำตัวอย่างเมล็ดบัวสายที่บดละเอียด 1 กรัม ใส่ในหลอดย่อย เติมคะตะลิส 7 กรัมและกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 20 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่องย่อยโปรตีนและกำจัดไอกรด แสดงดังภาพที่ 40 ทำการย่อยเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จะได้สารละลายใสสีฟ้าอ่อน นำไปกลั่นด้วยเครื่องกลั่นไนโตรเจน แสดงดังภาพที่ 41 รองรับสารที่กลั่นได้ด้วยกรดบอริกเข้มข้นร้อยละ 2 ที่ผสมอินดิเคเตอร์ 2-3 หยด จะได้สารละลายสีเขียว ทำการไตเตรทสารละลายที่ได้ด้วยกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1 นอร์มอล จะได้จุดยุติเป็นสารละลายสีม่วง แสดงดังภาพที่ 42 อ่านค่าปริมาตรกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการไตเตรท บันทึกผลและคำนวณค่าร้อยละโปรตีนของเมล็ดบัวสายโดยใช้สูตร

$$\text{ปริมาณโปรตีน (\%)} = \%N_2 \times 6.25$$

$$\text{เมื่อ } \%N_2 = \frac{(V1 - V2) \times (14.007) \times (N) \times 100}{E}$$

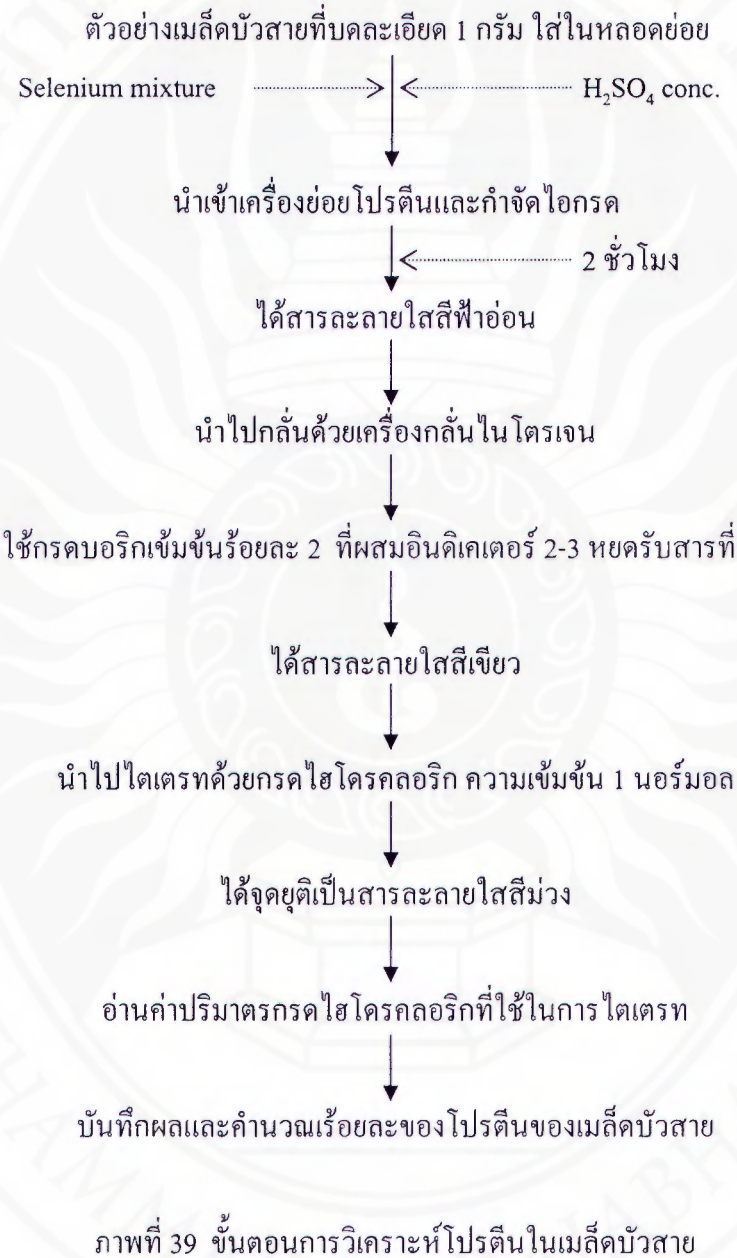
V1 = ปริมาตรกรดที่ใช้ในการไตเตรท

V2 = ปริมาตรกรดที่ใช้ในการไตเตรท blank

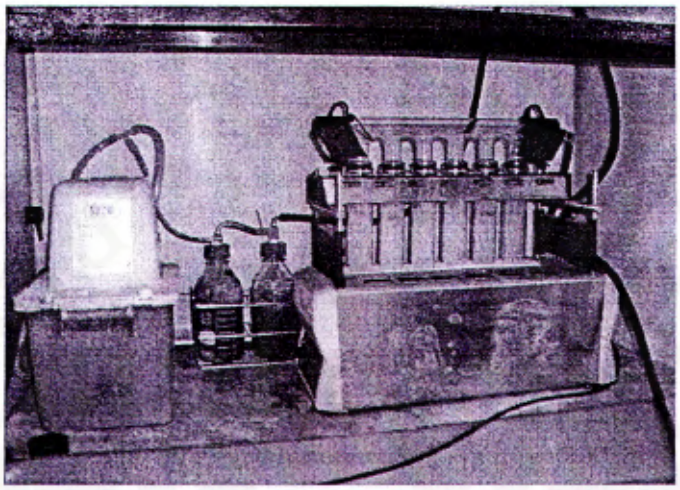
N = normality ของกรด

E = น้ำหนักของเมล็ดบัวสายหน่วยเป็นมิลลิกรัม

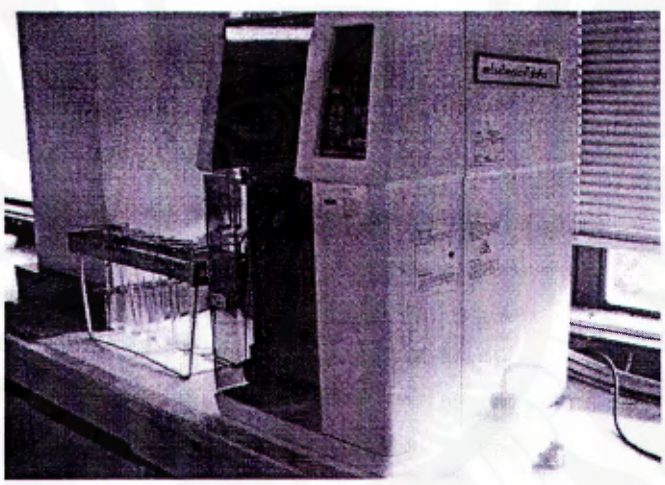
ตัวอย่างอาหารจะมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบร้อยละ 16 หรือ 6.25 และกรดไฮโดรคลอริก 1 โมล จะสมมูลกับไนโตรเจน 1 โมล มีค่าเท่ากับ 14 กรัม ดังนั้น กรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จะมีไนโตรเจน เท่ากับ 0.0014 กรัม และกรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้น 1 นอร์มอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เท่ากับ 14.007 มิลลิกรัม



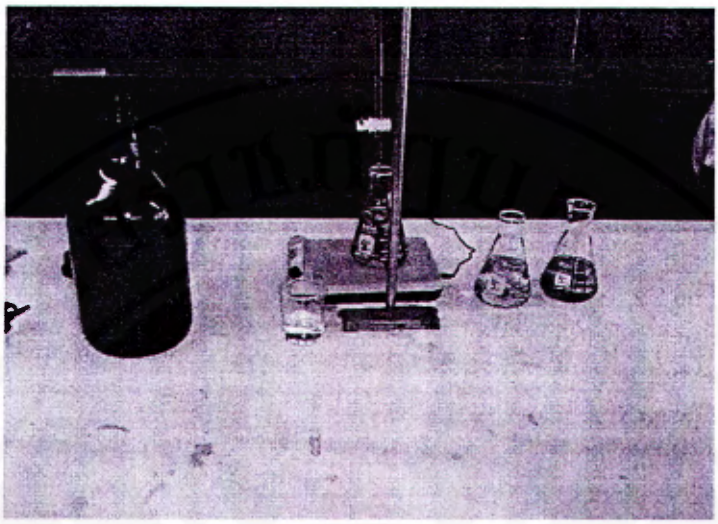

ภาพที่ 39 ขั้นตอนการวิเคราะห์โปรตีนในเมล็ดบัวสาย



ภาพที่ 40 เครื่องย่อยโปรตีนและกำจัดไอกรด (digestion unit) ยี่ห้อ Buchi รุ่น B-426



ภาพที่ 41 เครื่องวิเคราะห์ไนโตรเจน (nitrogen analyzer) ยี่ห้อ Buchi รุ่น B-323

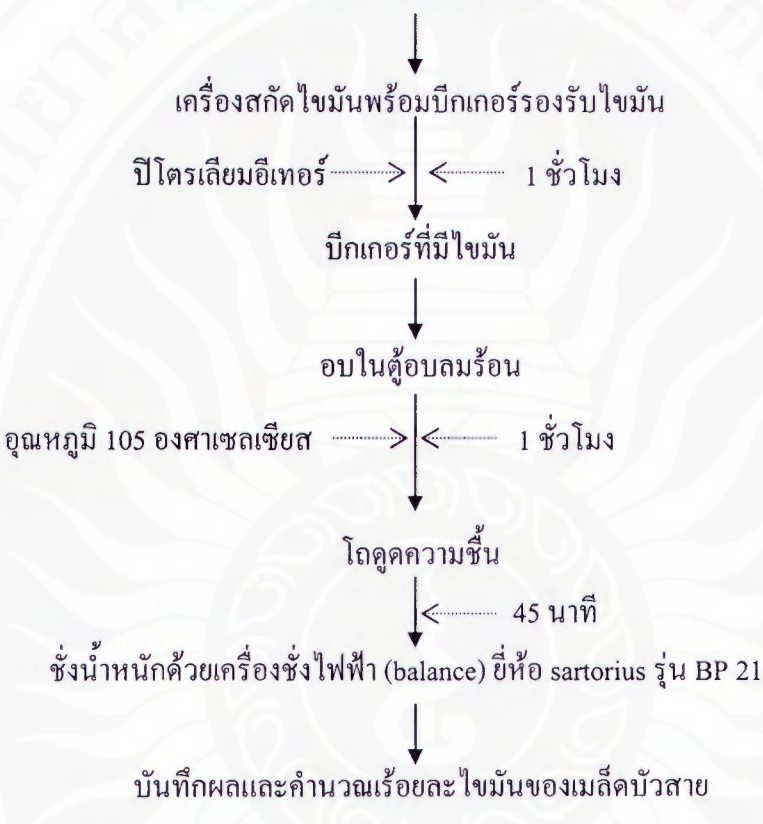


ภาพที่ 42 การไตเตรทสารละลายไนโตรเจนด้วยกรดไฮโดรคลอริกได้จุดยุติเป็นสารละลายสีม่วง

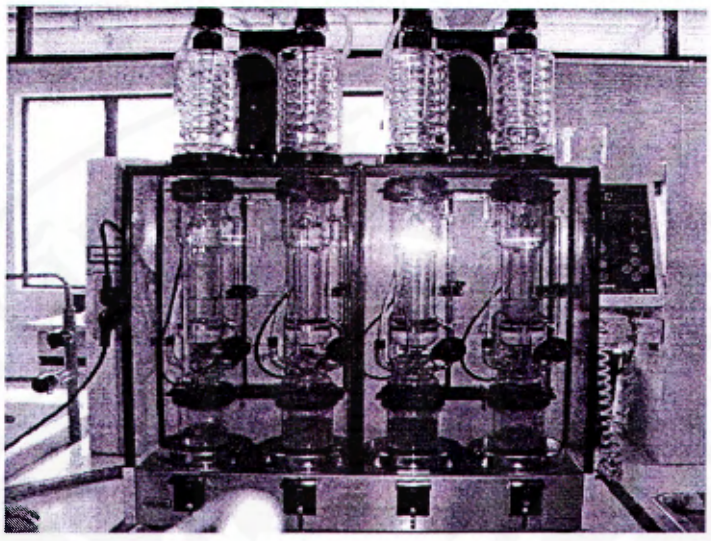
(3) การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน เป็นการวิเคราะห์ไขมันอย่างหยาบโดยการสกัดด้วยตัวทำละลาย โดยทั่วไปส่วนประกอบของไขมันในอาหารจะเป็นสารประกอบลิพิดที่สกัดออกได้ด้วยอีเทอร์ ทั้งปิโตเลียมอีเทอร์และไดเอทธิลอีเทอร์ ซึ่งเป็นสารละลายที่ไม่มีขั้ว (non-polar solvent) สารที่สกัดได้เรียกว่า สารสกัดจากอีเทอร์ (ether extract หรือ crude fat) ขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณไขมันในเมล็ดบัวสาย แสดงดังภาพที่ 43 โดยการนำตัวอย่างเมล็ดบัวสายที่บดละเอียด 1 กรัม ใส่ในหลอดสกัด นำหลอดสกัดประกอบเข้ากับเครื่องสกัดไขมัน แสดงดังภาพที่ 44 พร้อมบีกเกอร์รองรับไขมัน สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ ใช้เวลาสกัด 1 ชั่วโมง นำบีกเกอร์ที่มีไขมันไปอบในตู้อบลมร้อน ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำให้เย็นในโถดูดความชื้น เป็นเวลา 45 นาที (ฉัตรชัย สังผุด, 2545, 70) ชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้า บันทึกผลและคำนวณร้อยละไขมันของเมล็ดบัวสาย

จากสูตร

$$\text{ปริมาณไขมัน (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักไขมันที่ได้จากการสกัด}}{\text{น้ำหนักเมล็ดบัวสาย}} \times 100$$




ภาพที่ 43 ขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณไขมันในเมล็ดบัวสาย

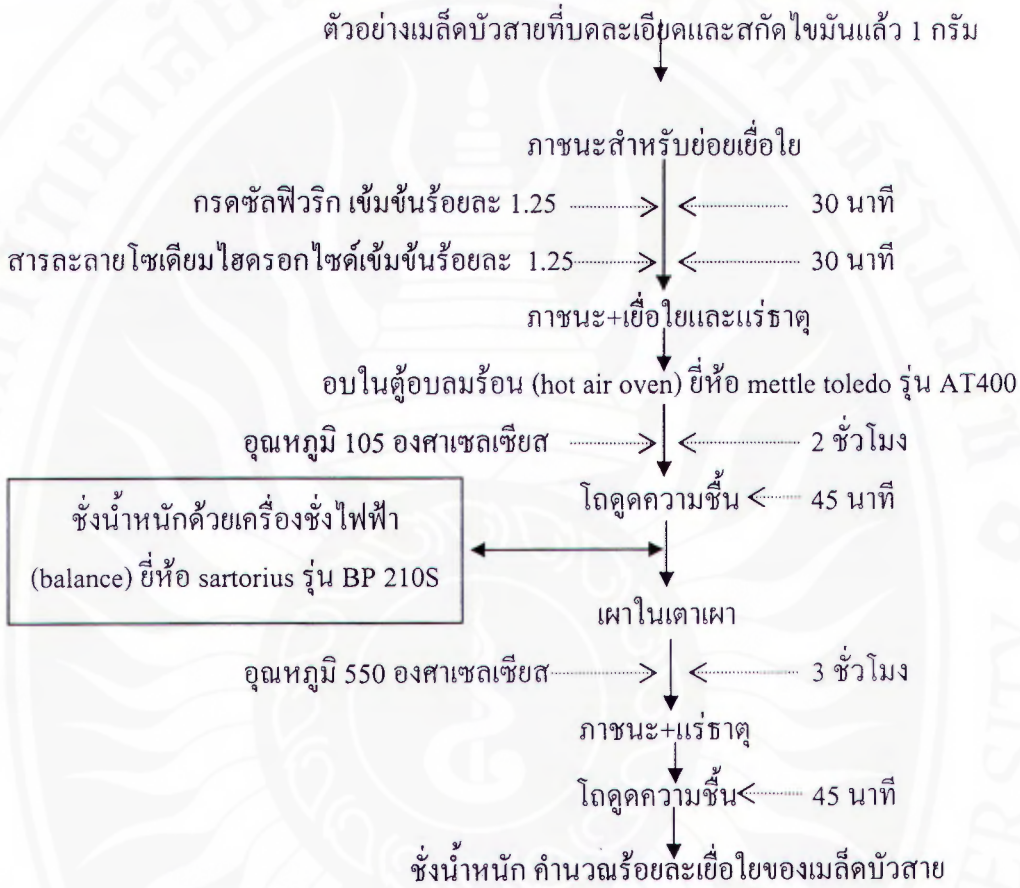


ภาพที่ 44 เครื่องสกัดไขมัน (soxhlet extraction) ยี่ห้อ Buchi รุ่น B-426

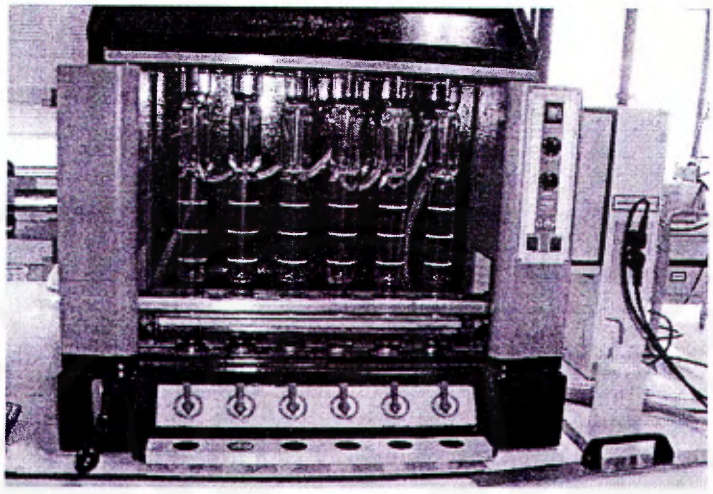
(4) การวิเคราะห์ปริมาณของเยื่อใย มีขั้นตอนการวิเคราะห์แสดงดังภาพที่ 45 โดยใช้เครื่องสกัดเยื่อใย แสดงดังภาพที่ 46 ซึ่งวิธีนี้ดัดแปลงมาจากวิธีมาตรฐาน official Method 935.5 (AOAC, 2000) ซึ่งทำการสกัดตัวอย่างด้วยกรดและเบส โดยการนำตัวอย่างเมล็ดบัวสายที่บดละเอียดและสกัดไขมันแล้ว 1 กรัม ไปใส่ในภาชนะสำหรับย่อยเยื่อใย แสดงดังภาพที่ 47 ย่อยด้วยกรดซัลฟิวริก 1.25 % เป็นเวลา 30 นาที และย่อยด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.25 % เป็นเวลา 30 นาที นำสารที่เหลือในถ้วยไปอบในตู้อบลมร้อน ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักส่วนที่เหลือ ซึ่งเป็นน้ำหนักของเยื่อใยและแร่ธาตุด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้า เผาส่วนที่เหลือในเตาเผา แสดงดังภาพที่ 48 ที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เยื่อใยจะถูกเผาไหม้หมด ทิ้งส่วนที่เหลือให้เย็นในโถดูดความชื้น เป็นเวลา 45 นาที ชั่งน้ำหนัก คำนวณร้อยละของเยื่อใยของเมล็ดบัวสายได้จากสูตร

$$\text{ปริมาณเยื่อใย (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักของเยื่อใย(g)}}{\text{น้ำหนักเมล็ดบัวสาย (g)}} \times 100$$

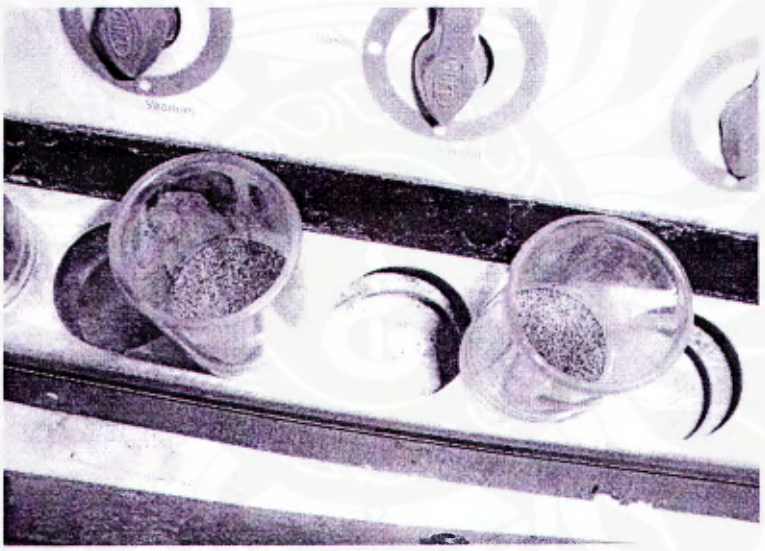
น้ำหนักของเยื่อใย (กรัม) = (น้ำหนักภาชนะ+ตัวอย่างหลังสกัด)-(น้ำหนักภาชนะ+ตัวอย่างหลังเผา)



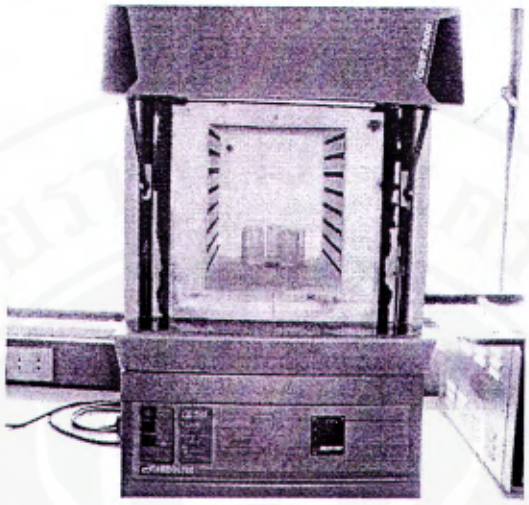

ภาพที่ 45 ขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณเยื่อใยในเมล็ดบัวสาย



ภาพที่ 46 เครื่องสกัดเยื่อใย (soxhlet fiber) บริษัท Velp scientifica



ภาพที่ 47 ภาชนะใส่ตัวอย่างสำหรับการสกัดเยื่อใย



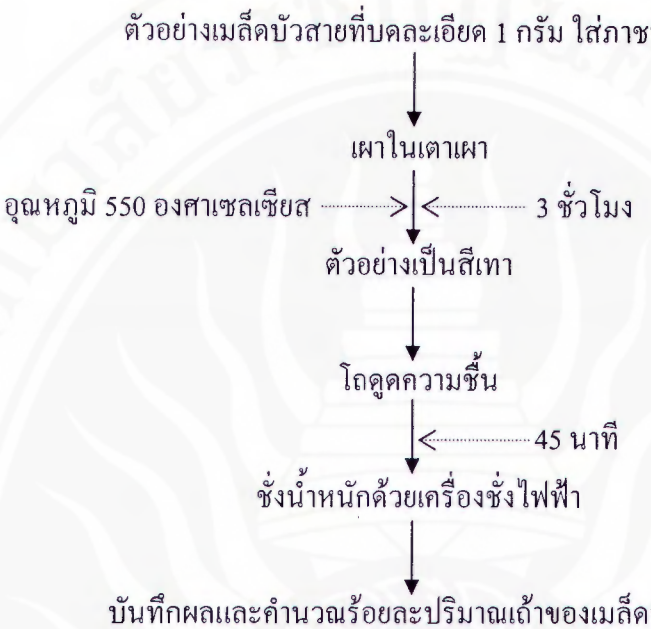
ภาพที่ 48 เตาเผา (muffle furnace) ยี่ห้อ Sartorius รุ่น cwt 1300

(5) การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรต โดยวิธีการคำนวณหาค่าความต่าง (by difference) ซึ่งคำนวณได้จากสูตร

คาร์โบไฮเดรต (%) = 100 – [ความชื้น (%) +โปรตีน (%) + ไขมัน (%) + เยื่อใย (%) + เถ้า (%)]

(6) การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า โดยใช้วิธีการเผา (dry ashinกรัม) เป็นวิธีดัดแปลงมาจากวิธีมาตรฐาน official Method 985.35 (AOAC, 2000) ขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณเถ้าในเมล็ดบัวสาย แสดงดังภาพที่ 49 ซึ่งทำโดยการนำตัวอย่างเมล็ดบัวสายที่บดละเอียด 1 กรัม ใส่ในภาชนะเผา นำไปเผาในเตาเผา ที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมงจนตัวอย่างเป็นสีเทา ปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้น เป็นเวลา 45 นาที ชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้า บันทึกผลและคำนวณร้อยละปริมาณเถ้าของเมล็ดบัวสาย โดยใช้สูตร

$$\text{ปริมาณเถ้า (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักเมล็ดบัวสายหลังเผา}}{\text{น้ำหนักเมล็ดบัวสายก่อนเผา}} \times 100$$




ภาพที่ 49 ขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณเถ้าของเมล็ดบัวสาย

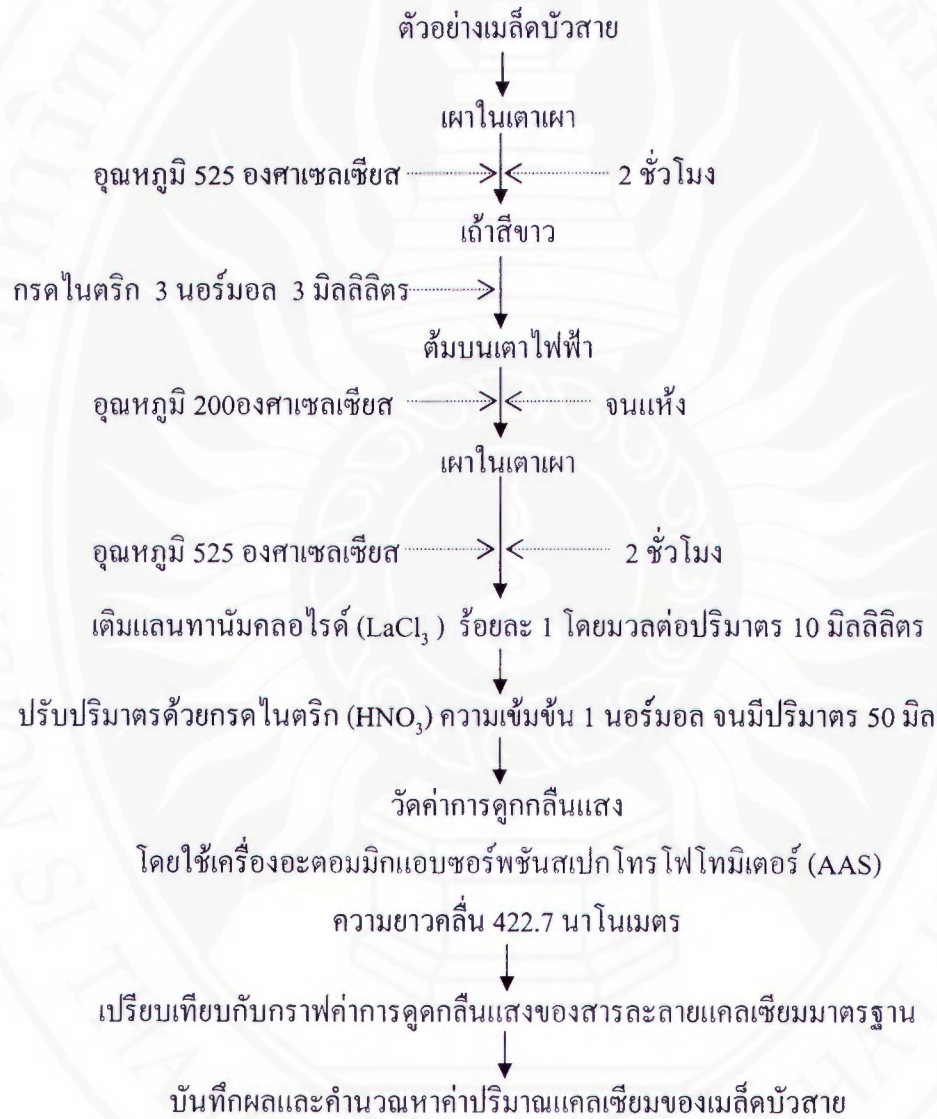
(7) การวิเคราะห์ปริมาณของแคลเซียมและเหล็ก จะวิเคราะห์แคลเซียมโดยใช้วิธีที่ดัดแปลงจากวิธีมาตรฐาน official Method 927.02 (AOAC, 2000) และวิเคราะห์เหล็กโดยวิธีมาตรฐาน official Method 980.01 (AOAC 2000) ขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียมในเมล็ดบัวสาย แสดงดังภาพที่ 50 ซึ่งทำโดยการเผาตัวอย่างเมล็ดบัวสายจนปราศจากสารอินทรีย์ได้เป็นเถ้าสีขาว เติมสารละลายกรดไนตริก ความเข้มข้น 3 นอร์มอล จำนวน 3 มิลลิลิตร ต้มบนเตาไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส จนแห้ง นำสารที่ได้ไปเผาในเตาเผา ที่อุณหภูมิ 525 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นเติมสารละลายแลนทานัมคลอไรด์ เข้มข้นร้อยละ 1 โดยมวลต่อปริมาตร จำนวน 10 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรสารละลายด้วยกรดไนตริก เข้มข้น 1 นอร์มอล จนมีปริมาตร 50 มิลลิลิตร วิเคราะห์หาค่าปริมาณแคลเซียมในเมล็ดบัวสายบนเปลวไฟ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอะตอมมิกแอบซอร์พชันสเปกโทรโฟโทมิเตอร์ แสดงดังภาพที่ 51 ใช้ก๊าซอะเซทิลีนและอากาศ ที่ความยาวคลื่น 422.7 นาโนเมตร แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายแคลเซียมมาตรฐาน (ภาคผนวก ก 1) บันทึกผลและคำนวณหาค่าปริมาณแคลเซียมของเมล็ดบัวสาย ได้จากสูตร

$$\text{ปริมาณแคลเซียม (มิลลิกรัมต่อลิตร)} = \frac{A \times B}{C}$$

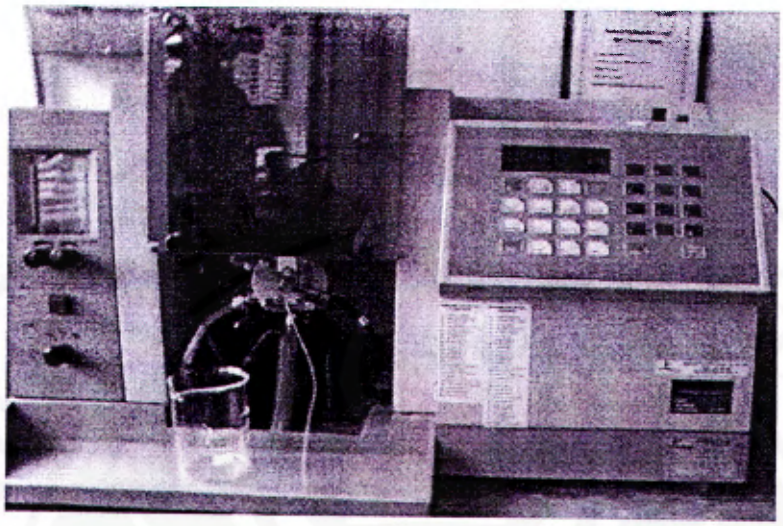
เมื่อ A = ความเข้มข้นของสารละลายที่กราฟอ่านได้ (มิลลิกรัมต่อลิตร)

B = ปริมาตรของสารละลายตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

C = น้ำหนักของตัวอย่าง (กรัม)




ภาพที่ 50 ขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียมของเมล็ดบัวสาย



ภาพที่ 51 อะตอมมิกแอบซอร์พชันสเปกโทรโฟโทมิเตอร์ (atomic absortion spectrophotometer; AAS) ยี่ห้อ perkin lmer รุ่น 3110

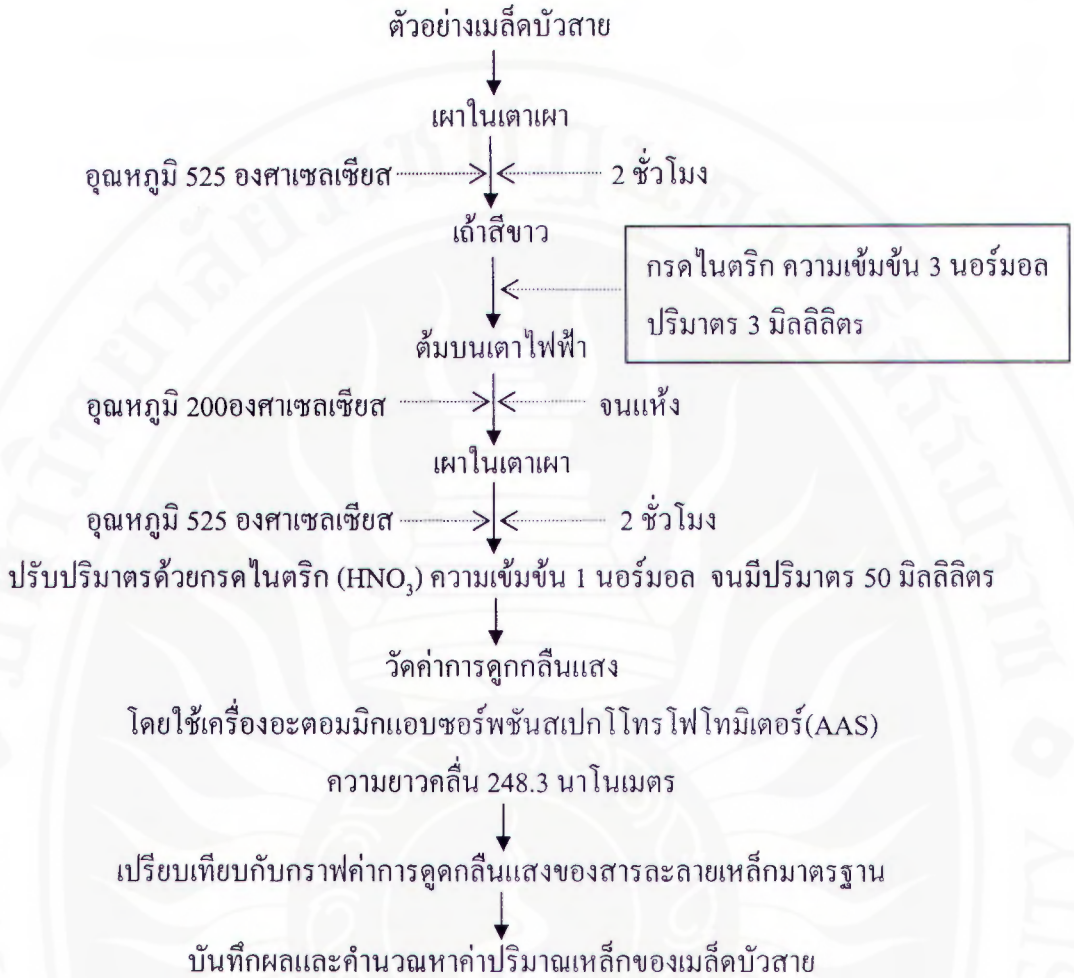
สำหรับขั้นตอนในการวิเคราะห์ปริมาณเหล็กในเมล็ดบัวสาย แสดงดังภาพที่ 52 ซึ่งมีการเตรียมตัวอย่างเช่นเดียวกับการวิเคราะห์แคลเซียม แต่ไม่ต้องเติมสารละลายแลนทานัม-คลอไรด์ วิเคราะห์หาค่าปริมาณเหล็กในเมล็ดบัวสายบนเปลวไฟโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอะตอมมิกแอบซอร์พชันสเปกโทรโฟโทมิเตอร์ ใช้ก๊าซอะเซทิลีนและอากาศ ที่ความยาวคลื่น 248.3 นาโนเมตร แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายเหล็กมาตรฐาน (ภาคผนวก ก 2) บันทึกผลและคำนวณหาค่าปริมาณเหล็กของเมล็ดบัวสาย ได้จากสูตร

$$\text{ปริมาณเหล็ก (มิลลิกรัมต่อลิตร)} = \frac{A \times B}{C}$$

เมื่อ A = ความเข้มข้นของเหล็กที่กราฟอ่านได้ (มิลลิกรัมต่อลิตร)

B = ปริมาตรของสารละลายตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

C = น้ำหนักของตัวอย่าง (กรัม)




ภาพที่ 52 ขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณเหล็กของเมล็ดบัวสาย

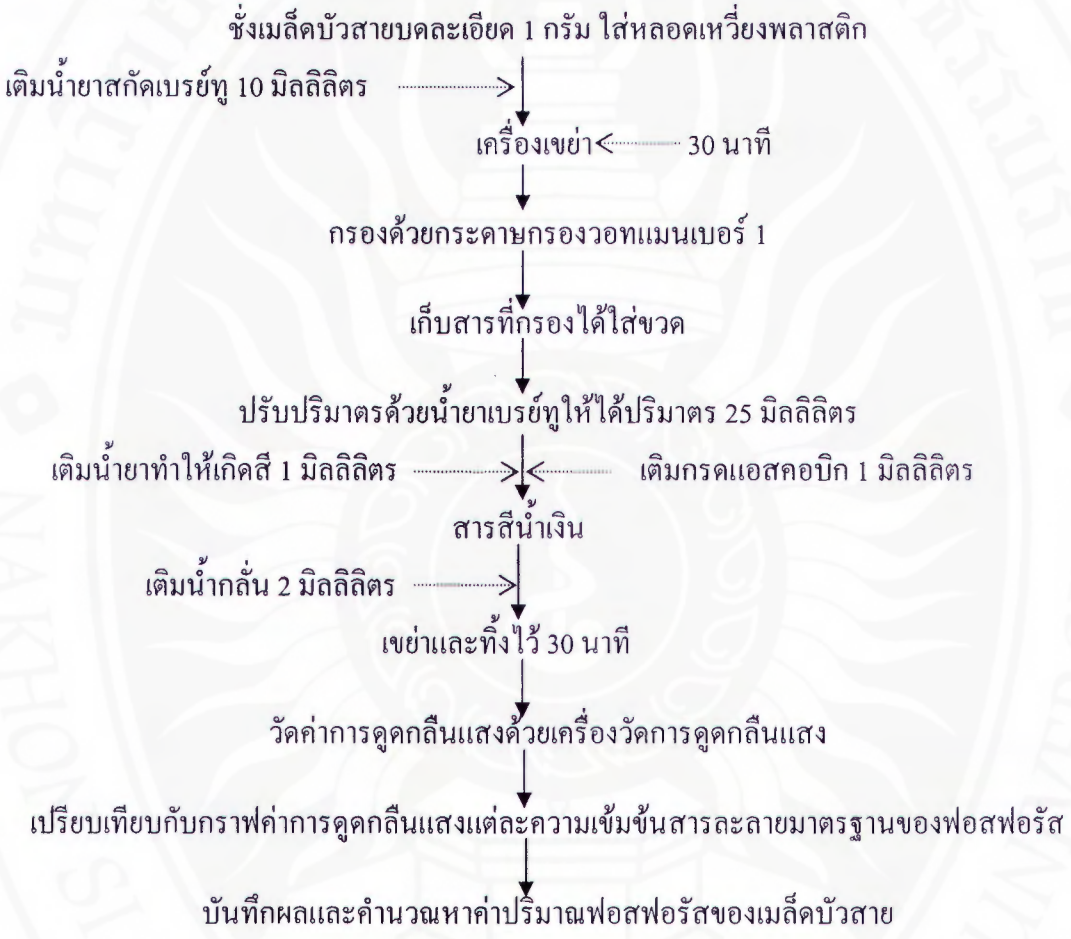
(8) การวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัส ใช้วิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีมาตรฐาน official Method 927.02 (AOAC 2000) โดยมีขั้นตอนในการวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสในเมล็ดบัวสาย แสดงดังภาพที่ 53 ซึ่งทำโดยการชั่งเมล็ดบัวสายบดละเอียด 1 กรัม ใส่หลอดเหวี่ยงพลาสติก เติมน้ำยาสกัดเบรย์ทู 20 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่า เป็นเวลา 30 นาที กรองด้วยกระดาษกรองวอทแมนเบอร์ 1 เก็บสารที่กรองได้ใส่ขวด ปรับปริมาตรน้ำยาเบรย์ทูให้ได้ 25 มิลลิลิตร เติมน้ำยาทำให้เกิดสีและกรดแอสคอบิก อย่างละ 1 มิลลิลิตร จะเกิดสีน้ำเงิน เติมน้ำกลั่นลงไป 2 มิลลิลตร เขย่าและปล่อยทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์ เป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง แสดงดังภาพที่ 54 เปรียบเทียบค่าที่วัดได้กับกราฟค่าการดูดกลืนแสงแต่ละความเข้มข้นสารละลายมาตรฐานของฟอสฟอรัส (ภาคผนวก ก 3) บันทึกผลและคำนวณหาค่าปริมาณฟอสฟอรัสของเมล็ดบัวสาย ได้จากสูตร

$$\text{ปริมาณฟอสฟอรัส (มิลลิกรัมต่อลิตร)} = \frac{A \times B}{C}$$

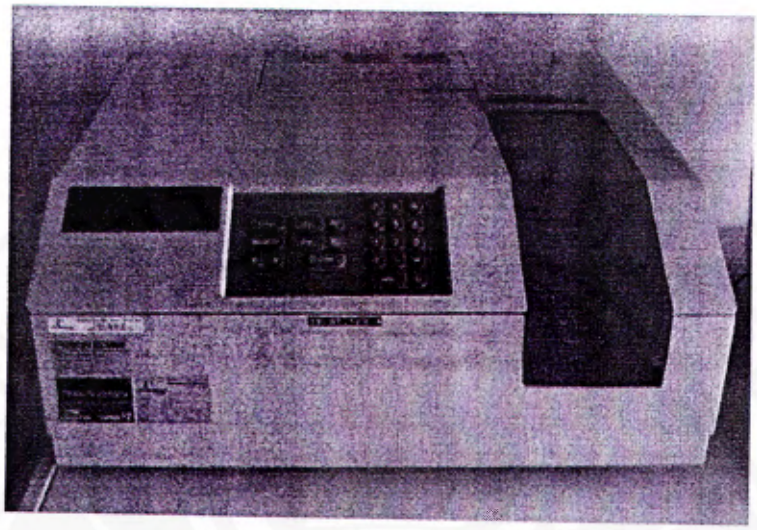
เมื่อ A = มิลลิกรัมต่อลิตรของฟอสฟอรัสที่กราฟอ่านได้

B = ปริมาตรของสารละลายตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

C = น้ำหนักของสารตัวอย่าง (กรัม)

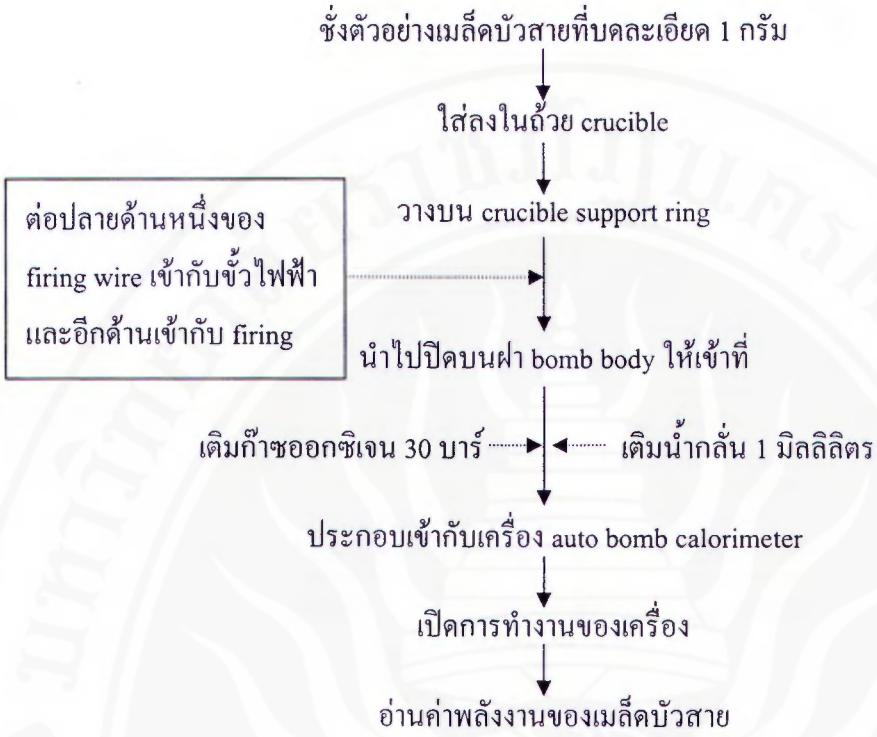



ภาพที่ 53 ขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสของเมล็ดบัวสาย

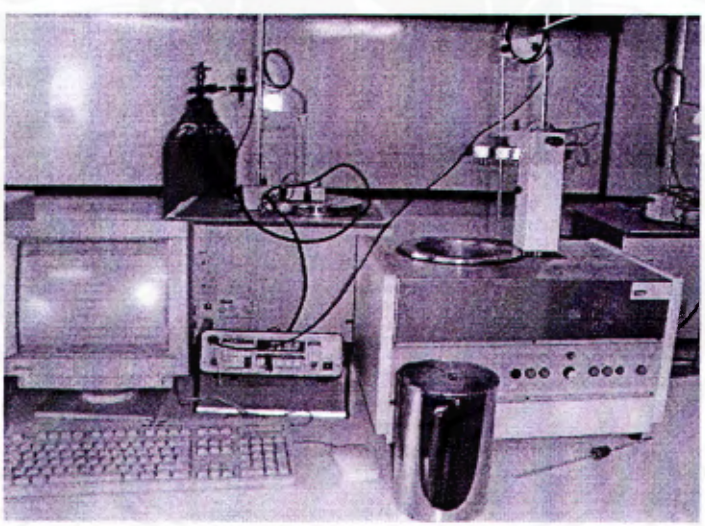


ภาพที่ 54 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ยี่ห้อ perkin elmer รุ่น landa 12

(9) การวิเคราะห์ปริมาณพลังงาน โดยการหาพลังงานรวม ซึ่งเป็นพลังงานที่ได้จากสารอาหารคาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน โดยมีขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณพลังงานของเมล็ดบัวสาย แสดงดังภาพที่ 55 โดยการชั่งตัวอย่างเมล็ดบัวสายที่บดละเอียด 1 กรัมใส่ใน crucible แล้ววางลงใน crucible support ring จากนั้นจึงต่อปลายข้างหนึ่งของ firing wire เข้ากับขั้วไฟฟ้าและต่อปลายอีกด้านหนึ่งของ firing wire เข้ากับปลาย firing cotton ปิดฝา crucible support ring ให้เข้าที่ เติมก๊าซออกซิเจน 30 บาร์ และน้ำกลั่นลงใน bomb body ปริมาณ 1 มิลลิลิตร นำ bomb body มาประกอบเข้ากับเครื่อง auto bomb calorimeter แสดงดังภาพที่ 56 และเปิดการทำงานของเครื่องอ่านค่าพลังงานของเมล็ดบัวสายและบันทึกผล




ภาพที่ 55 ขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณพลังงานของเมล็ดบัวสาย



ภาพที่ 56 เครื่องออโต้บอมบ์แคลอริมิเตอร์ (auto bomb calorimeter)
ยี่ห้อ gallenkamp รุ่น cab 101.ab1.c

## การเก็บรวบรวมข้อมูล

จากการศึกษาได้ดำเนินการเก็บรวบรวมข้อมูลต่างๆ ของเมล็ดบัวสายจากบัวสายชนิดดอกสีขาวปนชมพูจากบ่อปลูก เมล็ดบัวสายจากบัวสายชนิดดอกสีขาวปนชมพูจากแหล่งน้ำธรรมชาติ และเมล็ดบัวสายจากบัวสายชนิดดอกสีม่วงปนชมพูจากแหล่งน้ำธรรมชาติ จากวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพและทางเคมีของเมล็ดบัวสายตัวอย่างละ 5 ซ้ำ ดังนี้

1. ลักษณะทางกายภาพ ได้เก็บรวบรวมข้อมูลดังนี้

1.1 สีของมล็ดบัวสาย เก็บข้อมูลค่าความสว่าง (L*), ค่าความเป็นสีแดง-สีเขียว (a*) และค่าความเป็นสีเหลือง-น้ำเงิน (b*)

1.2 ขนาด เป็นน้ำหนักของเมล็ดบัวสายที่เม็ดโตกว่า 1 มิลลิเมตร

1.3 การพองตัว เป็นน้ำหนักเมล็ดบัวสาย (หน่วยเป็นกรัม) ที่เพิ่มขึ้นในน้ำที่อุณหภูมิห้อง และเป็นน้ำหนักเมล็ดบัวสายที่เพิ่มขึ้นในน้ำที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส

2. คุณค่าทางอาหาร ได้เก็บรวบรวมข้อมูลจากการวิเคราะห์ทางเคมีดังนี้

2.1 พลังงาน เป็นกิโลแคลอรีต่อ 100 กรัม

2.2 น้ำหรือความชื้น เป็นกรัมต่อ 100 กรัม

2.3 โปรตีน เป็นกรัมต่อ 100 กรัม

2.4 ไขมัน เป็นกรัมต่อ 100 กรัม

2.5 คาร์โบไฮเดรต เป็นกรัมต่อ 100 กรัม

2.6 เยื่อใย เป็นกรัมต่อ 100 กรัม

2.7 เถ้า เป็นกรัมต่อ 100 กรัม

2.8 แคลเซียม เป็นมิลลิกรัมต่อ 100 กรัม

2.9 เหล็ก เป็นมิลลิกรัมต่อ 100 กรัม

2.10 ฟอสฟอรัส เป็นมิลลิกรัมต่อ 100 กรัม

3. รวบรวมข้อมูลทั้งหมด ตรวจสอบความถูกต้อง บันทึกข้อมูลลงคอมพิวเตอร์เพื่อดำเนินการวิเคราะห์ข้อมูลโดยวิธีการทางสถิติ

## วิธีการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติเป็นการวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยลักษณะทางกายภาพและคุณค่าทางอาหารของเมล็ดบัวสาย จากการวิเคราะห์ตัวอย่างละ 5 ซ้ำ (n=5) โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance: ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของร้อยละของค่าเฉลี่ยรายคู่ด้วยวิธีดันแคน (Duncan's Multiple Ranกรัมe Test : DMRT) โดยกำหนดให้

ตัวอักษรที่กำกับบนข้อมูลที่ต่างกันจะแสดงความแตกต่างของข้อมูล ($P<0.05$) และตัวอักษรที่กำกับบนข้อมูลที่เหมือนกันจะแสดงความไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) รายงานผลการศึกษาที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95