บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

1. การวิเคราะห์หาปริมาณ capsaicin และ dihydrocapsaicin ในพริก

1.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

1. พริกสด สายพันธุ์จินดา (ห้วยสีทน) เพาะปลูกที่ บ้านหม้อ ต.คูคำ อ.ซำสูง จ.ขอนแก่น
2. สารมาตรฐาน capsaicin 98% (CALBIOCHEM)
3. สารมาตรฐาน dihydrocapsaicin 99% (Wako)
4. 95% Ethanol
5. Acetonitrile
6. Phosphoric acid
7. Methanol
8. เครื่อง Water 590 programmable HPLC pump. UV detecter from Water 2487 dual λ absorbance
9. HPLC column C18 Gemini-NX 5u C18 110A ขนาด 250 x 4.6 mm
10. เครื่องบดปั่น
11. ตู้อบตั้งอุณหภูมิได้
12. เครื่องกรองแบบ suction ใช้กรอง mobile phase
13. กระดาษกรองเบอร์1 (Whatman)
14. ไนลอนเมมเบรน 0.45 µm (Alltech)
15. hot- plate + magnetic stirrers
16. Syringe สำหรับใช้ช่วยการกรองผ่าน nylon membrane filter 0.45 µm

1.2 วิธีการ

การเตรียมตัวอย่างพริก

นำพริกพริกสด สายพันธุ์จินดา (ห้วยสีทน) นำมาล้างน้ำสะอาด ผึ่งลมให้แห้ง เด็ดขั้วพริกออก ชั่งน้ำหนัก นำเข้าอบในตู้อบอุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส จนแห้ง (น้ำหนักไม่เปลี่ยนแปลง) ชั่งน้ำหนักแห้ง บดละเอียด นำส่วนหนึ่งไปตรวจหาปริมาณ capsaicin และ dihydrocapsaicin ส่วนที่เหลือบรรจุในถุงพลาสติก เก็บไว้ในตู้เย็น จนกว่าถึงเวลาใช้

1.3 Method validation

- การเตรียมสารละลายมาตรฐาน capsaicin และ dihydrocapsaicin

เตรียมความเข้มข้นของสารมาตรฐาน capsaicin และ dihydrocapsaicin โดยชั่งมา 0.02 มก. ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 10 มล. ปรับปริมาตรด้วยเอทานอล (stock solution) จะได้ความเข้มข้นที่ 2000 ppm แล้วนำมาเจือจางให้ได้ 200 ppm 5มล. และเตรียมสารมาตรฐานที่ความเข้นข้น 0.1, 0.5, 1, 25, 50 และ 100 ppm แสดงดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 การเตรียมสารมาตรฐาน capsaicin และ dihydrocapsaicin จากสารมาตรฐานความเข้มข้น 200 ppm

ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (ppm)	ปริมาณสารมาตรฐาน capsaicin และ dihydrocapsaicin ที่ใช้ (µl)	ปริมาณเอทานอลที่ใช้ (µl)
0.1	1	1999
0.5	5	1995
1	10	1990
25	25	1925
50	50	1950
100	100	1900

- การหา limit of detection (LOD) และ limit of qauntitation (LOQ)

การหา limit of detection (LOD) เป็นค่าต่ำสุดของสารที่เครื่องมือยังสามารถวัดได้ โดยค่า LOD นี้ได้จากการเจือจางสารมาตรฐานแล้ววิเคราะห์ด้วย HPLC โดยเจือจางลงเรื่อยๆ จนกว่าเครื่อง HPLC จะไม่สามารถวัดได้ (ความสูงของโครมาโตแกรมจะต้องสูงกว่าหรือเท่ากับ 3 เท่าของ noise)

การหา limit of qauntitation (LOQ) เป็นค่าต่ำสุดของสารที่เครื่องมือยังสามารถวัดได้ โดยค่า LOQ นี้ได้จากการเจือจางสารมาตรฐานแล้ววิเคราะห์ด้วย HPLC โดยเจือจางลงเรื่อยๆ จนกว่าเครื่อง HPLC จะไม่สามารถวัดได้ (ความสูงของโครมาโตแกรมจะต้องสูงกว่าหรือเท่ากับ 10 เท่าของ noise)

- การทดสอบความเที่ยง (precision) แบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือศึกษา intraday โดยวัดสารมาตรฐานในวันเดียวกัน 3 ซ้ำ และ interday โดยวัดสารมาตรฐาน 3 วัน วันละ 3 ซ้ำ แล้วนำมาคำนวณหา relative standard deviation (%RSD)

- การทดสอบความถูกต้อง (accuracy) โดยการเติมสารมาตรฐาน 3 ความเข้มข้นลงในตัวอย่าง โดยแต่ละความเข้มข้นทำ 3 ซ้ำ คำนวณหาค่าเฉลี่ยความสูงของ peak ลบ control ที่ไม่เติมสารมาตรฐานแล้วนำมาเปรียบเทียบ standard curve เพื่อหาความเข้มข้นที่สามารถตรวจพบได้ และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ recovery

- สภาวะเครื่อง HPLC

HPLC column C18 Gemini-NX 5u C18 110A ขนาด 250 x 4.6 mm. mobile phase ที่ใช้คือ 50%ACN + 0.1 phosphoric acid เวลาในการแยกสาร 20 นาที flow rate 1มล./นาที และตรวจด้วย UV Detecter ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

1.4 ขั้นตอนการสกัดและวิเคราะห์หาสาร capsaicin และ dihydrocapsaicin ในพริก

ทำการสกัดสาร capsaicin และ dihydrocapsaicin ในพริกด้วย 95% เอทานอล โดยใช้พริกแห้ง 1 กรัม ต่อ 25 มล. ของ 95% เอทานอล ให้ความร้อนด้วยฮอทเพลตที่มีการหมุนของแมกเนติกสเตอเรอร์ด้วยความเร็วสม่ำเสมอให้เดือดอย่างช้าๆเป็นเวลา 30 นาที ทิ้งให้เย็นแล้วกรองด้วยกระดาษกรอง นำไประเหยจนแห้ง แล้วเติมด้วย mobile phase (50%ACN +0.1% phosphoric acid) 20 มล. และนำสารละลายที่ได้ไปเจือจางโดย นำ 1 มล. ลงใน Volumetric flask ขนาด 25 มล. แล้วปรับปริมาตรด้วย mobile phase ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วย High Performance Liquid Chromatography technique (HPLC) กรองด้วย syringe filter 0.45 μm โดย mobile phase ที่ใช้คือ 50%ACN+0.1 phosphoric acid เวลาในการแยกสาร 20 นาที flow rate 1มล./นาที และตรวจด้วย UV Detecter ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (วิธีการของ Batchelor and Jones, 2000)

2. ศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาระยะเฉียบพลันของพริกต่อระบบประสาทอัตโนมัติและระบบเมตาบอลิสมในคนน้ำหนักปกติเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างการกินข้าวแบบไม่มีพริกและการกินข้าวแบบมีพริก

2.1 การคำนวณขนาดตัวอย่าง

ข้อมูลจากการทดลองนำร่อง (pilot study) จำนวน 4 คน คำนวณจากความแตกต่างของค่า AUC ของ Blood Glucose ระหว่างกินข้าวผัดที่มีพริกกับไม่มีพริก โดยกำหนดที่ power of statistics 80%, Minimal detectable difference in means =30, standard deviation = 43 เมื่อคำนวณจากสูตรของ cross-over design (David, 1995) ได้ sample size = 35 คน

2.2 ตัวแปรในงานวิจัย

ตัวแปรฤทธิ์ทางระบบประสาทอัตโนมัติ คือ ความดันเลือด อัตราการเต้นของหัวใจ และ HRV (time domain (SDNN, rMSSD) และ frequency domain (HF, LF และ LF/HF) (การศึกษาครั้งนี้เก็บข้อมูลในอาสาสมัคร 33 คน)

ตัวแปรฤทธิ์ทางระบบเมตาบอลิสม คือ ระดับ glucose และ insulin ในเลือด (serum) (เก็บข้อมูลในอาสาสมัคร 33 คน)

carbondioxide production ($\dot{V}CO_2$), oxygen consumption ($\dot{V}O_2$), RER ($\dot{V}CO_2$ / $\dot{V}O_2$) นำค่า $\dot{V}CO_2$, $\dot{V}O_2$ และ RER ไปคำนวณหา fat oxidation rate, carbohydrate oxidation rate และ energy expenditure (เก็บข้อมูลในอาสาสมัคร 18 คน) (Perronnet and Massicotte, 1991)

carbohydrate oxidation rate $= 4.585\ \dot{V}CO_2 - 3.226\ \dot{V}O_2$

fat oxidation rate $= 1.695\ \dot{V}O_2 - 1.701\ \dot{V}CO_2$

การคำนวณ energy expenditure (EE) (Matsumoto et al., 2000)

$$EE = \{4.686+[(RQ-0.707)/0.293]*0.361\}* \dot{V}O_2$$

2.3 เกณฑ์คัดเลือกตัวอย่างการวิจัย

อาสาสมัครที่เข้าร่วมในงานวิจัย จะต้องลงนามยินยอมเข้าร่วมงานวิจัยที่ได้รับการรับรองจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์แล้ว

อาสาสมัครทุกคน ต้องมีสุขภาพดี ไม่มีโรคหัวใจ โรคเบาหวาน โรคความดัน โรคตับ โรคไต โรคกระเพาะหรือลำไส้ โรคเรื้อรังหรือโรคประจำตัวใดที่ทำให้ต้องกินยาประจำ โดยพิจารณาจากประวัติการรักษาพยาบาล และการตรวจร่างกายโดยแพทย์ และอุปกรณ์ช่วย เช่น เครื่องตรวจน้ำตาลในเลือด Accu-chek Performaฯ

เพศชาย/หญิง อายุ 18-50 ปี จำนวน 35 คน ที่มีค่า BMI (body mass index; kg/m^2) ระหว่าง 18.5-22.9 kg/m^2

และก่อนเข้าร่วมงานวิจัย อาสาสมัครต้องไม่ดื่มเหล้า ไม่สูบบุหรี่ ไม่รับประทานยาทุกชนิด และงดเว้นอาหารเผ็ดร้อน (พริก พริกไท ฯลฯ) เป็นเวลาอย่างน้อย 72 ชั่วโมงก่อนเข้าร่วมงานวิจัย

2.4 การเตรียมตัวอย่างพริก

นำพริกที่ได้ตรวจหาปริมาณ capsaicin และ dihydrocapsaicin ตามข้อ 3.1.2 มาคำนวณน้ำหนักพริกแห้ง น้ำหนักพริกสด ปริมาณ capsaicin และ dihydrocapsaicin โดยใช้ปริมาณ capsaicin เป็นตัวกำหนดในการจัดเตรียมให้ตามน้ำหนักตัวอาสาสมัคร คือ capsaicin 0.4 มก./กก.-น้ำหนักตัว (เทียบเป็นปริมาณพริกประมาณ 15 เม็ด)

2.5 การเตรียมอาหารสำหรับงานวิจัย

ในงานวิจัยนี้กำหนดใช้ข้าวผัดเป็นตัวแทนอาหารมาตรฐาน โดยอาหารจะถูกจัดเตรียมสำหรับอาสาสมัครเฉพาะคน ตามน้ำหนักตัว (ปริมาณข้าวผัด 5 กรัม/กิโลกรัม-น้ำหนักตัว) อาหารจะถูกคำนวณคุณค่าทางอาหารและส่วนประกอบของอาหารโดยอ้างอิงจากข้อมูลกองโภชนาการกรมอนามัยกระทรวงสาธารณสุข (กองโภชนาการ กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข, ม.ป.ป.) ระหว่างการทดลองมีน้ำเปล่าให้ 2 แก้ว (แก้วละ 200 มิลลิลิตร)

พลังงานโดยประมาณของอาหารที่ใช้ในการทดลอง (ข้าวผัด)

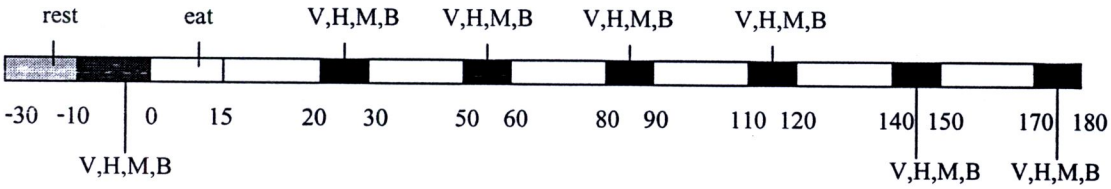
ส่วนประกอบ		พลังงาน (kcal)
1.	ข้าวสวย 150 ก.	212
2.	ไข่ไก่ (ขาว+แดง) 30 ก.	48
3.	เนื้อไก่ 40 กรัม	66
4.	คะน้า 25 กรัม	7.75
5.	มะเขือเทศ 35 กรัม	7.7
6.	น้ำมันพืช 2 ช้อนโต๊ะ	270
7.	ซีอิ้วขาว 2 ช้อนชา	6.67
8.	น้ำตาลทราย 1 ช้อนชา	7
9.	น้ำปลา 1 ½ ช้อนโต๊ะ	15
	รวม 317.5 กรัม	640.12

อัตราน้ำหนักส่วนประกอบของอาหารโดยประมาณ คาร์โบไฮเดรต : ไขมัน : โปรตีน = 66.66:21.37:11.97
โดยจะจัดเตรียมให้อาสาสมัครเฉพาะคน 5 ก./กก.-น้ำหนักตัว

2.6 ขั้นตอนการวิจัย

ในวันก่อนร่วมโครงการอาสาสมัครต้องงดอาหารและน้ำตั้งแต่เวลา 00.00 นาฬิกาเป็นต้นไป ในวันที่ร่วมโครงการให้อาสาสมัครมาที่ห้องออกกำลังกาย ศูนย์หัวใจสิริกิติ์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ตั้งแต่ 8.30 นาฬิกา (โดยยังไม่รับประทานอาหารและน้ำ) เมื่อมาถึงห้องปฏิบัติการจะให้อาสาสมัครรายงานตัวกับนักวิจัยเข้าห้องน้ำให้เรียบร้อยและนั่งพักในห้องพักที่จัดไว้ให้ประมาณ 20 นาที อาสาสมัครจะได้รับการวัดอุณหภูมิของร่างกาย ความดันชีพจร และเจาะเลือดโดยคาเข็มเจาะไว้ อาสาสมัครจะถูกเก็บเลือดจำนวน 5 มล. เพื่อนำไปตรวจวัดระดับน้ำตาล (เลือด 2 มล.) และอินซูลินในเลือด (เลือด 3 มล.) (เป็นข้อมูลที่เวลา 0 นาที) และทำการตรวจวัดพารามิเตอร์ของระบบเมตาบอลิสมและระบบประสาทอัตโนมัติโดยบันทึกคลื่นไฟฟ้าหัวใจ lead II โดยเครื่อง ADInstruments PowerLab B/30 ซึ่งจะมีการติดแผ่นติดหน้าอก (อิเล็กโทรด) จำนวน 3 จุด บริเวณหน้าอกซ้ายและขวาและบริเวณท้องด้านขวา และใส่หน้ากากเพื่อตรวจ RER, $\dot{V}CO_2$, $\dot{V}O_2$ และ $\dot{V}E$ ก่อนการใส่หน้ากากให้อาสาสมัครจิบน้ำ เพราะอาสาสมัครอาจจะคอแห้งได้เนื่องจากระหว่างใส่หน้ากากอาสาสมัครจะต้องหายใจทางปากเท่านั้น โดยจะทำการเก็บข้อมูลเป็นเวลาประมาณ 5 นาที (เริ่มใส่หน้ากากก่อนประมาณ 10 นาทีแต่จะวิเคราะห์ข้อมูล 5 นาที)หลังจากนั้นจะถอดหน้ากากออก แต่ยังคงติดแผ่นอิเล็กโทรดไว้ และให้อาสาสมัครกินข้าวผัดที่จัดเตรียมไว้ให้ ปริมาณข้าวผัด 5 ก./กก.-น้ำหนักตัว โดยไม่คลุกพริกหรือคลุกพริกแห้งป่นปริมาณเท่ากับ capsaicin 0.4 มก./กก.-น้ำหนักตัว โดยต้องกินข้าวให้หมดภายใน 15 นาทีตามด้วยน้ำ 1 แก้ว (200 ซีซี) และตลอดการทดลองอีก 1 แก้ว จับเวลานับจากเริ่มกินข้าว เมื่อครบเวลา 30 นาที ใส่หน้ากากบันทึกข้อมูลโดยเครื่อง ADInstruments PowerLab B/30 เป็นเวลา 5 นาที เหน็บปรอทที่รักแร้ วัดอุณหภูมิร่างกาย ความดัน ชีพจร และเก็บเลือด 5 มล. หลังจากนั้นถอดหน้ากากให้อาสาสมัครพัก แต่ยังคงติดแผ่นอิเล็กโทรดไว้ และให้อาสาสมัครนั่งอยู่กับที่ และทำเช่นเดียวกันนี้ที่เวลา 90, 120, 150 และ 180 นาที

หลังจากครบเวลา ดึงเข็มเจาะเลือดออก ปิดแผล แล้วให้อาสาสมัครนั่งพักอย่างน้อยครึ่งชั่วโมง หากอาสาสมัครรู้สึกสบายดี ก็อนุญาตให้กลับบ้านได้ และจะมาเข้าร่วมโครงการอีกครั้งตามที่นักวิจัยนัด ซึ่งจะห่างจากครั้งแรกเป็นระยะเวลาไม่น้อยกว่า 7 วัน



Vital sign (V), HRV(H), ตัวแปรทางระบบเมตาบอลิสม(M), เก็บตัวอย่างเลือด (B)

ภาพที่ 7 แสดงแผนการเก็บข้อมูล

3. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การเปรียบเทียบความแตกต่างของค่า means ระหว่างการกินข้าวที่ไม่มีพริก (N) กับมีพริก (C) ในช่วงเวลาเดียวกัน (ลบค่าเริ่มต้น) ใช้ paired t test, การเปรียบเทียบความแตกต่างของค่า means ในช่วงเวลาต่างๆ หลังการกินข้าวเปรียบเทียบกับเวลาเริ่มต้นทั้งการกินข้าวที่ไม่มีพริก (N) กับมีพริก (C) ใช้ Anova with repeated measurement และใช้ Tamhane test เนื่องจากเป็น unequal variances, ใช้ non-parametric, Wilcoxon signed ranks test เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของ medians เนื่องจากการกระจายไม่เป็น normal distribution เช่น กรณี insulin levels, โดยกำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ $p<0.05$