# บทที่ 3
## อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

**ตัวอย่างพืชทดลอง**

ผลลำไยอบแห้งพันธุ์ดอ ผลขนาดใหญ่เส้นผ่านศูนย์กลาง 3.17 เซนติเมตร หรือ 1.25 นิ้ว ขึ้นไป จำนวน 2,000 ผล จากสวนลำไย ตำบลอุโมงค์ อำเภอเมือง จังหวัดลำพูน

**อุปกรณ์ในการวิเคราะห์**

1. เครื่องวัดสี รุ่น CR-300 ยี่ห้อ Minolta ซึ่งวัดสีออกมาเป็นค่า L*, a* และ b* โดยมีรายละเอียดดังนี้

L* = The lightness factor (value)

ค่า L* แสดงความสว่าง

- มีค่ามากเมื่อมีค่าใกล้ 100
- มีค่าความมืดมากเมื่อมีค่าใกล้ 0

a*, b* = The chromaticity coordinates (°hue, chroma)

ค่า a* - มีค่าบวก หมายถึง วัตถุสีแดง

- มีค่าลบ หมายถึง วัตถุมีสีเขียว

ค่า b* - มีค่าบวก หมายถึง วัตถุมีสีเหลือง

- มีค่าลบ หมายถึง วัตถุมีสีน้ำเงิน

2. เครื่องชั่งละเอียดแบบทศนิยม 4 ตำแหน่ง

3. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น U-2001ของบริษัท Hitachi ประเทศญี่ปุ่น

4. ตู้อบ (oven)

5. เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด (hand refractrometer) ยี่ห้อ N-1E (0-32° brix) ของบริษัท Atago ประเทศญี่ปุ่น

6. เครื่องเหวี่ยง รุ่น Kubota 6930 ของบริษัท Kubota ประเทศญี่ปุ่น

7. เครื่องเขย่า รุ่น AS-1 ของบริษัท Almighty Shaker ประเทศญี่ปุ่น

8. เครื่อง High Liquid Chromatography (HPLC), model HP 1100, Hewlett Packard (Agilent) ประเทศสหรัฐอเมริกา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

9. เครื่องแก้ว

- บีกเกอร์ (beaker)
- กระบอกตวง (cylinder)
- ขวดปรับปริมาตร (volumetric flask)
- ปิเปต (pipepete)
- แท่งแก้วคนสาร (stirrer)
- ช้อนตักสาร
- โกร่งบด
- หลอดทดลอง

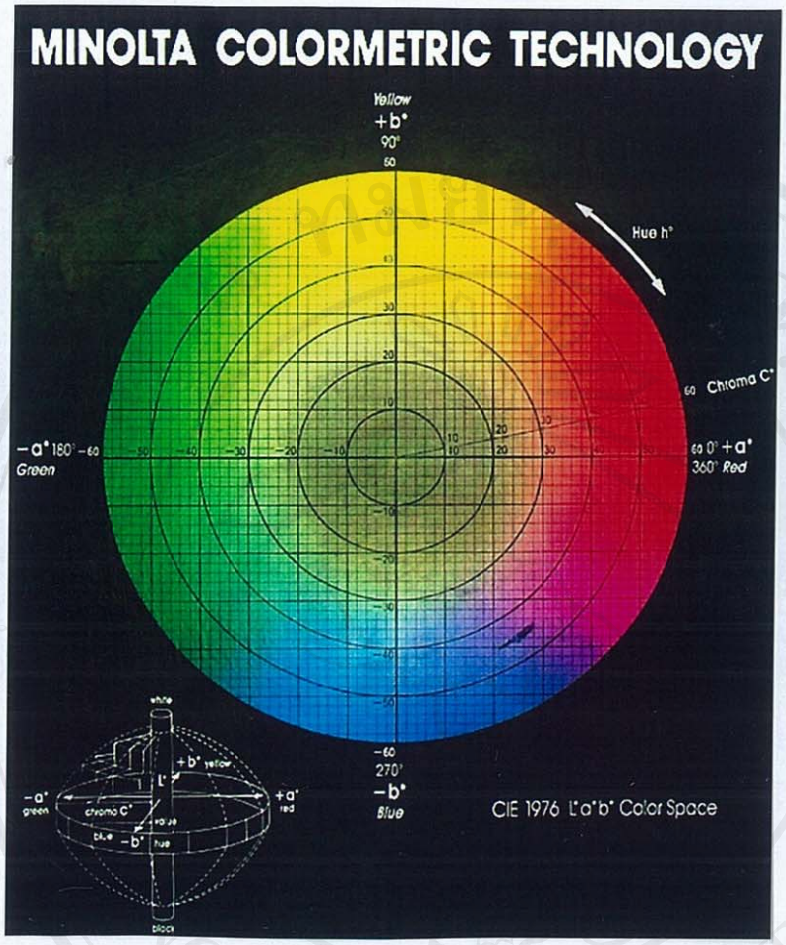
**สารเคมี**

1. 10 % Folin – Ciocaltea reagent
2. 7.5 % $Na_2CO_3$
3. 80 % Methanol
4. Methanol HPLC grade
5. Acetonitrile HPLC grade
6. Phosphate Buffer pH 3

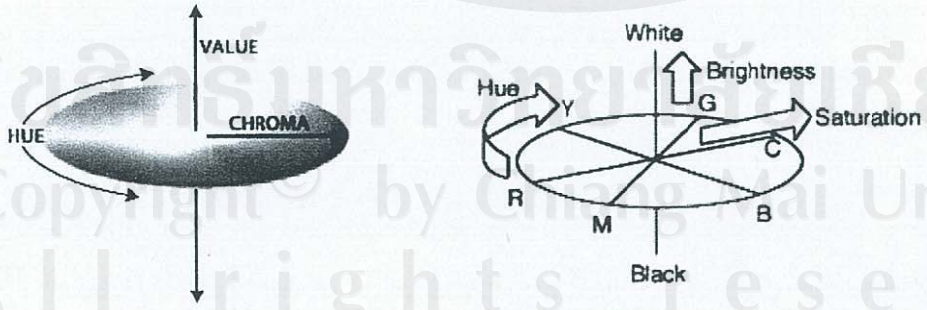
**สถานที่ใช้ในการดำเนินการวิจัย**

1. ห้องปฏิบัติการภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2. ห้องปฏิบัติการสายวิชาวิทยาศาสตร์เภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
3. ห้องปฏิบัติการกลาง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved




**ภาพ 4** แผนภาพของสีที่อ่านค่าเป็น L*, a* และ b*




**ภาพ 5** ค่าความอิ่มตัวของสี (chroma) และอุณหภูมิของสี (°hue)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**วิธีการทดลอง**

**การทดลองที่ 1 ผลของสารเคลือบผิวและการเก็บรักษาแบบสุญญากาศต่ออายุการเก็บรักษาผลลำไยอบแห้ง**

วางแผนการทดลองแบบ ปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ (factorial in completely randomized design) โดยมี 2 ปัจจัย คือ

ปัจจัยที่ 1 เคลือบผิวลำไยด้วย canauba wax มีวิธีการดังต่อไปนี้

วิธีการที่ 1 ไม่เคลือบผิวลำไย

วิธีการที่ 2 เคลือบผิวผลลำไยแห้งด้วยสารละลาย canauba wax ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์

วิธีการที่ 3 เคลือบผิวผลลำไยแห้งด้วยสารละลาย canauba wax ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์

วิธีการที่ 4 เคลือบผิวผลลำไยแห้งด้วยสารละลาย canauba wax ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์

วิธีการที่ 5 เคลือบผิวผลลำไยแห้งด้วยสารละลาย canauba wax ความเข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์

ปัจจัยที่ 2 เก็บในสภาพความดันบรรยากาศปกติ และเก็บในสภาพสุญญากาศ

วิธีการที่ 1 โดยบรรจุไว้ในถุง polyethylene (PE)

วิธีการที่ 2 โดยบรรจุไว้ในถุง polyethylene (PE) และใช้เครื่องบรรจุแบบสุญญากาศ

โดยกรรมวิธีที่ไม่เคลือบผิวและเก็บในสภาพความดันบรรยากาศปกติเป็นชุดควบคุม โดยแต่ละปัจจัยมี 5 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีมี 4 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ผล โดยมีทั้งหมด 5×2 กรรมวิธี รวม 1,200 ผล

**วิธีการเคลือบผิว**

หลังจากนำลำไยที่อบแห้งออกจากเตาอบแล้ว นำไปเคลือบผิวด้วยสารละลาย canauba wax ความเข้มข้น 0.0, 0.5, 1.0, 1.5, และ 2.0 เปอร์เซ็นต์โดยการจุ่มผลลงในสารละลาย canauba wax ความเข้มข้นต่างๆ นาน 5 วินาที แล้วนำไปผึ่งบนกระดาษบางสีขาวจนผลแห้ง นำผลลำไยมาบรรจุในถุง polyethylene (PE) แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง สำหรับกรรมวิธีที่เก็บในสภาพสุญญากาศ นำผลลำไยอบแห้งที่เคลือบแล้วใส่ในถุงแล้วดูดอากาศออกโดยใช้เครื่องบรรจุแบบสุญญากาศ จากนั้นนำไปเก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิห้อง บันทึกผลการทดลองทุกๆ เดือนเป็นเวลา 8 เดือน ในวันที่ 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 และ 240 วัน หลังการเก็บรักษา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**การบันทึกผลการทดลอง**

**การประเมินผลทางกายภาพและส่วนประกอบทางเคมี**

**1. การเปลี่ยนแปลงที่สังเกตได้ด้วยตาเปล่า**

บันทึกโดยการสังเกตลักษณะที่ปรากฏบนผิวของเปลือกลำไยแห้งในแต่ละเดือน

**2. สีผิวเปลือก**

วัดโดยใช้เครื่องวัดสี (chroma meter) รุ่น CR-300 ยี่ห้อ Minolta ในแต่ละเดือนทำการวัดจำนวน 10 ผลโดย 1 ผลวัดสีบริเวณกลางผล 3 จุด ซึ่งค่าที่ได้จะแสดงในค่า L*, a* และ b* (ภาพ 4) แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ยกัน จากนั้นนำมาหาค่า °hue และค่า chroma (ภาพ 5)โดยจะหาได้จากสมการดังนี้

$$°hue = \tan^{-1}(b^*/a^*)$$

$$chroma = [a^{*2} + b^{*2}]^{1/2}$$

**3. ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (Total Soluble Solids ; TSS)**

ในแต่ละเดือนทำการวัดจำนวน 10 ผลโดยโดยนำเนื้อลำไยแห้ง 1 กรัม บดรวมรวมกับน้ำ 1 ml ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที จากนั้นนำสารละลายที่ได้มาวัดโดยใช้เครื่องวัดปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ (refractometer) ยี่ห้อ N-1E (0-32 brix) ของบริษัท Atago ประเทศญี่ปุ่น

**4. เปอร์เซ็นต์การเน่าเสีย**

ในแต่ละเดือนทำการวัดจำนวน 10 ผลโดยการนับจำนวนผลที่ปรากฏเชื้อราที่ผิวของเปลือกหรือที่เนื้อของลำไยแห้ง โดยคำนวณจาก

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเน่าเสีย} = \frac{\text{จำนวนผลที่ถูกเชื้อราเข้าทำลาย} \times 100}{\text{จำนวนผลลำไยในแต่ละหน่วยทดลอง}}$$

**5. เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของผล**

ในผลลำไยแห้งมาชั่งบนเครื่องชั่งละเอียดแบบทศนิยม 4 ตำแหน่ง ในแต่ละเดือนจะทำการวัดจำนวน 10 ผล นำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงน้ำหนัก จากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงน้ำหนัก} = \frac{Y - X}{Y} \times 100\ \%$$

โดย X = น้ำหนักผลแห้งก่อนการเก็บรักษา (g)

Y = น้ำหนักผลแห้งหลังการเก็บรักษา (g)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**6. ปริมาณ total phenolic compounds**

วิเคราะห์หาปริมาณ total phenolic compounds ในส่วนของเปลือก เนื้อ และเมล็ด ในแต่ละเดือนจะทำการวัดจำนวน 10 ผลนำมาแยกเปลือก เนื้อ และเมล็ด แล้วคลุกให้เข้ากันโดยดัดแปลงจากวิธีของ Ketsa and Atantee (1998) ดังนี้

นำส่วน เปลือก เนื้อ เมล็ด มา 3 กรัม บดให้ละเอียด ที่ 4 องศาเซลเซียส

↓

เติม 80 % Methanol

↓

นำไปไว้ที่เครื่องเขย่า ที่ 140 g นาน 30 นาที

↓

ดูดสารละลายไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาทีที่ 4 องศาเซลเซียส

↓

ดูดส่วนใส ปริมาตร 4 ml

↓

เติม 10 % Folin – Ciocaltea Reagent 10 ml แล้วตั้งทิ้งไว้ 8 นาที

↓

เติม 7.5 % $Na_2CO_3$ 8 ml ตั้งทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง

↓

นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 245 นาโนเมตร

↓

คำนวณปริมาณ total phenolic compounds โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน ของ ellagic acid (ภาพ 6)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**7. ปริมาณกรดอีลาจิก**

วิเคราะห์หาปริมาณกรดอีลาจิกที่เปลือก เนื้อ และเมล็ด โดยนำส่วน เปลือก เนื้อ เมล็ดของผลลำไยอบแห้ง 10 ผล มาชั่นส่วนละ 3 กรัม บดให้ละเอียด ที่ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นเติม 80 % methanol แล้วนำไปไว้ที่เครื่องเขย่า ที่ 140 G นาน 30 นาที แล้วจึงดูดสารละลายไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาทีที่ 4 องศาเซลเซียส ดูดส่วนใสนำสารละลายที่ได้ ฉีดเข้าเครื่อง HPLC โดยกำหนดสภาวะดังนี้

Column : Reverse phase, Nova Pak® C-18 ขนาด 3.9 × 150 mm, 5 µm

Mobile phase : Gradient, acetonitrile : phosphate buffer pH 3 = 75:25 10 นาที

Injection : 5 µl

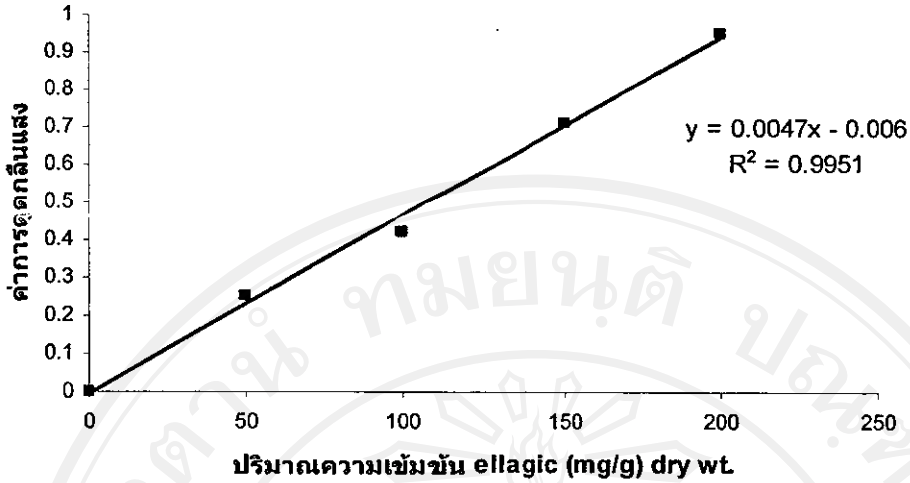
Detector : UV-visible ที่ 254 nm

Flow : 1.0 ml/min

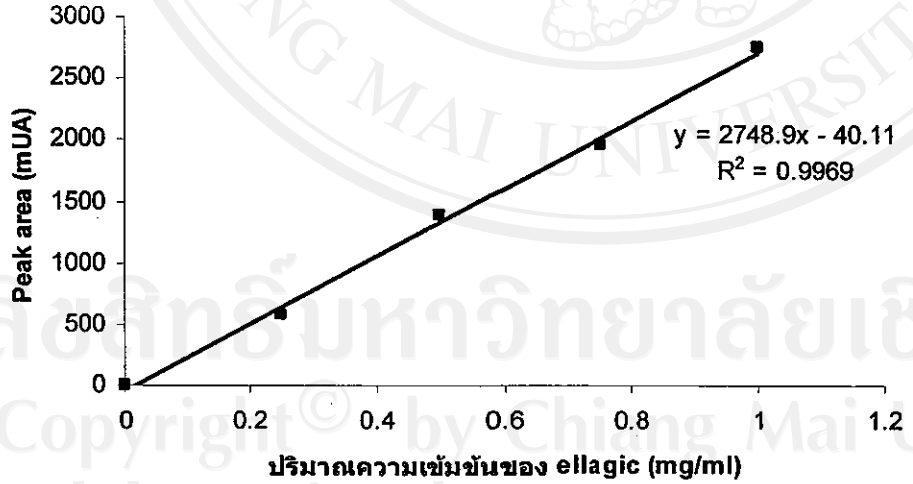
Temperature : 25 ° C

เปรียบเทียบค่า peak area ของสารละลายที่สกัดจาก เปลือก เนื้อ และเมล็ด นำมาเปรียบเทียบกับค่า peak area ของกราฟมาตรฐานของ ellagic acid standard solution (ภาพ 7) ที่ทราบความเข้มข้น แล้วนำมาคำนวณหาปริมาณกรดอีลาจิกที่สกัดได้จากส่วนของลำไยอบแห้ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved




**ภาพที่ 6** กราฟมาตรฐานของกรดอีลาจิกแสดงความสัมพันธ์ของการดูดกลืนแสงกับปริมาณความเข้มข้นของกรดอีลาจิก




**ภาพที่ 7** กราฟมาตรฐานของกรดอีลาจิกแสดงความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของกรดอีลาจิกกับ peak area

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

**การทดลองที่ 2 ผลของแสง สารเคลือบผิวและการเก็บในสภาพสุญญากาศต่อการเปลี่ยนแปลงผิวสีทองและปริมาณกรดอีลาจิกของผลลำไยอบแห้ง**

วางแผนการทดลองแบบ ปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ (factorial in completely randomized design) โดยมี 2 ปัจจัยดังนี้

ปัจจัยที่ 1 เก็บในสภาพความดันบรรยากาศปกติ และเก็บในสภาพสุญญากาศ

วิธีการที่ 1 โดยบรรจุไว้ในถุง polyethylene (PE)

วิธีการที่ 2 โดยบรรจุไว้ใน polyethylene (PE) และใช้เครื่องบรรจุแบบสุญญากาศ

ปัจจัยที่ 2 เก็บในสภาพที่มีแสง และเก็บในสภาพที่ไม่มีแสง

วิธีการที่ 1 โดยบรรจุไว้ในถุง polyethylene (PE) และเก็บรักษาในห้องได้รับแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนท์ (fluorescence lamps)

วิธีการที่ 2 โดยบรรจุไว้ในถุง polyethylene (PE) และในไปเก็บรักษาในถุงอลูมิเนียมเพื่อป้องกันแสงในห้องที่ได้รับแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนท์ (fluorescence lamps)

กรรมวิธีที่เก็บในสภาพความดันบรรยากาศปกติ และเก็บในสภาพที่ไม่มีแสงและเก็บเป็นชุดควบคุม โดยแต่ละปัจจัยมี 2 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีมี 4 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ผล โดยมีทั้งหมด 2×2 กรรมวิธี รวมทั้งสิ้น 480 ตัวอย่าง

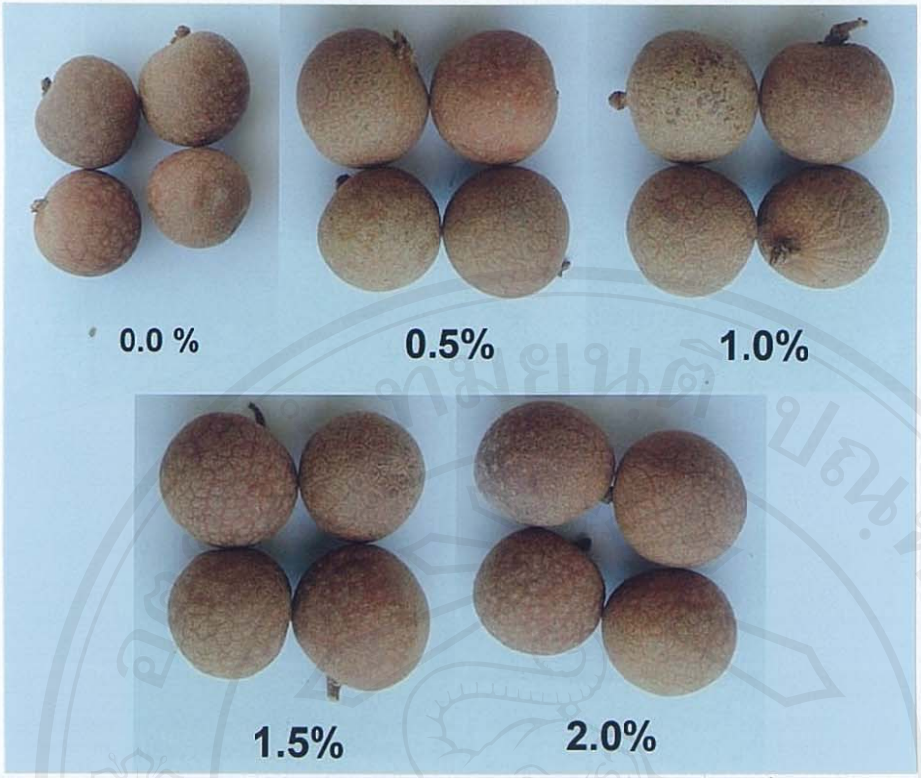
**วิธีการ**

การเคลือบผิวลำไยอบแห้ง โดยจุ่มผลลำไยอบแห้งในสารละลาย canauba wax ในความเข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 วินาที แล้วนำไปผึ่งบนกระดาษบางสีขาวจนผลแห้งซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 1 ที่ให้ผลในการเก็บรักษาดีและปริมาณกรดอีลาจิกที่ดีที่สุด

ทำการบันทึกผลการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 เป็นเวลา 8 เดือน โดยทำการบันทึกดังต่อไปนี้

1. การเปลี่ยนแปลงที่สังเกตได้ด้วยตาเปล่า
2. สีผิวเปลือก
3. ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (total soluble solids; TSS)
4. เปอร์เซ็นต์การเน่าเสีย
5. เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของผล
6. ปริมาณ total phenolic compounds
7. ปริมาณกรดอีลาจิก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved




**ภาพ 8** ลักษณะของผลลำไยที่เคลือบด้วยสารละลาย canauba wax ที่ความเข้มข้นต่างๆ แล้วเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved