บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบและอุปกรณ์

3.1.1 วัตถุดิบและสารเคมีที่ใช้ในการสกัดสารป้องกันการหืน

- สมุนไพรโรสแมรี่ (Rosemary, มูลนิธิโครงการหลวง จ.เชียงใหม่)
- สมุนไพรเสจ (Sage, มูลนิธิโครงการหลวง จ.เชียงใหม่)
- สมุนไพรทาย์ม (Thyme, มูลนิธิโครงการหลวง จ.เชียงใหม่)
- เมทานอล (Methanol ; CH_3OH, Merck, Germany)
- อะซิโตน (Acetone ; C_3H_6O, Merck, Germany)
- เฮกเซน (Hexane ; C_6H_{14}, J.T.Baker, USA)
- น้ำ (water, H_2O, โพสตาร์, เชียงใหม่)
- ผงถ่าน (Activated Carbon)

3.1.2 อุปกรณ์ใช้ในการสกัดสารป้องกันการหืน

- เครื่องสกัดสารป้องกันการหืนแบบประยุกต์
- เครื่องระเหยสุญญากาศ (Buchi, Switzerland)
- ชุดกลั่นน้ำมันหอมระเหย ขนาด 5 ลิตร
- เครื่องให้ความร้อน (Heating mantle, England)
- เครื่องกรองสุญญากาศ (Vacuum pump, Thomas, USA)
- เครื่องปั่นผสม (Blender, National : Model MX-T1PN, Taiwan)
- เครื่องชั่งไฟฟ้า ทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Semi-accurate balance, Mettler : Model BB120, Switzerland)
- เครื่องชั่งไฟฟ้า ทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Analytical balance, Precisa : Model XT320M, Switzerland)
- กระดาษกรองเบอร์ 1 และ 4 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร (Whatman No. 1 และ 4)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

- ตู้ดูดควัน (TOPLAB, Thailand)
- เตาไฟฟ้า (Hot plate stirrer : Model HTS-1003, Japan)

3.1.3 สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้วัด antioxidant activity

- 1, 1 - diphenyl - 2 - picrylhydrazyl (DPPH radical ; $C_{18}H_{12}N_5O_6$, Sigma, Germany)
- เมทานอล (Methanol ; CH_3OH, Merck, Germany)
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer : Model Biomate 5,USA)

3.1.4 วัตถุดิบและสารเคมีที่ใช้ในการผลิตกุนเชียงหมู

- เนื้อหมูแดง (ตลาดสามแยก จ. เชียงใหม่)
- มันแข็ง (ตลาดสามแยก จ.เชียงใหม่)
- น้ำตาลทรายขาว (ตรามิตรผล)
- เกลือ (ตราปรุงทิพย์)
- แป้งข้าวโพด
- ผงเพรก (เกลือของไนไตรท์ ไนเตรต และอีริทอร์เบท)
- โซเดียมอีริทอร์เบต (Sodium erythorbate, Food grade, Lab P&P, Thailand)
- โพแทสเซียมซอร์เบท (Potassium sorbate ; $C_6H_7KO_2$, Food grade, Lab P&P, Thailand)
- ไส้เทียมคอลลาเจน เบอร์ 230
- เครื่องผสม (Mixer, Kitchen Aid : Model 5K5SS, USA)
- เครื่องทอด (TEFAL UNIVERSALIS 1000)
- เครื่องอัดไส้ (Stuffer, Thailand)
- เครื่องปิดผนึกแบบสุญญากาศ (Vacuum Sealer, Audionvac : Model VM2010, USA)
- ถุงพลาสติกสำหรับบรรจุผลิตภัณฑ์ เป็นถุงสามชั้น ชั้นในเป็นโพลิเอทิลีนชนิดความหนาแน่นต่ำเชิงเส้น ชั้นกลางเป็นกาว และชั้นนอกเป็นไนลอน (Nylon/EAA/LLDPE)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.1.5 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพ

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ

- เครื่องวัดสี (MINOLTA Chroma meter : Model CR-300, Japan)
- เครื่องวัดเนื้อสัมผัส (Texture Analyser : Model TA.XT.plus, Japan)

2. อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี

- เครื่องวิเคราะห์ค่าน้ำที่เป็นประโยชน์ (Aqualab : Model CX3TE, USA)
- ตู้อบลมร้อน (Hot air oven, Model : ULM500, Germany)
- โถแก้วดูดความชื้น (Glass desiccator)

3. อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพทางจุลชีววิทยา

- เครื่องตีป่น (Laboratory Blender Stomacher : Model 400, Seward Chemical., England)
- ตู้บ่มเชื้อ (Incubator, Gallenkamp, England)
- หม้อนึ่งความดัน (Autoclave, Gallenkamp, England)
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Heating water bath, Gallenkamp, England)
- ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar air flow, Model : CF43S, Australia)
- เครื่องผสมแบบหมุนวน (Vortex geniez, Scientific Industries : Model G560E, Germany)
- เครื่องไมโครเวฟ (Microwave, SHARP, Japan)

4. อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพทางด้านประสาทสัมผัส

- ชุดอุปกรณ์ทดสอบชิม
- แบบทดสอบทางประสาทสัมผัส (รายละเอียดในภาคผนวก ค.)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.1.6 สารเคมี

- คลอโรฟอร์ม (Chloroform ; $CHCl_3$, Lab- scan, Ireland)
- กรดอะซิติก (Glacial acetic acid ; CH_3COOH, Merck, Germany)
- โพแทสเซียมไอโอไดด์ (Potassium iodide, Aiax Finechem, New Zealand)
- โซเดียมโธโอซัลเฟต (Sodium thiosulphate ; $Na_2SO_3.5H_2O$, Fisher, USA)
- โซเดียมซัลเฟตที่ปราศจากน้ำ (Sodium sulfate anhydrous ; Na_2SO_4, Merck, Germany)
- โพแทสเซียมไดโครเมต (Potassium dichromate; $K_2Cr_2O_7$, Scharlau, Spain)
- น้ำแป้งความเข้มข้นร้อยละ 1 (1% Starch solution, Merck, Germany)
- อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ (Becto ® PCA Plate Count Agar, Difco™, USA)
- อาหารเลี้ยงเชื้อราและยีสต์ (Becto ® PDA Plate Count Agar, Difco™, USA)
- เปปโตน (Peptone, Difco™,USA)
- กรดทาร์ทาริก (Tartaric acid ; $C_4H_6O_6$, Merck, Germany)
- Lauryl Tryptose Broth (Difco™, USA)
- Brilliant Green Bile Broth ร้อยละ 2 (Difco™, USA)
- EMB (Merck, Gremany)
- แอลกอฮอล์ ความเข้มข้นร้อยละ 70

3.1.7 เครื่องประมวลผลทางสถิติ

- เครื่องคอมพิวเตอร์ส่วนบุคคล
- โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS Version 10.0
- โปรแกรมสำเร็จรูป Microsoft excel

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การเตรียมวัตถุดิบก่อนการสกัด

ตาราง 3.1 แหล่งวัตถุดิบของสมุนไพรสดจากศูนย์โครงการมูลนิธิโครงการหลวง

ชนิดของสมุนไพร	แหล่งเพาะปลูก	จังหวัด
โรสแมรี่ (*Rosmarinus officinalis* L.)	ศูนย์โครงการหลวงห้วยน้ำริน	จ. เชียงราย
เสจ (*Salvia officinalis* L.)	ศูนย์โครงการหลวงปางดะ	จ.เชียงใหม่
ทาย์ม (*Thymus vulgaris* L.)	ศูนย์โครงการหลวงขุนแปะ	จ.เชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 3.2 แหล่งวัตถุดิบของสมุนไพรแห้งจากศูนย์โครงการมูลนิธิโครงการหลวง

ชนิดของสมุนไพร	แหล่งปลูก	จังหวัด	หมายเหตุ
โรสแมรี่ (*Rosmarinus officinalis* L.)	ศูนย์โครงการหลวงห้วยน้ำริน	จ. เชียงราย	อบแห้งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 15 ชั่วโมง
เสจ (*Salvia officinalis* L.)	ศูนย์โครงการหลวงปางดะ	จ. เชียงใหม่	อบแห้งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 15 ชั่วโมง
ทาย์ม (*Thymus vulgaris* L.)	ศูนย์โครงการหลวงขุนแปะ	จ.เชียงใหม่	อบแห้งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 15 ชั่วโมง

ในการคัดเลือกแหล่งวัตถุดิบของพืชสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด คือ โรสแมรี่ เสจ และทาย์ม พิจารณาจากภูมิอากาศ และภูมิประเทศ ที่เหมาะสมในการเพาะปลูกพืชสมุนไพรให้ได้ผลผลิตที่มีคุณภาพ และสม่ำเสมอมากที่สุด ซึ่งจะเห็นได้ว่าสมุนไพรแต่ละชนิดนั้นมีแหล่งเพาะปลูกที่แตกต่างกัน ดังตาราง 3.2 เนื่องจากสมุนไพรแต่ละชนิดมีการเจริญเติบโตในภูมิอากาศ และภูมิประเทศที่แตกต่างกัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.2 งานวิจัยออกเป็น 3 ส่วน รายละเอียดดังต่อไปนี้

ส่วนที่ 1 ศึกษาสารสกัดป้องกันการหืนจากพืชสมุนไพร ในการนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารที่มีไขมันหรือน้ำมันเป็นองค์ประกอบ

1.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารป้องกันการหืนจากพืชสมุนไพร

1.1.1 การสกัดสารป้องกันการหืนด้วยตัวทำละลาย

นำใบสดและแห้งของสมุนไพรโรสแมรี่ เสจ และทาย์ม มาทำการสกัดสารป้องกันการหืนด้วยตัวทำละลายแตกต่างกัน 5 ชนิด คือ น้ำ เมทานอล เมทานอลต่อน้ำ (5:1) อะซิโตน และเฮกเซน โดยดัดแปลงวิธีการสกัดจาก Chi–Tang *et al*. (1994) ซึ่งวิธีการสกัดแสดงดังภาพ 3.2 และเครื่องมือที่ใช้ในการสกัด ดังภาพ ก-1

1.1.2 การสกัดน้ำมันหอมระเหยด้วยการกลั่นด้วยไอน้ำ

นำสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด ทั้งใบสดและแห้ง ล้างด้วยน้ำสะอาด

↓

หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ
เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการกลั่น

↓

ใช้เวลาในการกลั่น 3 – 5 ชั่วโมง

↓

น้ำมันหอมระเหยและไอน้ำจะกลั่นตัวลงใน Condensing chamber

↓

เก็บน้ำมันหอมระเหยที่ได้ใส่ในขวดสีชา
เพื่อป้องกันการสลายของสารป้องกันการหืน

↓

เก็บที่อุณหภูมิต่ำ

ภาพ 3.1 การสกัดน้ำมันหอมระเหยด้วยการกลั่นด้วยไอน้ำ

ที่มา : รัตติกร (2544)

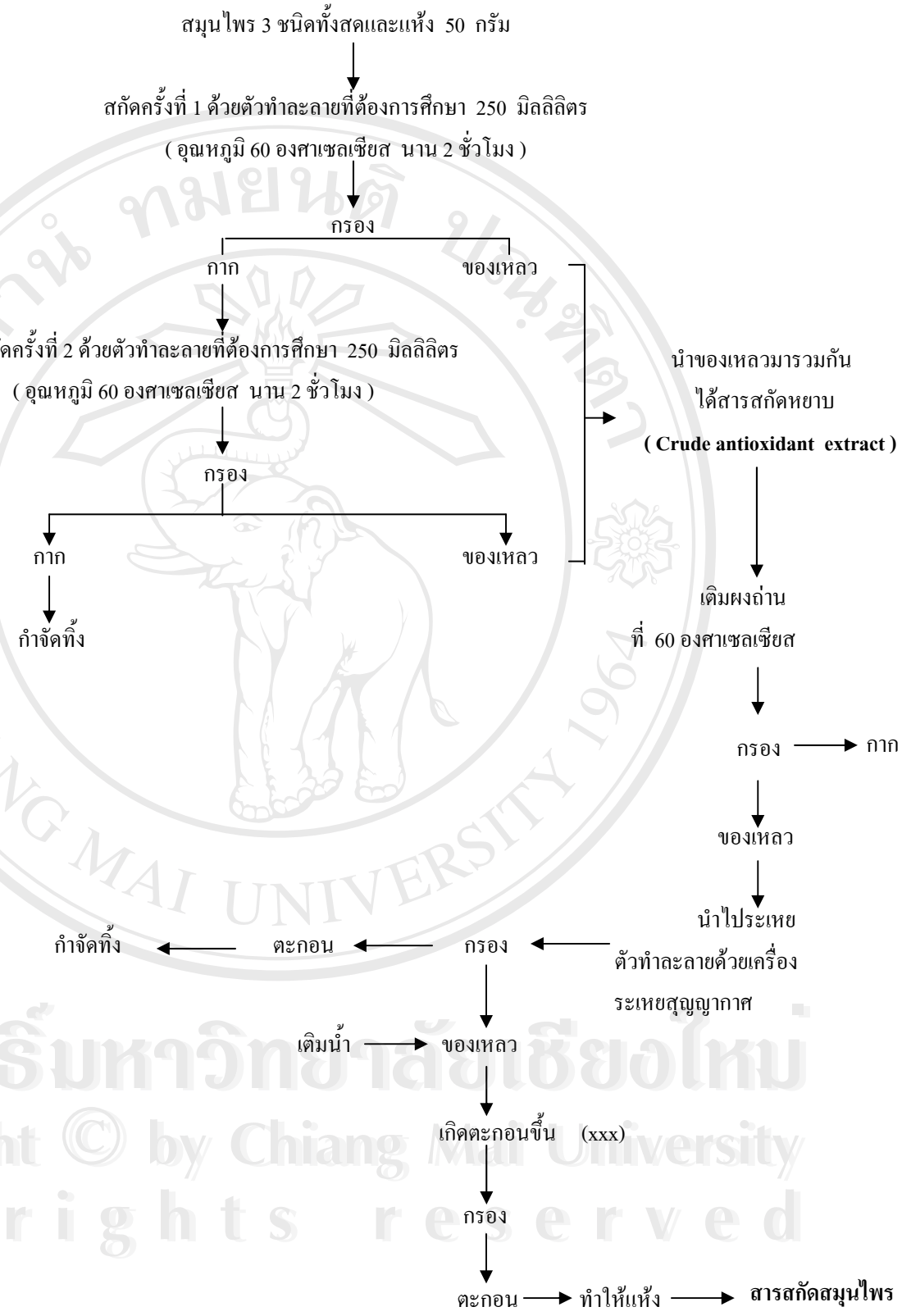
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

น้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้ ดังภาพ ก-4 สามารถระเหยได้ที่อุณหภูมิปกติ น้ำมันหอมระเหยที่เตรียมใหม่ๆ มีลักษณะใส และไม่มีสี แต่จะมีสีคล้ำขึ้นเมื่อตั้งทิ้งไว้ถูกแสง และอากาศ เนื่องจากถูกออกซิไดซ์ เพื่อป้องกันสิ่งเหล่านี้จึงควรเก็บน้ำมันหอมระเหยที่อุณหภูมิต่ำและแห้งในภาชนะบรรจุสีชา มีจุกปิดแน่น และควรบรรจุให้เต็มภาชนะบรรจุเพื่อไม่ให้มีช่องว่างอากาศอยู่

จากนั้นนำสารสกัดป้องกันการหืนทั้งหมดมาหาคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระโดยแสดงผลเป็นค่า IC_{50} (มิลลิกรัม/กิโลกรัม, ppm) ด้วยวิธี Spectrophotometry assay : Radical Scavenging Activity on DPPH Radical (ดัดแปลงจาก Lu and Foo, 2001 และสันติ, 2544) พร้อมทั้งเปรียบเทียบปริมาณสารสกัด (ร้อยละ) เพื่อคัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารป้องกันการหืนจากพืชสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด

<u>หมายเหตุ</u> : ถ้าสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารป้องกันการหืนเป็นสภาวะที่สกัดด้วยตัวทำละลาย จะต้องส่งตัวอย่างตรวจวิเคราะห์ปริมาณตัวทำละลายตกค้าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 3.2 การสกัดสารป้องกันการหืนด้วยตัวทำละลาย

ที่มา : ดัดแปลงจาก Chi–Tang *et al*. (1994)

(xxx) = หลักการของสารละลายคอลลอยด์ คือ การเติมน้ำลงไปแล้วเกิดตะกอนขึ้น มีสาเหตุมาจากการทำให้ขั้วหรือประจุหายไป โดยการเติมสารที่มีประจุตรงกันข้ามกับอนุภาคคอลลอยด์ลงไป จึงเกิดตะกอนขึ้น ดังภาพ ก-3

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2 เปรียบเทียบคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดป้องกันการหืนจากพืชสมุนไพรกับสารป้องกันการหืนสังเคราะห์

กำหนดสิ่งทดลองดังนี้

- สารป้องกันการหืนสังเคราะห์ BHA
- สารป้องกันการหืนสังเคราะห์ BHT
- สารสกัดป้องกันการหืนจากพืชสมุนไพร

จากนั้นนำตัวอย่างทั้งหมดมาวิเคราะห์คุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ โดยแสดงผลเป็นค่า IC_{50} ด้วยวิธี Spectrophotometry assay : Radical Scavenging Activity on DPPH Radical

1.3 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อความคงตัวของสารสกัดป้องกันการหืนจากพืชสมุนไพร

1.3.1 ผลของแสงที่มีต่อความคงตัวของสารสกัดป้องกันการหืน

นำสารสกัดป้องกันการหืนเก็บรักษาในภาชนะบรรจุแบบใสและแบบสีชา เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (32±5 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 28 วัน จากนั้นนำมาวิเคราะห์หาคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี Spectrophotometry assay : Radical Scavenging Activity on DPPH Radical เพื่อนำผลการวิเคราะห์มาใช้ในการศึกษาผลของปัจจัยอื่นต่อไป

1.3.2 ผลของอากาศที่มีต่อความคงตัวของสารสกัดป้องกันการหืน

นำสารสกัดป้องกันการหืนมาทำการศึกษาผลของอากาศต่อความคงตัว ซึ่งจะเปรียบเทียบสารสกัดที่สัมผัสและไม่สัมผัสกับอากาศ ในภาชนะบรรจุที่ได้จากการศึกษาปัจจัยข้อ 1.3.1 เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 28 วัน จากนั้นนำมาวิเคราะห์หาคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี Spectrophotometry assay : Radical Scavenging Activity on DPPH Radical เพื่อนำผลการวิเคราะห์มาใช้ในการศึกษาผลของปัจจัยอื่นต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

1.3.3 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อความคงตัวของสารสกัดป้องกันการหืน

นำสารสกัดป้องกันการหืนเก็บรักษาในสภาวะที่เหมาะสมที่คัดเลือกได้จากข้อ 1.3.1 และ 1.3.2 ตามลำดับ มาศึกษาผลของอุณหภูมิต่อไป โดยเก็บสารสกัดที่อุณหภูมิห้อง (32±5 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน จากนั้นนำมาวิเคราะห์หาคุณสมบัติใน

การต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี Spectrophotometry assay : Radical Scavenging Activity on DPPH Radical

ส่วนที่ 2. ศึกษาปริมาณที่เหมาะสมของสารสกัดป้องกันการหืนจากพืชสมุนไพร ในการนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารที่มีไขมันหรือน้ำมันเป็นองค์ประกอบ

นำสารสกัดป้องกันการหืนที่ผ่านการวิเคราะห์หาปริมาณตัวทำละลายตกค้าง มาศึกษาปริมาณที่เหมาะสม ในการนำไปประยุกต์ใช้กับผลิตภัณฑ์อาหารที่มีไขมันหรือน้ำมันเป็นองค์ประกอบ

กำหนดปริมาณของสารสกัดป้องกันการหืนดังนี้

- ปริมาณ 0 ppm (ชุดควบคุม)
- ปริมาณ 100 ppm
- ปริมาณ 200 ppm
- ปริมาณ 300 ppm
- ปริมาณ 400 ppm

นำปริมาณที่กำหนดไว้ข้างต้น เติมลงในผลิตภัณฑ์เนื้อประเภทกุนเชียง กรรมวิธีการผลิตดังภาพ จ. เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยสุ่มตัวอย่างที่ 0, 7, 14, 21 และ 28 วัน ตามลำดับ เพื่อวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ ทางเคมี โดยวางแผนการทดลองแบบ Factorial experiment in randomized complete block design และการยอมรับคุณภาพทางประสาทสัมผัสของผู้บริโภคโดยวางแผนการทดลองแบบ Randomized complete block design (RCBD)

การวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ (Physical analysis)

- วัดค่าสี L, a และ b โดยเครื่องวัดสี MINOLTA camera meter CR-300 (MINOLTA camera, CO., Ltd., Japan.)

การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี (Chemical analysis)

- ค่าเปอร์ออกไซด์ โดยวิธีของ FAO (1986)
- ค่าน้ำที่เป็นประโยชน์ โดยวิธีของ AOAC (2000)
- ค่าปริมาณความชื้น โดยวิธีของ AOAC (2000)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การวิเคราะห์คุณภาพทางด้านประสาทสัมผัส (Sensory evaluation)

- โดยใช้ 5 - point hedonic scale scoring test โดยวิธีของไพโรจน์ (2545)
  9 - point hedonic scale scoring test โดยวิธีของไพโรจน์ (2545)

ส่วนที่ 3 ศึกษาอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์อาหารที่เติมสารสกัดป้องกันการหืนจากพืชสมุนไพร

เติมสารสกัดป้องกันการหืนในปริมาณที่เหมาะสมจากการศึกษาในส่วนที่ 2 ในผลิตภัณฑ์เนื้อประเภทกุนเชียง จากนั้นนำผลิตภัณฑ์กุนเชียงมาศึกษาอายุการเก็บรักษา

กำหนดให้

อุณหภูมิที่ทำการศึกษา คือ 30 , 40 และ 55 องศาเซลเซียส

สุ่มตัวอย่างที่การเก็บรักษา 0, 2 , 4, 8, 12, 16, 20 และ 24 สัปดาห์ ตามลำดับ เพื่อวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ ทางเคมี และทางจุลินทรีย์ โดยวางแผนการทดลองแบบ Factorial experiment in completely randomized design และการยอมรับคุณภาพทางประสาทสัมผัสของผู้บริโภค โดยวางแผนการทดลองแบบ Randomized complete block design (RCBD)

การวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ (Physical analysis)

- วัดค่า L, a และ b โดยเครื่องวัดสี MINOLTA camera meter CR-300 (MINOLTA camera, CO., Ltd., Japan.)
- วัดค่าแรงเฉือน โดยเครื่องวัดเนื้อสัมผัส (Texture Analyser : Model TA.XT.plus, Japan)

การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี (Chemical analysis)

- ค่าเปอร์ออกไซด์ โดยวิธีของ FAO (1986)
- ค่าน้ำที่เป็นประโยชน์ โดยวิธีของ AOAC (2000)
- ค่าปริมาณความชื้น โดยวิธีของ AOAC (2000)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การวิเคราะห์คุณภาพทางด้านจุลชีววิทยา (Microbial analysis)

- เชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total Plate Count) โดยวิธี Pour plate (AOAC, 2000)
- เชื้อยีสต์และรา (Yeast and Mold) โดยวิธี Pour plate (AOAC, 2000)
- เชื้อโคลิฟอร์มและอีโคไล โดยวิธี MPN (AOAC, 2000)
  (Coliform and *E.coli*)

การวิเคราะห์คุณภาพทางด้านประสาทสัมผัส (Sensory evaluation)

- โดยใช้ 5 - point hedonic scale scoring test โดยวิธีของไพโรจน์ (2545)
  9 - point hedonic scale scoring test โดยวิธีของไพโรจน์ (2545)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved