

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีทดลอง

3.1 วัสดุดิบ

1. น้ำผึ้งดอกทานตะวันตกผลึก ปริมาณการตกผลึก $\frac{3}{4}$ ของภาชนะบรรจุ เมื่อเหวี่ยงแยกพบว่าส่วนที่เป็นของแข็งคิดเป็นร้อยละ 40-45 ของน้ำหนักทั้งหมด โดยใช้น้ำผึ้งจาก สุภาพาร์มผึ้ง อ.แม่ริม จ.เชียงใหม่

3.2 สารเคมี

1. น้ำกลั่น
2. Methanol (MeOH : CH_3OH) (Mallinkrodt, Canada)
3. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma, Australia)
4. Glacial acetic acid (CH_3COOH) (LABSCAN, Ireland)
5. Sodium Chloride (NaCl) (Merck, Germany)
6. Potassium iodide (Ajex Finechem, Australia)
7. Sodium acetate anhydrous (CH_3COONa) (Fluka, USA)
8. Soluble starch (Ajex Finechem, Australia)
9. Iron (III) Chloride anhydrous (FeCl_3) (Ajex Finechem, Australia)
10. Trichloro acetic acid (CCl_3COOH) (Merck, Germany)
11. Barbituric acid ($\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_3$) (Merck, Germany)
12. Potassium ferricyanide (Ajex Finechem, Australia)
13. *P*-Toluidine (Fluka, USA)
14. Sodium Phosphate Monobasic Dihydrate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (RFCL limited, India)
15. Sodium Phosphate Dibasic anhydrous (Na_2HPO_4) (RFCL limited, India)

3.3 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องกำเนิดคลื่นอัลตราโซนิก กำลังสูง (High Intensity Ultrasonic Processor) (รุ่น VC/VCX 130, 500, 750 ผลิตภัณฑ์ Sonic, Vibra cell)
2. เครื่อง Color Quest II Colorimeter (Choma Meter CR300 Series, Minolta, Japan)
3. เครื่องวัดความหนืด Brookfield Viscometer (รุ่น LVD-II+, Brookfield Engineering Laboratories, Inc., Germany)
4. เครื่อง UV visible spectrometer (UV WINLAB, PerkinElmer, Thailand)
5. กล้องจุลทรรศน์ Light microscope (CHK2-F-GS Olympus Optical Co., Ltd., Japan)
6. Water Activity Meter (Aqua Lab รุ่น TE3, Decagon Devices, Inc Pullman, USA)
7. pH Meter (Cosort C380, Belgium)
8. ตู้อบสูญญากาศ (Binder VD23, USA)
9. เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) (Hermle, Germany)
10. โถดูดความชื้น (Desiccator)
11. ตู้เย็น (Refrigerator)
12. Hand Refractometer (N-10E, Atago Co., Ltd., Japan)
13. Water Bath
14. เครื่องแยกของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

3.4 วิธีการศึกษา

การเตรียมตัวอย่าง

นำน้ำผึ้งดอกทานตะวันที่ตกผลึก ซึ่งมีปริมาณการตกผลึก $\frac{1}{4}$ ของภาชนะบรรจุ คนจนกระทั่งส่วนที่เป็นของแข็งและของเหลวผสมเข้ากัน เพื่อให้ได้สัดส่วนของผลึกและของเหลวเท่ากันก่อนแบ่งน้ำผึ้งบรรจุลงในขวดแก้วปริมาตร 150 มิลลิลิตร จำนวน 100 ขวด

ตอนที่ 1 วิเคราะห์สมบัติน้ำผึ้งดอกทานตะวันที่ตกผลึกเริ่มต้น

นำน้ำผึ้งดอกทานตะวันตกผลึกซึ่งบรรจุในขวดปริมาตร 150 มิลลิลิตร วิเคราะห์สมบัติทางเคมีกายภาพ เพื่อศึกษาสมบัติทางเคมีกายภาพเริ่มต้นของน้ำผึ้งก่อนจะนำไปละลายผลึก โดยวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและเคมี ดังนี้

1.1 การวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ

- ค่าสี โดยใช้เครื่อง Color Quest II Colorimeter (Chroma meter CR 300 Series, Japan)
- ความหนืด โดยใช้เครื่อง Brookfield Viscometer (รุ่น LVDV-II+Brookfield Engineering Laboratories, Inc., Germany)
- รูปร่างของผลึกในน้ำผึ้ง โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ (Light microscopy) (CHK2-F-GS Olympus Optical Co., Ltd., Japan) กำลังขยาย 40 เท่า

1.2 การวิเคราะห์สมบัติทางเคมี

- ปริมาณความชื้น (AOAC, 2000)
- ค่าวอเตอร์แอกทิวิตี (a_w) โดยใช้ Water Activity Meter (AquaLab series 3, USA)
- ค่า pH โดยใช้ pH meter (AOAC, 2000)
- ปริมาณของแข็งทั้งหมด (AOAC, 2000)
- ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด โดยใช้ Hand Refractometer (N-10E, Atago Co., Ltd., Japan)
- ปริมาณกลูโคสและฟรักโทส โดยใช้เครื่องแยกของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) (AOAC, 2000)
- ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้วิธี DPPH radical scavenging activity และวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP) (Ferreiral *et al.*, 2009)

- เอนไซม์ไคเอสเทส (diastase) (AOAC, 2000)
- ปริมาณไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัลฟิวรัล (hydroxymethylfurfural) (AOAC, 2000)

ตอนที่ 2 การละลายผลึกน้ำผึ้งโดยใช้คลื่นอัลตราซาวด์กำลังสูง

นำน้ำผึ้งดอกทานตะวันตกผลึกที่บรรจุในขวดปริมาตร 150 มิลลิลิตร มาละลายผลึกโดยใช้คลื่นอัลตราซาวด์กำลังสูง ความถี่ 20 กิโลเฮิร์ตซ์ โดยแปรระดับของแอมพลิจูด 5 ระดับ คือ ร้อยละ 20 25 30 35 และ 40 ซึ่งแต่ละระดับมีความสูงของแอมพลิจูดเท่ากับ 15.00 18.75 22.50 26.25 และ 30.00 ไมโครเมตร ตามลำดับ จนกระทั่งผลึกละลายหมด และวิเคราะห์การแทรกผ่านความร้อนของคลื่นอัลตราซาวด์กำลังสูง และสมบัติทางเคมีกายภาพของน้ำผึ้งดอกทานตะวันที่ผ่านการละลายผลึก

2.1 วิเคราะห์สมบัติการแทรกผ่านความร้อนของคลื่นอัลตราซาวด์กำลังสูง

จากการละลายผลึกโดยใช้คลื่นอัลตราซาวด์กำลังสูง ความถี่ 20 กิโลเฮิร์ตซ์ โดยแปรระดับแอมพลิจูด 5 ระดับ วัดอุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงระหว่างทุก 5 นาที โดยสายเทอร์โมคัปเปิลซึ่งติดตั้งในน้ำผึ้ง 4 ตำแหน่ง ในแนวระนาบเดียวกัน ได้แก่ จุดศูนย์กลางของบีกเกอร์ ที่ระยะ $\frac{1}{2}$ $\frac{1}{4}$ และ $\frac{3}{4}$ ของรัศมีของบีกเกอร์ และ 3 ตำแหน่ง ในแนวรัศมีเดียวกัน ได้แก่ ที่ระดับความลึก $\frac{1}{4}$ $\frac{1}{2}$ และ $\frac{3}{4}$ ของตัวอย่าง จนกระทั่งผลึกในน้ำผึ้งละลายหมด หาอัตราการแทรกผ่านความร้อนของคลื่นอัลตราซาวด์

2.2 การละลายผลึกน้ำผึ้งโดยใช้คลื่นอัลตราซาวด์กำลังสูง

นำน้ำผึ้งดอกทานตะวันตกผลึกที่บรรจุในขวดปริมาตร 150 มิลลิลิตร วัดอุณหภูมิเริ่มต้น จากนั้นละลายผลึกโดยใช้คลื่นอัลตราซาวด์กำลังสูง โดยแปรระดับแอมพลิจูดของคลื่นอัลตราซาวด์ 5 ระดับ จนกระทั่งผลึกของน้ำผึ้งละลายหมดโดยการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 40 เท่า วัดอุณหภูมิสุดท้าย บันทึกเวลาทั้งหมดที่ใช้ละลายผลึก ทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและเคมี วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) และหาสถานะที่เหมาะสมในการละลายผลึกน้ำผึ้งดอกทานตะวันโดยวิธีอัลตราซาวด์ จากผลการวิเคราะห์ค่าสี ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ เอนไซม์ไคเอสเทส และปริมาณ ไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัลฟิวรัล

2.2.1 การวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ

- ค่าสี โดยใช้เครื่อง Color Quest II Colorimeter (Chroma meter CR 300 Series, Japan)
- ความหนืด โดยใช้เครื่อง Brookfield Viscometer (รุ่น LV DV-II+Brookfield Engineering Laboratories, Inc., Germany)
- รูปร่างของผลึกในน้ำผึ้ง โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ (Light microscopy) (CHK2-F-GS Olympus Optical Co., Ltd., Japan)

2.2.2 การวิเคราะห์สมบัติทางเคมี

- ปริมาณความชื้น (AOAC, 2000)
- ค่าวอเตอร์แอกทิวิตี (a_w) โดยใช้เครื่อง Water Activity Meter (AquaLab series 3, USA)
- ค่า pH โดยใช้ pH meter (AOAC, 2000)
- ปริมาณของแข็งทั้งหมด (AOAC, 2000)
- ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด โดยใช้ Hand Refractometer (N-10E, Atago Co., Ltd., Japan)
- ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้วิธี DPPH radical scavenging activity และวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP) (Ferreiral *et al.*, 2009)
- เอนไซม์ไดเอสเทส (diastase) (AOAC, 2000)
- ปริมาณไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัลฟิวรัล (hydroxymethylfurfural) (AOAC, 2000)

2.2.3 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

- การวิเคราะห์ ANOVA โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ SPSS
- วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (ไพโรจน์, 2535)

ตอนที่ 3 การละลายผลึกน้ำผึ้งโดยการแช่ในอ่างน้ำร้อน

นำน้ำผึ้งดอกทานตะวันตกลูกที่บรรจุในขวดปริมาตร 150 มิลลิลิตร วัตถุประสงค์เริ่มต้นจากนั้นละลายโดยการให้ความร้อนด้วยอ่างน้ำร้อน ที่อุณหภูมิ 3 ระดับ คือ 40 50 และ 60 องศาเซลเซียส จนกระทั่งผลึกของน้ำผึ้งละลายหมดโดยการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 40 เท่า บันทึกเวลาทั้งหมดที่ใช้ละลายผลึก ทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและเคมี

วางแผนการทดลองแบบ CRD วิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและเคมี และหาสภาวะที่เหมาะสมในการละลายผลึกน้ำผึ้งดอกทานตะวัน โดยการแช่ในอ่างน้ำร้อน จากผลการวิเคราะห์ค่าสี ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ เอนไซม์ไดเอสเทส และปริมาณไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัล

3.1 การวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ

- ค่าสี โดยใช้เครื่อง Color Quest II Colorimeter (Chroma meter CR 300 Series, Japan)
- ความหนืด โดยใช้เครื่อง Brookfield Viscometer (รุ่น LVDV-II+Brookfield Engineering Laboratories, Inc., Germany)
- รูปร่างของผลึกในน้ำผึ้ง โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ (Light microscopy) (CHK2-F-GS Olympus Optical Co., Ltd., Japan)

3.2 การวิเคราะห์สมบัติทางเคมี

- ปริมาณความชื้น (AOAC, 2000)
- ค่าวอเตอร์แอกทิวิตี (a_w) โดยใช้เครื่อง Water Activity Meter (AquaLab series 3, USA)
- ค่า pH โดยใช้ pH meter (AOAC, 2000)
- ปริมาณของแข็งทั้งหมด (AOAC, 2000)
- ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด โดยใช้ Hand Refractometer (N-10E, Atago Co., Ltd., Japan)
- ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้วิธี DPPH radical scavenging activity และวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP) (Ferreiral *et al.*, 2009)
- เอนไซม์ไดเอสเทส (diastase) (AOAC, 2000)
- ปริมาณไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัล (hydroxymethylfurfural) (AOAC, 2000)

3.3 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

- การวิเคราะห์ ANOVA โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ SPSS
- วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (ไพโรจน์, 2535)

ตอนที่ 4 การเปรียบเทียบสมบัติทางกายภาพ เคมี และทางประสาทสัมผัสของน้ำผึ้งที่ผ่านการละลายผลึก

4.1 การเปรียบเทียบสมบัติทางกายภาพและเคมี

เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ทางกายภาพและเคมีของน้ำผึ้งดอกทานตะวันที่ผ่านการละลายผลึกโดยการใช้คลื่นอัลตราซาวด์กำลังสูง ณ ระดับแอมพลิจูดที่เหมาะสม และน้ำผึ้งดอกทานตะวันที่ผ่านการละลายผลึกโดยการแช่ในอ่างน้ำร้อน ณ ระดับอุณหภูมิที่เหมาะสม วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's New Multiple Range Test (ไพโรจน์, 2535) เพื่อหาวิธีการละลายผลึกน้ำผึ้งที่เหมาะสม

4.1.1 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

- การวิเคราะห์ ANOVA โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ SPSS
- วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (ไพโรจน์, 2535)

4.2 เปรียบเทียบผลการทดสอบทางประสาทสัมผัส

เปรียบเทียบคะแนนการยอมรับทางประสาทสัมผัสที่ผู้บริโภคมีต่อน้ำผึ้งดอกทานตะวันที่ผ่านการละลายผลึกโดยการใช้คลื่นอัลตราซาวด์กำลังสูง ณ สภาวะที่เหมาะสม และน้ำผึ้งดอกทานตะวันที่ผ่านการละลายผลึกโดยการแช่ในอ่างน้ำร้อน ณ สภาวะที่เหมาะสม วางแผนการทดสอบแบบ RCBD ใช้ผู้ทดสอบชิม จำนวน 50 คน ด้วยวิธี 9 points Hedonic scoring test (ไพโรจน์, 2535) เพื่อประเมินความชอบในลักษณะต่างๆ (สี กลิ่น กลิ่นรส และความชอบรวม) วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's New Multiple Range Test (ไพโรจน์, 2535)

4.2.1 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

- การวิเคราะห์ ANOVA โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ SPSS
- วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (ไพโรจน์, 2535)

ตอนที่ 5 ศึกษาการตกผลึกซ้ำของน้ำผึ้งดอกทานตะวัน

นำน้ำผึ้งดอกทานตะวันที่ผ่านการละลายผลึกโดยการใช้คลื่นอัลตราซาวด์กำลังสูง ณ สภาวะที่เหมาะสม และที่ผ่านการละลายผลึกโดยการแช่ในอ่างน้ำร้อน ณ สภาวะที่เหมาะสม จัดเก็บที่อุณหภูมิ 3 ระดับ 5 10 และ 25 องศาเซลเซียส สุ่มตัวอย่างทุก 5 วัน สังเกตด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40 เท่า จนกว่าจะพบการเกิดผลึก เปรียบเทียบอัตราการเกิดผลึกและลักษณะรูปทรงของผลึก

5.1 การวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ

- รูปทรงของผลึกในน้ำผึ้ง โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ (Light microscopy) (CHK2-F-GS Olympus Optical Co., Ltd., Japan) กำลังขยาย 40 เท่า