บทที่ 3

การดำเนินการวิจัย

วัตถุดิบ

1. มะพร้าวแก่อายุประมาณ 3 – 5 เดือน จาก ตำบลบ้านไร่ทางตรง อำเภอศรีราชา จ.ชลบุรี
2. น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ที่ผ่านกรรมวิธีการผลิตโดยการบีบเย็น ได้รับความอนุเคราะห์มาจากห้างหุ้นส่วนจำกัด สมายเวย์ คอร์โพเรชั่น (2008) ตำบลห้วยกะปิ อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี
3. ตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารที่มีส่วนประกอบของน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ที่ผ่านกรรมวิธีการผลิตโดยการบีบเย็น
4. น้ำมันรำข้าวผสมกระเทียม ได้รับความอนุเคราะห์มาจากบริษัท อัลฟ่าวัน ประเทศนิวซีแลนด์

สารเคมี

1. โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)
2. เมทานอล (CH_3OH)
3. กรดแกลลิก ($C_7H_6O_5$)
4. Folin-ciocalteu reagent
5. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)
6. 6-hydroxy-2,5,7,8,-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox)
7. โพตัสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH)
8. ฟีนอฟทาลีน (Phenolphtalein)
9. เอทิลแอลกอฮอล์ร้อยละ 95 (Ethyl alcohol 95 %)
10. โพตัสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH)
11. โพตัสเซียมเปอร์ซัลเฟต ($K_2S_2O_8$)
12. 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) Diammonium salt (ABTS)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

อุปกรณ์

1. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง Hewlett Packard รุ่น 8453
2. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ SHEL LAB รุ่น Sheldon
3. เครื่องปั่นเหวี่ยง HERMLE รุ่น z 323
4. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง Mettler รุ่น AE200 adventurer
5. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง Ohaus รุ่น adventurer
6. เตาแผ่นความร้อนไฟฟ้า imarflex รุ่น IF-830
7. เครื่องเขย่า Heidolph รุ่น REAX 2000
8. ไมโครปิเปต BIOHIT รุ่น PROLINE
9. เครื่องวิเคราะห์ความชื้น Sartorius รุ่น MA30
10. คิวเวต Hellma ชนิด Quartz suprasil รุ่น 104B-QS
11. เครื่องบีบอัดแบบสกรู รุ่น Oilprezz ประเทศฮอลแลนด์

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 25 ก.ค. 2555
เลขทะเบียน 247503
เลขเรียกหนังสือ

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมน้ำกะทิ (หัวกะทิ)

มะพร้าวที่เจริญเติบโตเต็มที่ 3-5 เดือน นำมาใช้เพื่อสกัดน้ำกะทิ ถูกเตรียมโดยเอาเนื้อมะพร้าวขูดมาบีบคั้นด้วยมือน้ำกะทิในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 (เนื้อมะพร้าวขูด: น้ำ) จนมีลักษณะขาวข้น เนื้อมะพร้าวที่ถูกคั้นแล้วนำไปกรองด้วยผ้าขาวบาง บรรจุใส่ภาชนะปิดสนิท

2. การสกัดน้ำมันมะพร้าว

2.1 การสกัดน้ำมันมะพร้าวด้วยวิธีการหมักแบบธรรมชาติ

นำหัวกะทิมาใส่ในฟลาสก์ขนาด 1000 มิลลิลิตร ปริมาตร 500 มิลลิลิตร หมักโดยธรรมชาติเป็นเวลา 48, 72, 96, 120, 144 และ 168 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องโดยทำ 3 ซ้ำ ปิเปตน้ำมันมะพร้าวออกมาใส่ลงในหลอดปั่นเหวี่ยง และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเก็บน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ชั้นบนมาใส่หลอดปั่นเหวี่ยงใหม่ บันทึกปริมาตร สีและกลิ่นที่ได้ แล้วเก็บไว้ใช้งานในขั้นตอนถัดไป

2.2 การสกัดน้ำมันมะพร้าวด้วยวิธีการบีบเย็น

นำเนื้อมะพร้าวขูดมาอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จนกระทั่งเนื้อมะพร้าวมีร้อยละความชื้นประมาณ 10-20 จากนั้นบีบน้ำมันมะพร้าวด้วยเครื่องบีบแบบสกรู กรองน้ำมันมะพร้าว เพื่อแยกตะกอนของกากที่เจือปนออก จากนั้นเทใส่หลอดปั่นเหวี่ยง และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเก็บน้ำมันมะพร้าวใส ๆ ชั้นบนมาใส่หลอดปั่นเหวี่ยงใหม่ บันทึกปริมาตร สี และกลิ่นที่ได้ แล้วเก็บไว้ใช้งานในขั้นตอนถัดไป

2.3 การสกัดน้ำมันมะพร้าวด้วยวิธีการหมักแบบให้ความร้อนต่ำ

นำหัวกะทิใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ปิดฝาจากนั้นนำไปวางไว้ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 45, 50, 55 และ 60 องศาเซลเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ปิเปตน้ำมันมะพร้าวที่แยกได้ในขวดใส่หลอดปั่นเหวี่ยง และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเก็บน้ำมันส่วนใสที่ได้ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงใหม่ บันทึกปริมาตร สี และกลิ่นที่ได้ แล้วเก็บไว้ใช้งานในขั้นตอนถัดไป

3. การพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารที่มีน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์เป็นส่วนประกอบ โดยแบ่ง 2 กลุ่ม คือ

3.1 ผลิตภัณฑ์น้ำสลัด โดยได้พัฒนาผลิตภัณฑ์น้ำสลัดชนิดต่าง ๆ จำนวน 4 สูตร คือ

3.1.1 ผลิตภัณฑ์น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ผสมกระเทียม

เป็นสูตรการทำผลิตภัณฑ์อาหารจากภาควิชาเทคโนโลยีการอาหาร ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้ คือ น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ และกระเทียมโทนหั่น โดยนำกระเทียมโทนหั่นแช่ทิ้งไว้ในน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ 24 ชั่วโมง แล้วกรองเอากระเทียมโทนออก แล้วเก็บรักษาตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอการนำไปวิเคราะห์สัปดาห์ที่ 0, 1, 2, 4 และ 6 รวมเป็นระยะเวลา 1 เดือนครึ่ง

3.1.2 ผลิตภัณฑ์น้ำสลัดใสจากน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์

ทำโดยใช้ส่วนประกอบดังนี้คือ น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ น้ำมันมะกอก และน้ำส้มสายชูหมักจากข้าวเหนียวดำ โดยเก็บรักษาตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอการนำไปวิเคราะห์สัปดาห์ที่ 0, 1, 2, 4 และ 6 รวมเป็นระยะเวลา 1 เดือนครึ่ง

3.1.3 ผลิตภัณฑ์น้ำสลัดใสจากน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ผสมกระเทียม

เป็นการดัดแปลงสูตรของการพัฒนาผลิตภัณฑ์ในข้อ 3.2 ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้คือ น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ผสมกระเทียม น้ำมันมะกอก และน้ำส้มสายชูหมักจากข้าวเหนียวดำ โดยเก็บรักษาตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอการนำไปวิเคราะห์สัปดาห์ที่ 0, 1, 2, 4 และ 6 รวมเป็นระยะเวลา 1 เดือนครึ่ง

3.1.4 ผลิตภัณฑ์น้ำสลัดเข้มข้น

เป็นสูตรการทำผลิตภัณฑ์อาหารจากภาควิชาเทคโนโลยีการอาหาร ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้ คือ น้ำส้มสายชูกลั่น น้ำตาลทราย นมข้นหวาน พริกไทยป่น เกลือ มัสตาร์ด เต้าหู้ถั่วเหลือง และน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ โดยนำส่วนประกอบดังกล่าวผสมให้เข้ากัน แล้วเก็บรักษาตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอการนำไปวิเคราะห์สัปดาห์ที่ 0, 1, 2, 4 และ 6 รวมเป็นระยะเวลา 1 เดือนครึ่ง

3.2 การพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารหมัก โดยได้พัฒนาอาหารหมักจำนวน 2 ชนิดที่ได้เติมน้ำมันมะพร้าวบริสุทธ์ทนแทนสูตรอาหารเดิม ได้แก่ ผลิตภัณฑ์โยเกิตต์รสธรรมชาติ และ ไส้กรอกเปรี้ยว

3.2.1 ผลิตภัณฑ์โยเกิรต์รสธรรมชาติ โดยใช้น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์แทนนมพร่องมันเนย

ในการทำได้ใช้ส่วนประกอบดังแสดงในตารางที่ 1 ทำโดยนำนมผงพร่องมันเนยที่มีปริมาณของแข็งทั้งหมดร้อยละ 14 มาให้ความร้อนจนถึงอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมน้ำมันมะพร้าวร้อยละ 2 ของปริมาณน้ำนมทั้งหมด และโฮโมจิไนซ์ให้เข้ากัน ให้ความร้อนพร้อมคนส่วนผสมจนกระทั่งอุณหภูมิเพิ่มเป็น 90 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที หลังจากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงเหลือ 42 องศาเซลเซียส จากนั้นนำเชื้อจุลินทรีย์โยเกิร์ต ได้แก่ *Streptococcus salivarius* subsp. Thermophilus และ *Lacctobacillus delbrueckii* subsp. Bulgaricus ร้อยละ 5 ของส่วนผสมทั้งหมด โดยบรรจุในถ้วยพลาสติก ปิดฝาให้สนิทแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง

ตารางที่ 2 ส่วนผสมของโยเกิร์ตรสธรรมชาติ โดยใช้น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ทดแทนนมพร่องมันเนยบางส่วน

ส่วนผสม	ปริมาณ (กรัม)
นมพร่องมันเนยบางส่วน	485.34
น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์	9.70
เชื้อจุลินทรีย์โยเกิร์ต	4.95
น้ำหนักสุทธิ	500

3.2.2 ผลิตภัณฑ์ไส้กรอกเปรี้ยวโดยใช้น้ำมันมะพร้าวแทนมันหมู

ทำโดยนำส่วนผสมนำส่วนประกอบดังแสดงในตารางที่ 2 ซึ่งใช้น้ำมันมะพร้าวร้อยละ 10 ของน้ำหนักเนื้อหมู ทดแทนมันหมู มาผสมคลุกกัน โดยใช้เครื่องผสมเป็นเวลา 15 นาที หมักทิ้งไว้ในตู้เย็น 2 ชั่วโมง อุณหภูมิประมาณ 6 องศาเซลเซียส จากนั้นกรอกส่วนผสมลงในไส้เทียม ใช้เชือกผูกเป็นข้อ ระยะยาวประมาณ 3 นิ้ว

ตารางที่ 3 ส่วนผสมของไส้กรอกเปรี้ยว ที่ใช้น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์แทนมันหมู

ส่วนผสม	ปริมาณ (กรัม)
เนื้อหมูบดหยาบ	250
น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์	25
กระเทียมปอก	25
ลูกผักชีป่น	1.85
พริกไทยป่น	0.25
เกลือป่น	7.5
น้ำตาลทราย	1.25
ข้าวสุก	189.15
น้ำหนักสุทธิ	500

4. การตรวจสอบคุณสมบัติของน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์

4.1 การวิเคราะห์ค่ากรดไขมันอิสระ (Acid Value ; A.V.) (ดัดแปลงจาก นิธิยา รัตนาปนนท์, 2548)

ในการตรวจสอบการสลายตัวและการหืนของไขมันและน้ำมัน ทำโดยนำเอทิลแอลกอฮอล์ร้อยละ 95 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพูแล้วเติมสารละลายฟีนอฟทาลีนร้อยละ1 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นทำการไตเตรตให้เป็นกลางด้วยสารละลายโพตัสเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1โมลาร์ (3 หยด) จะได้ตัวทำละลายผสมที่เป็นกลาง นำน้ำมันตัวอย่างไปชั่งให้ทราบน้ำหนักแน่นอน (ใช้น้ำมัน 2 กรัม) มาละลายในตัวทำละลายผสมที่เป็นกลาง แล้วไตเตรตด้วยสารละลายโพตัสเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ จนกระทั่งได้สารละลายสีชมพู ซึ่งคงตัวนานกว่า 15 วินาที

วิธีคำนวณ

$$\text{ค่ากรดไขมันอิสระ} = (V \times 5.61)/ W$$

โดยที่ V = ปริมาตรของสารละลายโพตัสเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (มิลลิลิตร)

W = น้ำหนักของตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหาร (กรัม)

ปริมาตร 1 มิลลิลิตรของสารละลายโพตัสเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ เท่ากับ 5.6 มิลลิกรัมของโพตัสเซียมไฮดรอกไซด์ หากต้องการคำนวณค่ากรดไขมันอิสระเป็นปริมาณของกรดไขมันอิสระในรูปร้อยละของกรดลอริค สามารถคำนวณได้ตามสมการ 1 แต่ถ้าเป็นร้อยละกรดไขมันอิสระของกรดปาล์มิติค สามารถคำนวณตามสมการ 2 ดังนี้

สมการ 1 ร้อยละกรดลอริค = ค่ากรดไขมันอิสระ/ 2.81

สมการ 2 ร้อยละกรดปาล์มิติค = ค่ากรดไขมันอิสระ/ 2.19

4.2 การวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด

4.2.1 การสกัดตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารด้วยเมทานอล (ดัดแปลงจาก Kapila และคณะ, 2009)

นำตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหาร 5.0 กรัม เติมเมทานอลร้อยละ 80 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงแล้วนำไปเขย่า จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วปิเปตสารละลายเมทานอลแยกเก็บไว้ ส่วนตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารเดิมให้เติม เมทานอลและทำตามขั้นตอนดังกล่าวซ้ำ 3 ครั้ง เพื่อดึงสารฟีนอลิกในตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารออกให้หมด จากนั้นใส่ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงแล้วเก็บในที่มืด และนำไปวิเคราะห์ขั้นตอนต่อไป

4.2.2 การวิเคราะห์หาสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (ดัดแปลงจาก Marina และคณะ, 2009)

นำสารสกัดตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารโฟลินซิโอแคลตู รีเอเจนต์ ความเข้มข้นร้อยละ 10 จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตอิ่มตัวที่ความเข้มข้นร้อยละ 7.5 ผสมให้เข้ากันหลังจากนั้นนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 725 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายกรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐาน สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดแสดงอยู่ในรูปสมมูลของกรดแกลลิก (gallic acid equivalents; GAE) ต่อตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหาร100 กรัม โดยคำนวณตามสมการดังนี้

สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหาร 100 กรัม)

$$= [A_{725}/S] \times D \times 20$$

โดยที่ : A_{725} คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 725 นาโนเมตร

S คือ ค่าความชันของกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก

D คือ ค่าการเจือจางของสารสกัดตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหาร

4.3 การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (ดัดแปลงจาก Kapila และคณะ, 2009)

เติมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ (ละลายอยู่ในเมทานอลร้อยละ 80) ลงในสารสกัดตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหาร ผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร คำนวณหาร้อยละการยับยั้งและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้สารโทรลอกซ์เป็นสารมาตรฐาน โดยฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระจะแสดงอยู่ในรูปมิลลิโมลาร์สมมูลของโทรลอกซ์ต่อน้ำมัน 100 กรัม (mM Trolox/ 100 g oil) คำนวณตามสมการดังนี้

$$\text{ร้อยละการยับยั้ง} = [(A_0 - A_1)/ A_0] \times 100$$

$$\text{ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (มิลลิโมลาร์ของโทรลอกซ์ต่อตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหาร100 กรัม)} = -\{(A_{517}/S) - (A_0)\} \times 20$$

โดยที่ : A_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความเข้มข้น 0 มิลลิโมลาร์ของสารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์

A_1 คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหาร

A_{517} คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร

S คือ ค่าความชันของกราฟมาตรฐานโทรลอกซ์

4.4 การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS (ดัดแปลงจาก Re และคณะ, 2009)

การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ดำเนินการโดย เตรียมสารละลาย $ABTS^{\bullet+}$ เจือจาง ให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร เท่ากับ 0.90 - 1.0 จากนั้นเติมสารสกัดตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารลงในสารละลาย $ABTS^{\bullet+}$ เจือจาง ผสมให้เข้ากันหลังจากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 45 วินาที แล้ววัดค่าการดูด กลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร โดยใช้สารโทรลอกซ์เป็นสารมาตรฐาน โดยฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระจะแสดงอยู่ในรูปมิลลิโมลาร์สมมูลของโทรลอกซ์ต่อตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหาร 100 กรัม (mM Trolox/ 100 g oil) คำนวณตามสมการดังนี้

ร้อยละการยับยั้ง = $[(A_0 - A_1)/ A_0] \times 100$

ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (มิลลิโมลาร์ของโทรลอกซ์ต่อตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหาร 100 กรัม)

$= -\{(A_{517}/S) - (A_0)\} \times 20$

โดยที่ : A_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความเข้มข้น 0 มิลลิโมลาร์ของสารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์

A_1 คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหาร

A_{517} คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร

S คือ ค่าความชันของกราฟมาตรฐานโทรลอกซ์

4.5 การตรวจสอบปริมาณวิตามินอีในน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์

ในการตรวจสอบวิตามินอีในน้ำมันมะพร้าว ทำโดยใช้เทคนิค HPLC ดัดแปลงจากวิธีของ Liquid Chromatographic Analysis of Food and Beverage Vol.2