

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ไนไตรท์เป็นวัตถุเจือปนอาหาร มักใช้ในรูปแบบของเกลือโซเดียมหรือโปตัสเซียมไนไตรท์ นิยมนำมาเป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป เพื่อช่วยเพิ่มคุณลักษณะด้าน สี กลิ่น ที่เป็นเอกลักษณ์ของผลิตภัณฑ์ ช่วยในการยืดอายุของผลิตภัณฑ์ คือ ชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันและยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Clostridium botulinum* (Vidua-Martos และคณะ, 2009) แต่การใช้ไนไตรท์เพื่อประโยชน์ดังกล่าวจะมีไนไตรท์บางส่วนตกค้างอยู่ในผลิตภัณฑ์และทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้น (precursor) ของปฏิกิริยาการเกิดไนโตรซามีน (N-Nitrosation) (ประสงค์, 2549) ซึ่งเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค เมื่อรับประทานเป็นปริมาณมากหรือสม่ำเสมอจนเกิดการสะสมในร่างกาย

การออกกฎหมายควบคุมการใช้ปริมาณไนไตรท์ในอาหาร ทำให้ผู้บริโภคปลอดภัยได้ในระดับหนึ่ง แต่เนื่องจากไนไตรท์เป็นส่วนผสมในอาหารหลายชนิด ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้สูงที่ผู้บริโภคจะได้รับไนไตรท์สะสมในร่างกาย มีงานวิจัยหลายงานวิจัยพบว่าสารพิษจากพืชสามารถทำหน้าที่เป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน (antioxidant) ช่วยชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน เช่น เมล็ดองุ่นพืชตระกูลส้ม และพืชตระกูลเบอร์รี่ (Jayaprakasha และคณะ, 2001; Zia-ur-Rehman, 2006; Koca และ Karadeniz, 2009) อย่างไรก็ตามงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการทดสอบความสามารถในการลดปริมาณไนไตรท์ตกค้างของสารสกัดจากพืชเหล่านี้ยังมีอยู่จำกัด อาจเนื่องมาจากข้อจำกัดของสีและกลิ่นของสารสกัดจากพืชเหล่านี้ที่อาจทำให้กลิ่นรสของผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปเปลี่ยนไป

ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป มีการใช้ส่วนผสมจากพืชและเครื่องเทศหลายชนิด รวมทั้งส่วนผสมอื่นที่มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compound) เช่น โพรตีนจากถั่วเหลือง (สุภาวดี, 2550) และไข่ขาวผง (สุนิษา, 2552) ดังนั้นคณะวิจัยจึงสนใจทดสอบความสามารถในการลดปริมาณไนไตรท์ตกค้างของสมุนไพรและส่วนผสมอื่นๆที่ใช้เป็นส่วนผสมจริงในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป ส่วนผสมทั้ง 13 ชนิด ที่จะศึกษา คือ เม็ดผักชีป่น อบเชยป่น ปาปริก้าป่น พริกขี้หนูสวนป่น พริกไทยดำป่น พริกไทยขาวป่น กระเทียมป่นขี้หว่าป่น ตะไคร้ป่น ข่าป่น ใบมะกรูดป่น ไข่ขาวผง และโปรตีนจากถั่วเหลือง โดยจะคัดเลือกสมุนไพร หรือส่วนผสมที่สามารถลดปริมาณไนไตรท์ตกค้างก่อนนำไปสกัดสารพิษเคมีหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีอยู่ในวัตถุดิบนั้น เพื่อนำไปทดสอบสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันและความสามารถในการลดปริมาณไนไตรท์ตกค้างในไส้กรอกหมูรมควัน นอกจากนี้การวิเคราะห์ปริมาณ

ไนไตรต์ตกค้างในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปนั้นโดยทั่วไปจะใช้ขั้นตอนของ Association of Official Analytical Chemists Official Method 973.31 Nitrites in cured meat (1995) โดยวิธีทางแคลอริเมตริก (colorimetric method) ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย มีขั้นตอนการวิเคราะห์ที่ไม่ยุ่งยากและใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ในการตรวจวิเคราะห์ โดยอาศัยหลักการการเกิดสารประกอบที่สามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ระหว่างไนตรัสแอซิด (nitrous acid) กับซัลฟานิลาไมด์ (sulfanilamide) อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์โดยวิธีการวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์นั้น สภาวะในการทดลองมีผลต่อความคลาดเคลื่อนของค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้มาก ค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้ที่ปฏิกิริยาเข้าสู่สมดุลกับค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้ที่เวลาก่อนเข้าสู่ปฏิกิริยาสมดุลมีความแตกต่างกัน เพื่อเพิ่มความถูกต้องในการวิเคราะห์ปริมาณไนไตรต์ตกค้าง ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาถึงปัจจัยที่มีผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณไนไตรต์ตกค้างด้วยวิธีทางแคลอริเมตริก เพื่อให้ได้วิธีการวิเคราะห์ปริมาณไนไตรต์ตกค้างที่มีประสิทธิภาพ

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณไนไตรต์ตกค้างด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์
2. คัดเลือกพืชสมุนไพรรวมทั้งส่วนผสมอื่นซึ่งนิยมใช้ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป ที่มีความสามารถในการลดปริมาณไนไตรต์ตกค้าง
3. ศึกษาความสามารถในการเป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดอบเชยเมื่อน้ำหรือเอทานอลเป็นตัวทำละลาย
4. ศึกษาความสามารถในการลดปริมาณไนไตรต์ตกค้างในไส้กรอกรมควัน เมื่อเติมสารสกัดอบเชยที่ใช้น้ำหรือเอทานอลเป็นตัวทำละลาย

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณไนไตรต์ตกค้างด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์เพื่อใช้วิเคราะห์ปริมาณไนไตรต์ตกค้างในงานวิจัย และคัดเลือกพืชสมุนไพรรวมทั้งส่วนผสมอื่นซึ่งนิยมใช้ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปที่มีความสามารถในการลดปริมาณไนไตรต์ตกค้าง สกัดพืชสมุนไพรหรือส่วนผสมอื่นที่คัดเลือกได้ พร้อมทั้งศึกษาความสามารถในการเป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดอบเชยที่ใช้น้ำหรือเอทานอลเป็นตัวทำละลายทั้งในหลอดทดลองและในไส้กรอกหมุกรมควัน

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

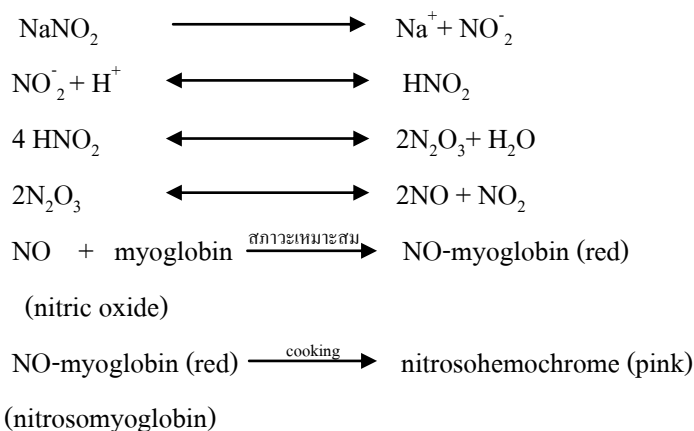
1. ทราบวิธีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนตกค้างที่มีประสิทธิภาพ
2. สร้างองค์ความรู้ในงานด้านสารแอนติออกซิแดนซ์จากพืช รวมทั้งการลดปริมาณไนโตรเจนตกค้างในไส้กรอกหมูรมควัน

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ไนไตรท์

วัตถุดิบอาหารกลุ่มไนเตรทและไนไตรท์หรือที่คนทั่วไปเรียกว่าดินประสิว เป็นสารที่ใช้กันมากในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ โดยมักใช้ในรูปแบบเกลือโซเดียมไนไตรท์ หรือโปตัสเซียมไนไตรท์ และเกลือโซเดียมไนเตรทหรือโปตัสเซียมไนเตรท เมื่อเติมในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปจะช่วยเพิ่มคุณลักษณะของเนื้อสัตว์ที่ผู้บริโภคชื่นชอบ เช่น สี กลิ่นรส รวมทั้งชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน และยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Clostridium botulinum* (Vidua-Martos และ คณะ, 2009) จึงเป็นการยืดอายุการเก็บรักษาได้อีกทางหนึ่ง การเกิดสีของผลิตภัณฑ์นั้นเกลือไนไตรท์จะแตกตัวจนได้เป็นไนตริกออกไซด์ (nitric oxide) และเข้าทำปฏิกิริยากับไมโอโกลบิน (myoglobin) ในเนื้อสัตว์ ได้เป็นสารไนโตรโซไมโอโกลบิน (nitrosomyoglobin) จากนั้นเมื่อได้รับความร้อนจากการปรุงอาหารจะกลายเป็นสารไนโตรโซฮีโมโครม (nitrosohemochrome) ซึ่งเป็นสีชมพูที่เกิดขึ้นในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ ดังภาพที่ 2.1



ภาพที่ 2.1 : การเกิดสีของผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปเนื่องจากไนไตรท์

ที่มา : ดัดแปลงจาก Romans (1994)

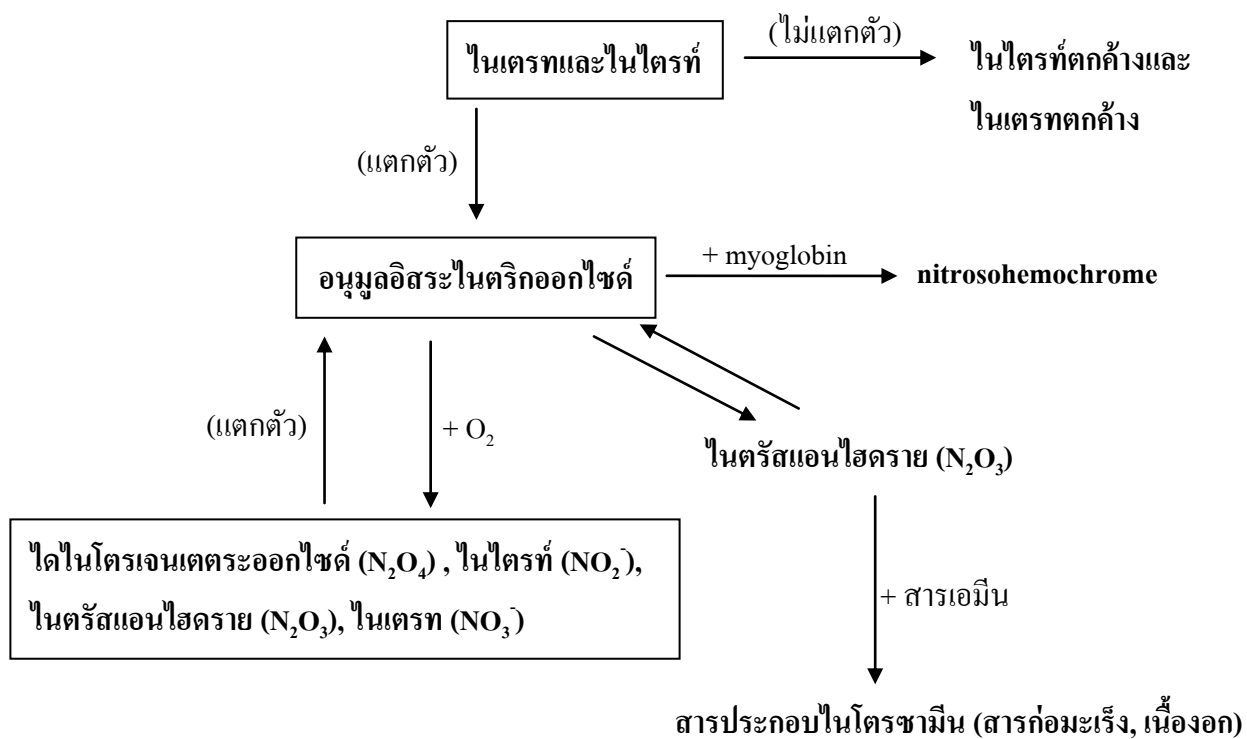
ถึงแม้ไนไตรท์จะทำให้ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคเพิ่มมากขึ้น แต่การเติมเกลือไนไตรท์ในผลิตภัณฑ์อาจทำให้เกิดไนไตรท์ตกค้างซึ่งเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคได้ โดยการบริโภคอาหารที่มีการเติมเกลือไนไตรท์และไนเตรทจะส่งผลเสียต่อผู้บริโภค แบ่งได้เป็น 3 ส่วนใหญ่ๆ ดังนี้

1) เมื่ออยู่ในอาหารไนโตรที่ที่เกิดแตกตัวจะสามารถเกิดปฏิกิริยากับสารกลุ่มเอมีนในเนื้อสัตว์ และกลายเป็นสารประกอบไนโตรซามีนซึ่งจะกล่าวต่อไปในหัวข้อ 2.1.2 โดยสารประกอบไนโตรซามีนมีความเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคลูคีเมียในเด็ก เนื้องอกในสมอง และมะเร็งลำไส้ใหญ่ ซึ่งสารประกอบไนโตรซามีนที่ผู้บริโภคได้รับจะมีปริมาณเท่ากับความเข้มข้นของไนโตรที่ยกกำลังสอง (Demeyer และคณะ, 2008) และถ้าใช้อุณหภูมิที่สูงในการประกอบอาหารประเภทเนื้อสัตว์ สารประกอบไนโตรซามีนจะยังมีปริมาณที่มากขึ้น (Markiewicz และคณะ, 2010)

2) ไนเตรทบางส่วนที่ยังไม่เกิดการแตกตัวจะถูกแบคทีเรียในปากเปลี่ยนให้เป็นไนโตรที่ จากนั้นเมื่อก่อนอาหารถูกส่งผ่านไปยังกระเพาะหรือลำไส้ที่มีสภาวะเป็นกรดซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมที่ไนโตรที่จะแตกตัวเกิดเป็นไนตริกออกไซด์ (nitric oxide) ในสภาวะที่มีออกซิเจนไนตริกออกไซด์จะเป็นอนุมูลอิสระที่ไม่เสถียร โดยจะสามารถเกิดปฏิกิริยากับออกซิเจนกลายเป็นไนโตร (nitrite, NO_2^-) ไนเตรท (nitrate, NO_3^-) ไนตรัสแอนไฮไดรด์ (nitrous anhydride, N_2O_3) และไดไนโตรเจนเตตระออกไซด์ (dinitrogen tetraoxide, N_2O_4) ดังภาพที่ 2.7 โดยสารดังกล่าวที่เกิดขึ้นจากอนุมูลอิสระไนตริกออกไซด์ (nitric oxide, $\text{NO}^\bullet$) โดยเฉพาะอย่างยิ่งไนตรัสแอนไฮไดรด์จะสามารถจับและดึงเบสในกรดนิวคลีอิก เช่น กวานีน (guanine) ไซโตซีน (cytosine) และอะดีนีน (adenine) ออกจากกรดนิวคลีอิก (Vidua-Martos และคณะ, 2009)

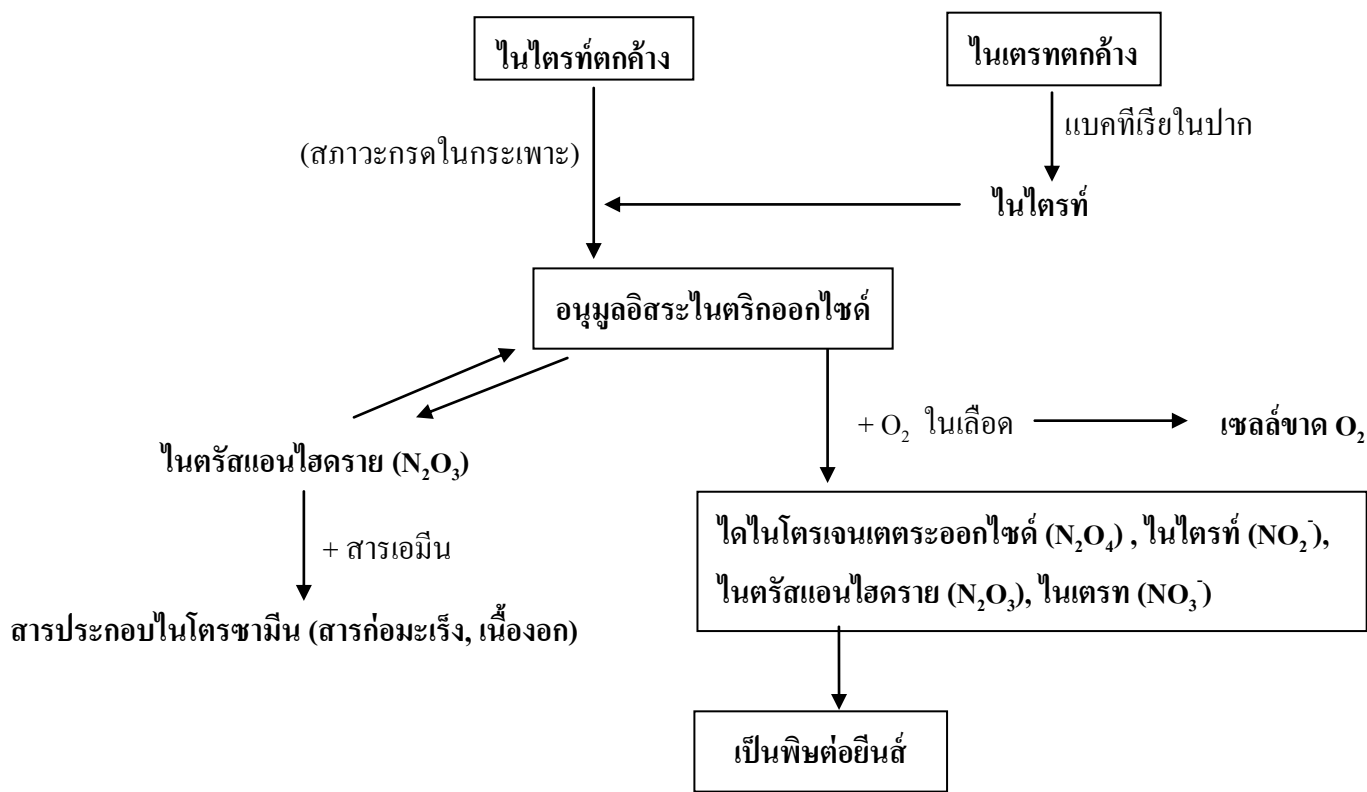
3) ไนตริกออกไซด์ (nitric oxide) ที่เกิดขึ้นแล้วในอาหาร รวมทั้งที่เกิดขึ้นในกระเพาะหรือลำไส้ ที่มีสภาวะเป็นกรด จะสามารถเกิดปฏิกิริยากับออกซิเจนในร่างกายอย่างรวดเร็ว แม้จะไม่กระทบต่อเนื้อเยื่อหรือยีนส์โดยตรงแต่จะส่งผลให้เลือดมีปริมาณออกซิเจนต่ำ (Vidua-Martos และคณะ, 2009) และไม่เพียงพอ จึงทำให้เซลล์ในร่างกายขาดออกซิเจน

จากผลเสียทั้ง 3 ส่วนที่กล่าวข้างต้นจะเห็นว่าการเกิดสารก่อโทษต่างๆจากวัตถุเจือปนอาหารประเภทไนเตรทและไนโตรที่สามารถเกิดได้ตั้งแต่ในอาหารจนถึงในร่างกายของผู้บริโภค โดยปริมาณสารก่อโทษต่างๆจะเปลี่ยนไปตามสภาวะและปริมาณสารตั้งต้น เช่น ไนเตรต ไนโตรที่ สารกลุ่มเอมีน ความเป็นกรด-เบสในอาหารและในกระเพาะ เป็นต้น ซึ่งสามารถอธิบายเป็นแผนภาพโดยรวมได้ดังภาพที่ 2.1 และภาพที่ 2.3



ภาพที่ 2.2 : การเกิดสารก่อโทษจากไนเตรทและไนไตรท์ในอาหาร

ที่มา : ดัดแปลงจาก Demeyer และคณะ (2008); Markiewicz และคณะ (2010); Vidua-Martos และคณะ (2009)



ภาพที่ 2.3 : การเกิดสารก่อพิษจากไนเตรทและไนไตรท์ในร่างกายมนุษย์

ที่มา : คัดแปลงจาก Demeyer และคณะ (2008); Markiewicz และคณะ (2010); Vidua-Martos และคณะ (2009)

ประเทศ อันมีสาเหตุมาจากอัตราเสี่ยงของผู้บริโภคในประเทศนั้นๆ โดยคำนึงถึง ความถี่หรือโอกาสที่ ผู้บริโภคจะได้รับอาหารที่มีส่วนประกอบเกลือไนไตรท์ ตลอดจนขนาดและน้ำหนักตัวของผู้บริโภค ในประเทศนั้นๆ โดยสมบัติต่างๆของวัตถุเจือปนอาหารกลุ่มไนเตรทและไนไตรท์มีดังนี้

1) Sodium nitrite

ชื่อเรียกอื่นๆ : Nitrous acid sodium salt, diazotizing salt, anti-rust

E number : Sodium nitrite (E 250)

สูตรโครงสร้าง : NaNO_2

ลักษณะภายนอก : ผลึกสีขาวหรือสีเหลืองอ่อน ไม่มีกลิ่น

น้ำหนักโมเลกุล : ประมาณ 69 กรัม/โมล

จุดหลอมเหลว : 271 องศาเซลเซียส

สมบัติการละลาย : ละลายในน้ำ (82 กรัม/100 มิลลิลิตร ที่ 20 องศาเซลเซียส) แดกตัวได้ดีที่ pH ต่ำ

ปริมาณที่อนุญาตให้ใช้ : - ประเทศไทย กระทรวงสาธารณสุขอนุญาตให้ใช้โซเดียมไนไตรท์ ได้ไม่เกิน 125 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนักอาหาร 1 กิโลกรัม

- สหภาพยุโรป (EU) กำหนดให้ใช้โซเดียมไนไตรท์ ให้ใช้ได้ไม่เกิน 150 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักอาหาร 1 กิโลกรัม

ความเป็นพิษ : LD_{50} เท่ากับ 180 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (oral rat)

LD_{50} เท่ากับ 178 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (oral rabbit)

2) Sodium nitrate

ชื่อเรียกอื่นๆ : Nitrate of soda, Nitratine, Peru saltpeter, Soda niter

E number : Sodium nitrate (E 251)

สูตรโครงสร้าง : NaNO_3

ลักษณะภายนอก : ผลึกสีขาวไม่มีกลิ่น หรือมีกลิ่นจางๆ

น้ำหนักโมเลกุล : ประมาณ 84.9947 กรัม/โมล

จุดหลอมเหลว : 308 องศาเซลเซียส

สมบัติการละลาย : ละลายในน้ำ (92.1 กรัม/100 มิลลิลิตร ที่ 25 องศาเซลเซียส หรือ
180 กรัม/100 มิลลิลิตร ที่ 100 องศาเซลเซียส)

ปริมาณที่อนุญาตให้ใช้ : - ประเทศไทย กระทรวงสาธารณสุขอนุญาตให้ใช้โซเดียมไนเตรทใน
ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ได้ไม่เกิน 500 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักอาหาร 1 กิโลกรัม
- สหภาพยุโรป (EU) กำหนดให้ใช้โซเดียมไนเตรทได้ไม่เกิน 300 มิลลิกรัม
ต่อน้ำหนักอาหาร 1 กิโลกรัม

ความเป็นพิษ : LD_{50} เท่ากับ 1267 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (oral rat)
 LD_{50} เท่ากับ 2680 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (oral rabbit)

3) Potassium nitrite

E number : Potassium nitrite (E 249)

สูตรโครงสร้าง : KNO_2

ลักษณะภายนอก : ผลึกสีขาวหรือสีเหลืองอ่อน ไม่มีกลิ่น

น้ำหนักโมเลกุล : ประมาณ 85.1038 กรัม/โมล

จุดหลอมเหลว : 440 องศาเซลเซียส

สมบัติการละลาย : ละลายในน้ำ (281 กรัม/100 มิลลิลิตร ที่ 0 องศาเซลเซียส หรือ
413 กรัม/100 มิลลิลิตร ที่ 100 องศาเซลเซียส)

ปริมาณที่อนุญาตให้ใช้ : - ประเทศไทย กระทรวงสาธารณสุขอนุญาตให้ใช้โพแทสเซียมไนไตรท์
ได้ไม่เกิน 125 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนักอาหาร 1 กิโลกรัม

ความเป็นพิษ : LD_{50} เท่ากับ 200 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (oral rabbit)

4) Potassium nitrate

E number : Potassium nitrate (E 252)

สูตรโครงสร้าง : KNO_3

ลักษณะภายนอก : ผลึกสีขาว

น้ำหนักโมเลกุล : ประมาณ 101.103 กรัม/โมล

จุดหลอมเหลว : 334 องศาเซลเซียส

สมบัติการละลาย : ละลายในน้ำ (13.3 กรัม/100 มิลลิลิตร ที่ 0 องศาเซลเซียส, 36 กรัม/100 มิลลิลิตร
ที่ 25 องศาเซลเซียส หรือ 247 กรัม/100 มิลลิลิตร ที่ 100 องศาเซลเซียส)

ปริมาณที่อนุญาตให้ใช้ : - ประเทศไทย กระทรวงสาธารณสุขอนุญาตให้ใช้โพแทสเซียมไนเตรทในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ได้ไม่เกิน 500 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักอาหาร 1 กิโลกรัม

ความเป็นพิษ : LD₅₀ เท่ากับ 3750 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (oral rat)

LD₅₀ เท่ากับ 1901 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (oral rabbit)

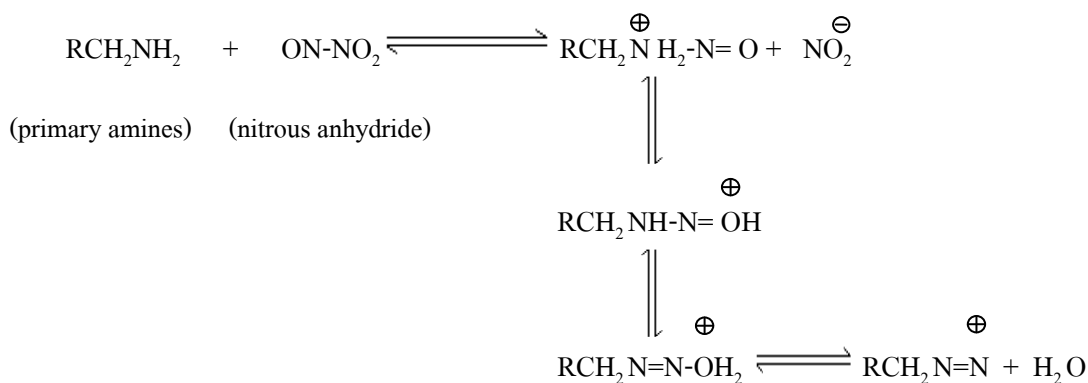
เมื่อผู้บริโภครับประทานไนโตรที่ตกค้างอยู่ในผลิตภัณฑ์ อนุมูลไนโตร (NO₂) จะทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้น (precursor) ของปฏิกิริยาการเกิดสารประกอบเอ็น-ไนโตรโซ (N-Nitrosation) เช่น สารไนโตรซามีน (nitrosamine) แม้ว่าเกลือไนโตรจะมีความเป็นพิษมากกว่าเกลือไนเตรท แต่การผลิตในระดับอุตสาหกรรมจะนิยมเกลือไนโตรมากกว่า เนื่องจากเกลือไนโตรสามารถแตกตัวได้ดีกว่าส่งผลให้สีของผลิตภัณฑ์เกิดได้เร็วเป็นที่พอใจกว่า (สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร, 2547 ; สีวพร, 2546; Flower, 2002; Madhavi และคณะ, 1995; Romans และคณะ, 1994)

2.1.2 การเกิดสารประกอบเอ็น-ไนโตรโซจากสารไนโตรที่ตกค้าง

สารประกอบเอ็น-ไนโตรโซ (N-Nitroso compounds) มีอยู่หลายชนิดโดยสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม ตามลักษณะโครงสร้างทางเคมี

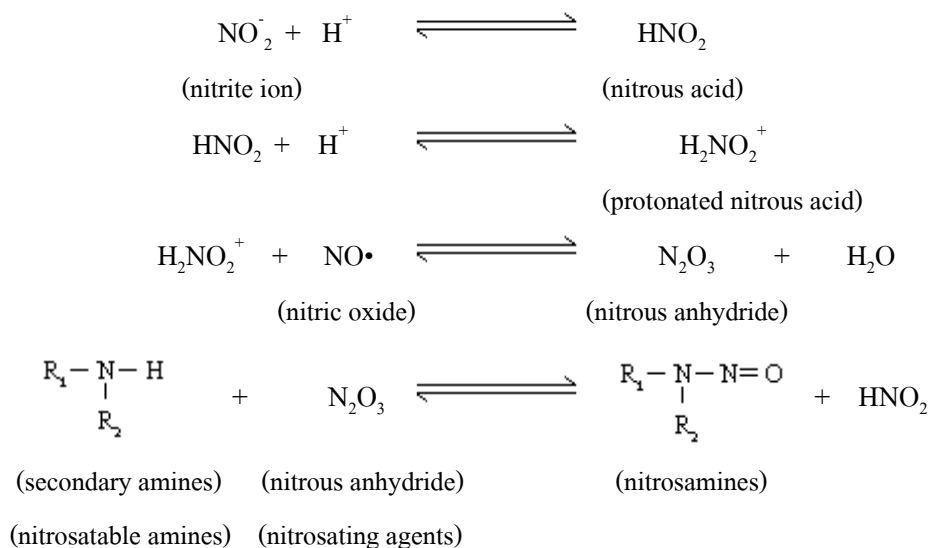
1) กลุ่มไนโตรซามีน (nitrosamine type) เกิดจากสารที่ทำหน้าที่เป็นไนโตรเซตติงเอเจน (nitrosating agents) คือ ไนโตรสแอนไฮไดรด์ (nitrous anhydride, N₂O₃) หรืออนุพันธ์ของไนโตรสแอซิด ซึ่งเกิดจากไนโตรที่ตกค้าง (residual nitrite) ทำปฏิกิริยากับสารที่ทำหน้าที่เป็นไนโตรเซตติงเอเบิลเอมีน (nitrosatable amines) คือ เอมีนปฐมภูมิ (primary amines) ดังภาพที่ 2.4 (Loeppky, 1994) เอมีนทุติยภูมิ (secondary amines) และ เอมีนตติยภูมิ (tertiary amines) ดังภาพที่ 2.5 (ประสงค์, 2549) ตัวอย่างสารในกลุ่มนี้ที่พบมากในอาหารประเภทเนื้อสัตว์และอาหารหมักดอง คือ สารเอ็น-ไนโตรโซไดเมทิลเอมีน (N-nitrosodimethylamine, NDMA)

2) กลุ่มไนโตรซามาไมด์ (nitrosamide type) เกิดจากสารที่มีหมู่เอไมด์ (amide group) หรือหมู่คาร์บอนิล (carbonyl group) เข้าทำปฏิกิริยากับไนโตรเซตติงเอเจน (nitrosating agents) หรือสารที่มีหมู่ไนโตรโซ (Nitroso group, R-N=O) ตัวอย่างสารกลุ่มนี้ คือ เอ็น-ไนโตรโซคาร์บาเมต (N-nitroso-carbamates) และ เอ็น-ไนโตรโซยูเรีย (N-nitrosoureas) โดยมีสูตรโครงสร้างทางเคมีดังภาพที่ 2.6



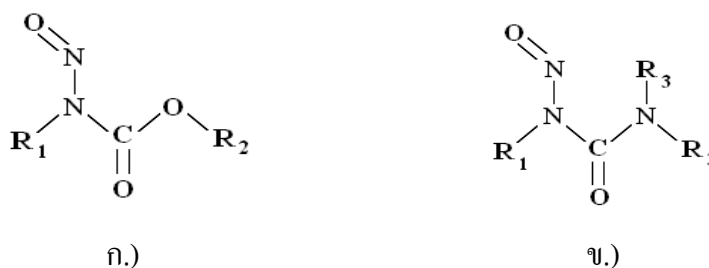
ภาพที่ 2.4 : ปฏิกริยาการเกิดไนโตรซามีนจากเอมีนปฐมภูมิ

ที่มา : Loeppky (1994)



ภาพที่ 2.5 : ปฏิกริยาการเกิดไนโตรซามีนจากเอมีนทุติยภูมิ

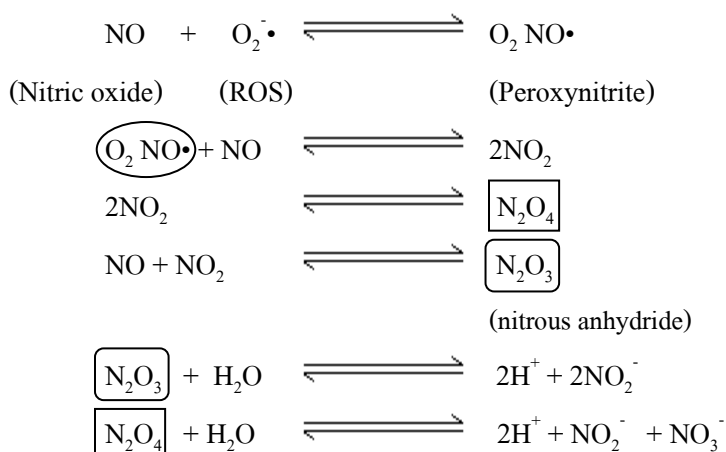
ที่มา : ประสงค์ (2549)



ภาพที่ 2.6 : สารในกลุ่มกลุ่มไนโตรซามายด์ ; ก.) เอ็น-ไนโตรโซคาร์บาเมต และ ข.) เอ็น-ไนโตรโซยูเรีย

ที่มา : Loeppky (1994)

ปฏิกิริยาการเกิดสารประกอบเอ็น-ไนโตรโซจะสามารถเกิดขึ้นได้อย่างต่อเนื่องกลับไปกลับมา จนกว่าสารตั้งต้น (precursor) จะหมดลง ซึ่งกรณีของสารกลุ่มไนโตรซามีน (nitrosamine type) สารตั้งต้นก็คือ ไนโตรเซติงเอเจนและไนโตรเซทเอเบิลเอมีน โดยปฏิกิริยาการเกิดสารประกอบเอ็น-ไนโตรโซจากสารไนไตรท์ตกค้ำนั้นจะมีอนุมูลอิสระไนตริกออกไซด์ (nitric oxide, NO•) เกิดขึ้นด้วยเสมอ ดังภาพที่ 2.5 โดยอนุมูลอิสระไนตริกออกไซด์ไม่จัดว่าเป็นไนโตรเซติงเอเจนโดยตรง (Lu และ Chen, 2007) เพราะอนุมูลอิสระไนตริกออกไซด์ไม่ได้ทำปฏิกิริยากับไนโตรเซทเอเบิลเอมีน แต่อนุมูลอิสระไนตริกออกไซด์เป็นสิ่งที่สามารถทำปฏิกิริยากับสารอนุมูลอิสระกลุ่มรีแอ็กทีฟออกซิเจน (reactive oxygen species, ROS) เช่น ซุปเปอร์ออกไซด์ (superoxide, O₂^{-•}) ทำให้เกิดเปอร์ออกซิไนไตรท์ (peroxynitrite, ONOO⁻) ไนตรัสแอนไฮไดรด์ (nitrous anhydride, N₂O₃) และไดไนโตรเจนเตตระออกไซด์ (dinitrogen tetroxide, N₂O₄) ดังภาพที่ 2.7 ซึ่งสารทั้งสามนี้สามารถทำให้เกิดสารตั้งต้นของปฏิกิริยาการเกิดสารประกอบเอ็น-ไนโตรโซกลุ่มไนโตรซามีน (nitrosamine type) คือ ไนไตรท์ (nitrite, NO₂⁻) และ ไนเตรท (nitrate, NO₃⁻)



ภาพที่ 2.7 : การเกิดเปอร์ออกซิไนไตรท์ (ONOO⁻) จากปฏิกิริยาระหว่างซุปเปอร์ออกไซด์ (O₂^{-•}) กับ ไนตริกออกไซด์ (NO)

ที่มา : ดัดแปลงจาก Loeppky (1994)

จากสาเหตุที่อนุมูลอิสระไนตริกออกไซด์ (nitric oxide, NO•) พบได้ในอาหารเนื้อสัตว์แปรรูปทั่วไป อีกทั้งยังไม่เสถียรโดยสามารถเกิดปฏิกิริยากับสารกลุ่มอื่น เช่น อนุมูลอิสระกลุ่มรีแอ็กทีฟออกซิเจน (reactive oxygen species, ROS) และกลายเป็นสารตั้งต้นของปฏิกิริยาการเกิดสารประกอบไนโตร-

ชามิน ดังนั้นงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับสมบัติในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดจากพืชจึงนิยมวิเคราะห์ความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระไนตริกออกไซด์ (nitric oxide scavenging) ดังนี้

Kumaran และ Joelkarunakaran (2006) ได้ทำการศึกษาสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันและความสามารถในการจับอนุมูลอิสระของสารสกัดจากพืช *Coleus aromaticus* ซึ่งเป็นพืชที่นิยมรับประทานในประเทศอินเดีย โดยรับประทานกับขนมปังและเนย ผู้วิจัยใช้น้ำในการสกัดสารสกัดจากพืช *Coleus aromaticus* และนำมาทำให้แห้งด้วยกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze-dried) และนำมาวิเคราะห์ความสามารถในการจับอนุมูลอิสระในหลอดทดลองพบว่า สารสกัดสามารถทำลายอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ ไนตริกออกไซด์และอนุมูลโลหะเฟอร์รัสไอออน (ferrous ion chelating)

Wang และ คณะ (2009) ได้ทดสอบสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดผล glossy privet fruit (*Ligustrum lucidum Ait.*) โดยทำการสกัดด้วยน้ำ เอทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ และเอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสารสกัดที่ได้จากแต่ละตัวทำลายสามารถทำลายอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ ไนตริกออกไซด์ และ ไฮดรอกซิล (hydroxyl radical) โดยที่ความเข้มข้นเท่ากันสารสกัดที่ใช้เอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวสกัดจะมีประสิทธิภาพมากที่สุด แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

2.2 การตรวจหาปริมาณไนไตรต์ตกค้าง

การตรวจหาปริมาณไนไตรต์ตกค้างนั้นมีอยู่หลายวิธี เช่น วิธีทางแคลอริเมตริก (colorimetric method) และวัดการเปลี่ยนแปลงสีด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ วิธีฟลูออโรเมตริก (fluorometric method) วิธีโพลารोगราฟฟี (polarography) วิธีโวลท์แอมมิทรี (voltammetry) และวิธีโฟลว์อินเจกชัน-สเปกโตรโฟโตเมตรี (flow injection spectrophotometry) (Veena และ Narayana, 2009) แต่วิธีที่นิยมใช้ตรวจหาปริมาณไนไตรต์ตกค้างในอาหารคือวิธีทางแคลอริเมตริกโดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ในการตรวจวิเคราะห์ เนื่องจากวิธีฟลูออโรเมตริก (fluorometric method) และวิธีอื่นๆ จะใช้สารเคมีที่มีราคาสูง มีขั้นตอนยุ่งยาก และใช้เวลานาน (Veena และ Narayana, 2009) แม้มีความไวต่อการวัดสูงมาก แต่หากใช้ตรวจตัวอย่างอาหารที่มีองค์ประกอบหลายประเภท เช่น เกลือ ไขมัน น้ำตาล วิตามินต่างๆ เป็นต้น จะทำให้ค่าที่ได้คลาดเคลื่อนสูง หรือต้องเตรียมตัวอย่างให้มีความบริสุทธิ์มาก ส่วนวิธีทางแคลอริเมตริกมีความไวต่อองค์ประกอบในอาหารน้อยกว่า โดยใช้รีเอเจนต์ (reagent) ที่เจาะจงเข้าทำปฏิกิริยากับไนไตรต์แอซิด ที่เป็นสารตัวแรกๆที่ได้จากการที่ไนไตรต์เปลี่ยนสภาพดังภาพที่ 2.9 การวิเคราะห์ไนไตรต์ตกค้างด้วยวิธีทางแคลอริเมตริก (AOAC, 2000) ใช้หลักการดูดกลืนแสงที่อยู่ช่วง

ความยาวคลื่นต่างๆ สารตัวอย่างจะดูดกลืนรังสี หรือแสงบางส่วนไว้ แสงที่ไม่ดูดกลืนจะผ่านออกมายังเครื่องวัดแสง และถูกวัดปริมาณแสงที่ผ่านออกมา โดยการหักล้างกับปริมาณของแสงก่อนดูดกลืน และทำการประมวลผลเป็นกราฟหรือสเปกตรัม ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) และค่าความยาวคลื่น (λ) ซึ่งการตรวจหาปริมาณไนไตรท์ตกค้างในอาหารประเภทเนื้อสัตว์จะวัดในช่วงความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร และใช้สารที่สามารถทำปฏิกิริยาเกิดเป็นสารสีสำหรับนำไปใช้วัดค่าการดูดกลืนแสง

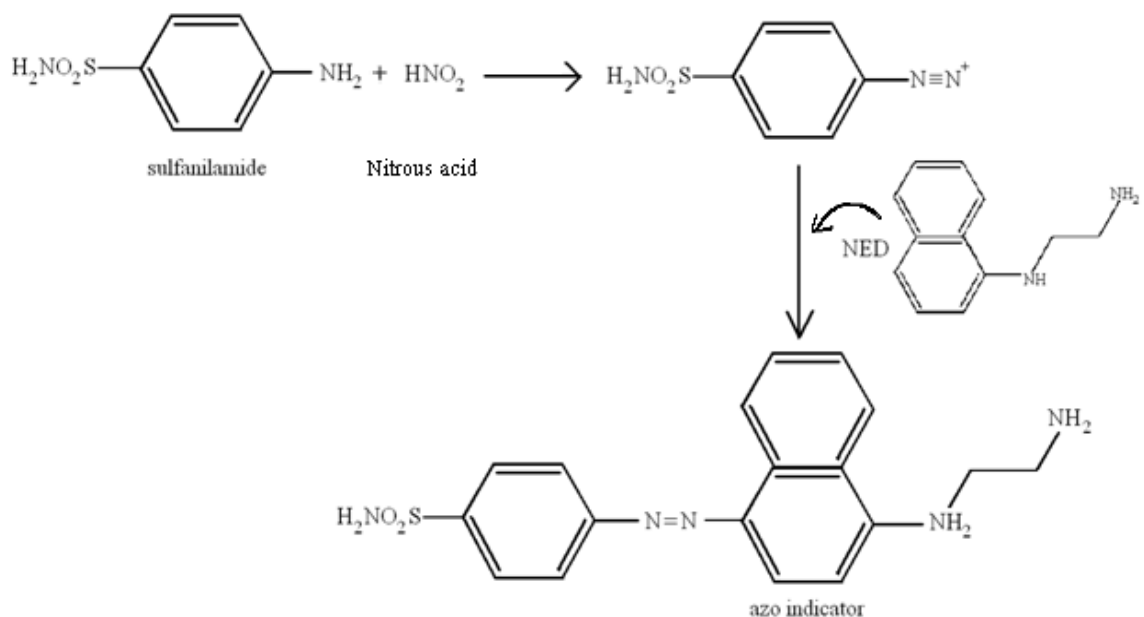
2.2.1 กลไกการทำงานของรีเอเจนต์ (reagent)

การวิเคราะห์ปริมาณไนไตรท์ตกค้างด้วยวิธีทางแคลอริเมตริก (colorimetric method) ตามวิธีของ AOAC (2000) หลักการคืออาศัยการเข้าทำปฏิกิริยากันระหว่างไนตรัสแอซิดและซัลฟานิลาไมด์ ซึ่งมีวงแหวน เอมีนปฐมภูมิ (aromatic primary amine) ก่อนทำให้เกิดเป็นไดอะโซเนียมไอออน (diazonium ion) ดังภาพที่ 2.8 แล้วให้เกิดการทำปฏิกิริยาต่อ (coupling) กับ NED (N-(1-naphthyl) ethylenediamine) ในสถานะที่เป็นกรด ได้เป็น azo indicator ดังภาพที่ 2.9 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร



ภาพที่ 2.8 : วงแหวนเอมีนปฐมภูมิ (ซ้าย) และ ไดอะโซเนียมไอออน (ขวา)

ที่มา : Song และKaylor (2007)



ภาพที่ 2.9 : การเกิด azo indicator

ที่มา : Song และ Kaylor (2007)

2.3 พืชสมุนไพรและส่วนผสมที่นิยมใช้ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป

ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปในประเทศไทยที่นิยมผลิตได้แก่ ไส้กรอก กุนเชียง หมูแผ่น เป็นต้น นอกจากส่วนผสมหลักคือเนื้อสัตว์แล้วยังมีส่วนผสมอื่นๆดังนี้

2.3.1 โปรตีนจากแหล่งอื่น

โปรตีนจากแหล่งอื่นที่นอกเหนือจากโปรตีนจากเนื้อสัตว์โดยตรง เช่น ไข่ขาวผง โปรตีนถั่วเหลือง เพื่อช่วยเพิ่มความคงตัวของผลิตภัณฑ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการผลิตปริมาณมากหรือระดับอุตสาหกรรม

2.3.2 เครื่องเทศและสมุนไพร

เครื่องเทศและสมุนไพรที่นิยมเติมลงในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป เช่น เม็ดผักชี อบเชย ปาปริก้า พริกขี้หนูสวน พริกไทยดำ พริกไทยขาว กระเทียม ยี่ห่วย ตะไคร้ ข่า ใบมะกรูด เป็นต้น โดยแต่ละชนิดจะมีปริมาณการใช้ที่แตกต่างกันออกไป ทำหน้าที่ในการเพิ่มกลิ่นรส และเครื่องเทศบางชนิดพบว่ายับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้จึงเป็นการยืดอายุของผลิตภัณฑ์ได้อีกด้วย

Lo'pez-Malo และคณะ (2007) ได้ศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Aspergillus flavus* ของสารสกัดเปลือกอบเชยซึ่งสกัดด้วยเอทิลอะซิเตต (ethyl acetate) พบว่า สภาวะที่ pH 3.5 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เวลา 30 วัน สารสกัดเปลือกอบเชยที่ความเข้มข้น 200

ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญ เท่ากับโซเดียมเบนโซเอต (sodium benzoate) ที่ความเข้มข้น 400 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

2.4 อบเชย

อบเชยเป็นพืชยืนต้นอยู่ในวงศ์ Lauraceae สกุล *Cinnamomum* ซึ่งมีความหลากหลายกว่า 50 ชนิด ในทวีปเอเชียและออสเตรเลีย ในประเทศไทยอบเชยสามารถหาได้ตามป่าธรรมชาติ เนื่องจากยังไม่มี การปลูกเป็นพืชเศรษฐกิจ ส่วนอบเชยที่วางจำหน่ายตามตลาดสดและตลาดขายเครื่องเทศยจีนใน กรุงเทพฯ นั้นจะเป็นอบเชยที่นำเข้า ส่วนมากนำเข้าจากประเทศอินโดนีเซีย และประเทศจีน ส่วนอบเชย จากประเทศศรีลังกาจะมีเป็นส่วนน้อยเนื่องจากราคาสูง(สันติสุข โสภณสิริ, 2549) ซึ่งอบเชยที่นำเข้ามา แต่ละประเทศก็จะมีสายพันธุ์ที่แตกต่างกันออกไป โดยงานวิจัยนี้ผู้วิจัย ใช้อบเชยป็นสายพันธุ์

Cinnamomum burmanii Blume

อบเชยขาว หรือ *Cinnamomum burmanii* Blume นั้นมีงานวิจัยเกี่ยวกับสารพฤกษเคมีค่อนข้างน้อย เมื่อเทียบกับลังคา (*Cinnamomum zelanicum* Linn) และอบเชยจีน (*Cinnamomum cassia* Blume) แต่ จากงานวิจัยพบว่า พืชวงศ์อบเชย (Lauraceae) โดยเฉพาะกลุ่ม cinnamon จะมีสารประกอบที่สำคัญ คือ ซินนามัลดีไฮด์ (cinnamaldehyde) หรือ ซินนามิก อัลดีไฮด์ (cinnamic aldehyde), สารกลุ่มอนุพันธ์ฟีนอลิก (phenolic derivative) เช่น ยูจีนอล (eugenol), สารกลุ่มโพลีฟีนอล (polyphenol) เช่น แทนนิน (tannins) (Cowan, 1999) ทั้งอดีตและปัจจุบันอบเชยเป็นพืชที่ใช้เป็นส่วนผสมในอาหารหลาย ประเภท เช่น ข้าวหมกไก่ ไส้กรอกรมควัน เนื้อสัตว์แปรรูปปรุงรสต่างๆ ผลิตภัณฑ์นมอบ เป็นต้น อีกทั้งยังเป็นส่วนผสมในยาหลายชนิด เช่น ยาจีน ยาชาดูอบเชย (สันติสุข โสภณสิริ, 2549) เป็นต้น เหตุที่มีการใช้อบเชยเป็นส่วนผสมทั้งทางยาและอาหารนี้เอง จึงทำให้มีนักวิจัยหลายท่านศึกษาสมบัติและ ประโยชน์ของอบเชย ดังนี้

พรรณี เคนรุ่งเรือง และคณะ (2550) ได้ทำการทดสอบสารพฤกษเคมีของพืชวงศ์อบเชย (Lauraceae) ในไทย 8 ชนิด คือ กระทั่งใบใหญ่ (*Litsea grandis* Hook. f.), เทพทาโร (*Cinnamomum porrectum* Kosterm. syn. *Cinnamomum parthenoxylon* Meissn.), พังบอน, หมีเหม็น (*Litsea glutinosa* C.B. Robinson), เชียด (*Cinnamomum iners* Blume), เอียน (*Neolitsea zeylanica* Merr.), ขางบง (*Persea Kurzii* Kosterm.) และทำม้ง (*Litsea petiolata* Hook. f.) สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอลพบว่าทุกชนิดมี สารกลุ่ม condensed tannins ยกเว้นหมีเหม็น ซึ่ง Condense tannins เป็นพอลิเมอร์ Polyphenol ที่โครงสร้าง

สร้างซับซ้อน สลายตัวได้ยากและละลายน้ำได้น้อยกว่า Hydrolysable tannins เพราะในโครงสร้างโมเลกุลไม่มีน้ำตาลอยู่

Dragland และคณะ (2003) ได้ทำการศึกษาปริมาณ Total Antioxidants ของพืชหลายชนิด และพบว่าเปลือก *Cinnamomum cassia* Blume มี Total Antioxidants เท่ากับ 120.2 มิลลิโมลต่อตัวอย่าง 100 กรัมสูงสุดในสมุนไพรกลุ่มพืชสมุนไพรจากจีนและญี่ปุ่น

Mathew และ Abraham (2006) ได้ศึกษาสมบัติและประสิทธิภาพการเป็น antioxidant ของสารสกัดอบเชย (*Cinnamomum verum*) ในหลอดทดลองพบว่า สารสกัดอบเชยสายพันธุ์ *Cinnamomum verum* ซึ่งได้จากการสกัดเปลือกอบเชยด้วยเมทานอล (methanol) มีความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ (free radical scavenging) DPPH• radicals ได้ดีกว่า 2,3-tert-butyl-4-methoxyphenol (BHA) ในความเข้มข้นที่เท่ากันและเมื่อเพิ่มความเข้มข้นขึ้นคือ 3.125, 6.26, 12.5, 25, 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ DPPH• ของสารสกัดอบเชยก็จะดีขึ้นด้วยโดยที่ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สกัดอบเชยสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH• ได้กว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการจับอนุมูลอิสระ ABTS radicals cation พบว่าประสิทธิภาพของสารสกัดอบเชยเพิ่มตามความเข้มข้นและค่อนข้างคงที่ที่ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่า trolox equivalent antioxidant capacity เท่ากับ 18.45 ± 0.6 นอกจากนี้สารสกัดอบเชยยังมีความสามารถจับอนุมูลอิสระกลุ่ม reactive oxygen species (ROS) คือ Superoxide radicals ($O_2^{\cdot-}$) และ hydroxyl radicals ($OH^{\cdot}$) โดยสารสกัดอบเชยสามารถยับยั้ง superoxide radicals ($O_2^{\cdot-}$) ได้ที่ความเข้มข้น 12.5 ถึง 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรยับยั้ง hydroxyl radicals ($OH^{\cdot}$) ได้ที่ความเข้มข้น 15 ถึง 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอล (total phenolic) เท่ากับ 289.0 ± 2.2 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อสารสกัด 1 กรัม

Singh และคณะ (2007) เปรียบเทียบสมบัติทางเคมีของ volatile oils และ oleoresin ทั้งจากใบ (Leaf) และจากเปลือกไม้ (Bark) ของอบเชยสายพันธุ์ *Cinnamomum zeylanicum* Blume พบว่า เมื่อเติม oleoresin ลงไปที่ความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ มีความสามารถในการยับยั้งการเกิดสารประกอบจาก primary และ secondary oxidation ในตัวอย่างน้ำมันมัสตาร์ด (mustard oil) เมื่อวิเคราะห์หาค่า peroxide value เรียงลำดับความสามารถในการยับยั้งจากมากไปน้อยจะได้ดังนี้ Leaf oleoresin > BHT > PG $\approx$ eugenol > Bark oleoresin $\approx$ BHA > Leaf oil > cinnamaldehyde > bark oil และพบว่ามีความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระ DPPH• และ hydroxyl radicals ($OH^{\cdot}$) นอกจากนี้ด้านการยับยั้งการเจริญของเชื้อราพบว่า oleoresin จากใบที่ความเข้มข้น 6 ไมโครลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของ *Penicillium*

citrinum ส่วน oleoresin จากเปลือกที่ความเข้มข้น 6 ไมโครลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของ *Aspergillus flavus*, *A. ochraceus*, *A. niger*, *A. terreus*, *Penicillium citrinum* และ *P. viridicatum* และเมื่อเทียบกับสารปฏิชีวนะ Ampicillin พบว่าที่ความเข้มข้นเท่ากัน oleoresin จากใบ และ volatile oils จากเปลือก มีความสามารถในการยับยั้ง *Salmonella typhi* ได้ดีกว่า และ volatile oils จากใบ และ oleoresin จากเปลือก มีความสามารถในการยับยั้ง เชื้อ *Staphylococcus aureus* ได้ดีกว่า จากนั้นผู้วิจัยได้ทดสอบหาสารประกอบ volatile oils และ oleoresin ในใบ ด้วยวิธี Gas chromatographic massspectroscopy พบว่ามีองค์ประกอบอยู่ 19 และ 25 องค์ประกอบ ตามลำดับ ซึ่งสารส่วนใหญ่ คือ eugenol มีอยู่ 87.3 เปอร์เซ็นต์ และ 87.2 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วน volatile oils และ oleoresin จากเปลือกมี E-cinnamal-dehyde เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ โดยมีอยู่ 97.7 เปอร์เซ็นต์ และ 50.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

2.5 การยับยั้งการเกิดไนโตรซามีน

การยับยั้งการเกิดไนโตรซามีนซึ่งเป็นสารประกอบเอ็น-ไนโตรโซกลุ่มหนึ่ง สามารถทำได้ 2 วิธี คือ การเร่งการแตกตัวของไนไตรท์เพื่อลดปริมาณไนไตรท์ และการใช้สารทำลายไนโตรเซติงเอเจน

1.) การเร่งการแตกตัวของไนไตรท์

การเร่งให้ไนไตรท์แตกตัวเพื่อให้ลดปริมาณไนไตรท์ตกค้าง จะอาศัยการปรับสภาพให้เป็นกรดหรือค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ต่ำ เพื่อเหมาะสมต่อการแตกตัวของไนไตรท์ โดยในปี 1970 มีการค้นพบว่าพบว่าวิตามินซี (ascorbic acid) เมื่อถูกออกซิไดซ์จะกลายเป็นดีไฮโดรแอสคอร์บิกแอซิด (dehydroascorbic acid) ซึ่งสามารถรีดิวซ์ไนตรัสแอนไฮไดรด์ (nitrous anhydride, N_2O_3) ให้กลายเป็นไนตริกออกไซด์ (nitric oxide, NO) จึงสามารถช่วยยับยั้งหรือชะลอปฏิกิริยาการเกิดไนโตรซามีนและส่งผลให้เกิดสารไนโตรโซไมโอโกลบินเร็วยิ่งขึ้น แต่ในระดับอุตสาหกรรมจะใช้อีริโธรบิกแอซิด (erythorbic acid) ที่เป็นอีพิเมอร์ (epimer) ของวิตามินซี แทนเพราะราคาถูกกว่าวิตามินซี (Richard A เข้าถึงจาก: <http://lpi.oregonstate.edu/f-w00/nitrosamine.html>) แต่ถ้าจะยับยั้งโดยไม่ให้เกิดปฏิกิริยาการเกิดไนโตรซามีนขึ้นอีก ต้องใช้วิตามินซีปริมาณมากพอที่จะรีดิวซ์ไนตรัสแอนไฮไดรด์ที่เกิดขึ้นใหม่เรื่อยๆจนหมด ซึ่งไนตรัสแอนไฮไดรด์ที่เกิดขึ้นใหม่นี้เกิดจากไนตริกออกไซด์ที่สามารถทำปฏิกิริยากับสารอนุมูลอิสระกลุ่มรีแอ็กทีฟออกซิเจน (reactive oxygen species, ROS) เช่น ซูเปอร์ออกไซด์ ได้เป็นไนไตรท์และไนเตรต ดังภาพที่ 2.7 และสารทั้งสองตัวนี้สามารถก่อให้เกิด ไนตรัสแอนไฮไดรด์ ดังภาพที่ 2.5 และ 2.7 การเติมวิตามินซีในปริมาณมากไม่สามารถทำได้จริงในอาหาร เนื่องจากการเติมวิตามินซีปริมาณมากเกินไปจะส่งผลต่อรสชาติผู้บริโภคอาจไม่ยอมรับ

2.) การใช้สารทำลายไนโตรเซติงเอเจน(nitrosating agents)

ไนโตรเซติงเอเจน (nitrosating agents) คือสารที่สามารถเข้าเกิดปฏิกิริยากับไนโตรเซตเอเบิลเอมีน (nitrosatable amines) ได้เป็นสารประกอบไนโตรซามีน ไนโตรเซติงเอเจน (nitrosating agents) ได้แก่ ไนตรัสแอนไฮไดรด์ ดังนั้นหากสามารถลดไนโตรเซติงเอเจนได้ การเกิดสารประกอบไนโตรซามีนก็จะลดลงตามไปด้วย จึงมีผู้ศึกษาสารต่างๆที่สามารถทำหน้าที่ทำลายสารตั้งต้นดังกล่าว โดยมักศึกษาควบคู่ไปกับการวิเคราะห์ประสิทธิภาพการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันดังนี้

Chung และคณะ (2002) ได้ศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเกิดสารเอ็น-ไนโตรโซไดเมทิลเอมีน (N-nitrosodimethylamine, NDMA) ของสารสกัดสตอเบอรี่ กระเทียม และkale (ตระกูลผักกาดหอม) ทั้งในหลอดทดลองและในมนุษย์พบว่า ในหลอดทดลองสารสกัดกระเทียมมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิด เอ็น-ไนโตรโซไดเมทิลเอมีน ได้ดีกว่าสารสกัดสตอเบอรี่และ kale ส่วนการทดลองในมนุษย์ ผู้วิจัยได้ทำการจัดอาหารเป็น 4 กลุ่ม โดย 1 กลุ่ม ใช้คน 10 คน รวมทั้งหมดเป็น 40 คน มีชาย 27 คน หญิง 13 คน อายุโดยเฉลี่ยอยู่ที่ 24 ± 3 ปี ทำการทดลอง 4 วัน โดยวันที่ 1-3 จะเป็นวันควบคุมอาหารเบื้องต้นในทุกกลุ่ม คือ ไม่ได้รับประทานอาหารที่มีสารเอ็น-ไนโตรโซไดเมทิลเอมีน ในเดรท สารกลุ่มเอมีน สารประกอบซัลเฟอร์ วิตามินซี และสารประกอบฟีนอลิก เป็นส่วนประกอบ จากนั้นวันที่ 4 ทุกกลุ่มจะได้รับอาหารที่มีในเดรท 400 มิลลิกรัม แต่กลุ่มที่ 2-4 จะมีการให้น้ำที่มีสารสกัดสตอเบอรี่ กระเทียม และ kale อัตราส่วนต่างกัน ส่วนกลุ่มที่ 1 ไม่ได้รับสารสกัดใดๆ จากนั้นเมื่อผ่านไป 18 ชั่วโมง จะทำการวิเคราะห์วิเคราะห์หาปริมาณสารเอ็น-ไนโตรโซไดเมทิลเอมีนที่ถูกขับออกมาในรูปปัสสาวะ ด้วยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟีกับ thermal energy analysis (GC-TEA) ซึ่งพบว่าเมื่อให้เครื่องดื่มที่เป็นสารสกัดสตอเบอรี่ กระเทียมและ kale ปัสสาวะของผู้ทดสอบมีปริมาณสารเอ็น-ไนโตรโซไดเมทิลเอมีน ลดลง 70 เปอร์เซ็นต์, 71 เปอร์เซ็นต์ และ 44 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องตามการทดลองในหลอดทดลอง

Lu และ Chen (2007) ได้ศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเกิดสารเอ็น-ไนโตรโซไดเมทิลเอมีน ของสารสกัดชาเขียวและสารสกัดชาเขียวที่เติมเอนไซม์แทนเนส (tannase) เปรียบเทียบกับวิตามินซี (ascorbic acid) ผลพบว่าชาเขียวที่เติมเอนไซม์แทนเนสมีประสิทธิภาพยับยั้งการเกิดสารเอ็น-ไนโตรโซไดเมทิลเอมีนได้ดีที่สุด รองลงมาคือชาเขียวที่ไม่เติมเอนไซม์ และวิตามินซีตามลำดับ โดยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นผู้วิจัยได้วิเคราะห์องค์ประกอบของชาเขียวที่เติมเอนไซม์แทนเนสด้วยโครมาโตกราฟีสมรรถนะสูง (High-performance liquid chromatography,

HPLC) ได้สาร 4 กลุ่ม คือ อีพิกาทะชิน (epicatechin, EC) อีพิกัล โลคาเทชิน (epigallocatechin, EGC) อีพิกัล โลคาเทชิน แกลเลต (epigallocatechin gallate, EGCG) และ อีพิกาทะชิน แกลเลต (epicatechingallate, ECG) และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์แทนเนสพบว่าปริมาณสาร อีพิกัล โลคาเทชิน แกลเลตและอีพิกาทะชิน แกลเลตจะลดลง แต่อีพิกาทะชินและอีพิกัล โลคาเทชินจะเพิ่มสูงขึ้น เมื่อทดสอบความสามารถในการลดปริมาณไนไตรท์ของสารทั้ง 4 กลุ่ม เปรียบเทียบกับสารคาเทชิน (catechin) กรดแกลลิก (gallic acid) และวิตามินซี พบว่า EGCG และกรดแกลลิกมีความสามารถในการลดปริมาณไนไตรท์มากที่สุดเท่ากันรองลงมาคือ อีพิกัล โลคาเทชิน อีพิกาทะชิน แกลเลต คาเทชิน อีพิกาทะชิน และสุดท้ายคือวิตามินซี

Choi และคณะ (2009) ได้ศึกษาสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของพืช *Achyranthis radix* (สมุนไพรจีนชนิดหนึ่ง) ที่ตัวสกัดต่างๆซึ่งได้ทำการศึกษาในหลอดทดลองและในหนูทดลอง คณะผู้วิจัยพบว่า เมื่อสกัด *Achyranthis radix* ด้วยเอ็น-บิวทานอล (n-butanol) สารสกัดที่ได้จะมีความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ DPPH• มากที่สุดที่ 31.09 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และความสามารถในการทำลายไนไตรท์ (nitrite scavenging) ของสารสกัด 1 มิลลิลิตร สูงสุดถึง 90.2 เปอร์เซ็นต์ ที่สภาวะ pH 1.2 โดยมีความสามารถไม่แตกต่างกับ BHT และมากกว่ากลุ่มควบคุม ที่ไม่มีการเติมสารสกัดถึง 90 เปอร์เซ็นต์

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัตถุดิบ

เมล็ดผักชีป่น	(บริษัท ง่วนสูง (1974) เขาวราช จำกัด, ประเทศไทย)
อบเชยป่น	(บริษัท ง่วนสูง (1974) เขาวราช จำกัด, ประเทศไทย)
ปาปริก้าป่น	(บริษัท ง่วนสูง (1974) เขาวราช จำกัด, ประเทศไทย)
พริกชี้หนูสวนป่น	(บริษัท ง่วนสูง (1974) เขาวราช จำกัด, ประเทศไทย)
พริกไทยดำป่น	(บริษัท ง่วนสูง (1974) เขาวราช จำกัด, ประเทศไทย)
พริกไทยขาวป่น	(บริษัท ง่วนสูง (1974) เขาวราช จำกัด, ประเทศไทย)
กระเทียมป่น	(บริษัท ง่วนสูง (1974) เขาวราช จำกัด, ประเทศไทย)
ยี่หร่าป่น	(บริษัท ง่วนสูง (1974) เขาวราช จำกัด, ประเทศไทย)
ตะไคร้ป่น	(บริษัท ง่วนสูง (1974) เขาวราช จำกัด, ประเทศไทย)
จำป๋น	(บริษัท ง่วนสูง (1974) เขาวราช จำกัด, ประเทศไทย)
ใบมะกรูดป่น	(บริษัท ง่วนสูง (1974) เขาวราช จำกัด, ประเทศไทย)
โปรตีนสกัดจากถั่วเหลือง	(บริษัท The Solae Company, USA)
ไข่ขาวผง	(บริษัท Food EQ จำกัด, ประเทศไทย)
วอดก้า 40 เปอร์เซ็นต์	(บริษัท Absolut Spirits จำกัด, ประเทศไทย)
เนื้อหมูส่วนสะโพก จากตลาดสดหัวตะเข้ เขตตลาดกระบ้ง กรุงเทพมหานคร	

3.2 เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์

เครื่องบดแบบหยาบ	(บริษัท Philip-Cucina, Indonesia)
เครื่องชั่งละเอียด 2 ตำแหน่ง	(บริษัท Pioneer, USA)
เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง	(บริษัท Denver, Germany)
เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge)	(บริษัท Beckman Coulter, USA)
เครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary Evaporator)	(บริษัท B.U.C.H.I B-169, Switzerland)
UV-VIS สเปกโตรโฟโตมิเตอร์	(บริษัท Shimadzu UV-1601, Japan)
water bath shaker	(บริษัท Memmert-WNB 7-45, Germany)

3.3 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

2,2-Diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH)	(บริษัท Sigma, USA)
Torlox	(บริษัท Aldrich, Germany)
Sodium carbonate (Na_2CO_3)	(บริษัท Merck, Germany)
Gallic acid	(บริษัท Sigma, Germany)
Hydrochloric acid (HCl)	(บริษัท Merck, Germany)
Sodium acetate (CH_3COONa)	(บริษัท Merck, Germany)
Iron(III)chloride hexahydrate ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	(บริษัท Sigma, Sweden)
2,4,6-Tris (2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ)	(บริษัท Sigma, Switzerland)
Sodium nitrite (NaNO_2)	(บริษัท Merck, Germany)
Sulfanilamide	(บริษัท Sigma, Switzerland)
N-(1-naphthyl) ethylenediamine	(บริษัท Merck, Germany)
Acetic acid (CH_3COOH)	(บริษัท Merck, Germany)
Folin-Ciocalteu reagent	(บริษัท BDH, England)
Sodium nitroprusside	(บริษัท Merck, Germany)
Hydrogen peroxide	(บริษัท Merck, Germany)
Diethylene-triamine-pentaacetic acid (DTPA)	(บริษัท Merck, Germany)
Evans Blue	(บริษัท Merck, Germany)
Potassium chloride	(บริษัท Merck, Germany)
Sodium chloride	(บริษัท Merck, Germany)
Ethanol 95 เปอร์เซ็นต์	

3.4 สถานที่ดำเนินการทดลอง

ห้องปฏิบัติการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.5 วิธีดำเนินงาน

3.5.1 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรที่ตกค้าง

การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรที่ตกค้างจะวิเคราะห์ด้วยวิธีทางแคลอริเมตริก (AOAC Official Method 973.31, Nitrites in cured meat, Colorimetric method 2000) และวัดความเข้มสีที่เปลี่ยนแปลง

ไปของสารละลายหลังเติมรีเอเจนต์ (reagent) ด้วยวิธีทางสเปกโตรโฟโตเมตรี ดังภาพที่ 10 โดยศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณไนไตรท์ตกค้าง 2 ปัจจัย คือ อุณหภูมิและเวลา

สารละลายไนไตรท์ ความเข้มข้น 2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 25 มิลลิลิตร



เติมรีเอเจนต์ 1 (sulfanilamide) 2.5 มิลลิลิตร

เขย่า และตั้งทิ้งไว้ 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง



เติมรีเอเจนต์ 2 (NED) 2.5 มิลลิลิตร + น้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร

เขย่า และตั้งทิ้งไว้ 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง



วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

ภาพที่ 3.1 : ขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณไนไตรท์ตกค้าง

ที่มา : ดัดแปลงจาก AOAC Official Method 973.31 (2000) ดังภาคผนวก ก.

3.5.1.1 การวิเคราะห์ผลของอุณหภูมิที่มีต่อการวิเคราะห์ปริมาณไนไตรท์ตกค้าง

ควบคุมอุณหภูมิที่ทำการทดลอง (ขณะรอให้รีเอเจนต์ 1 (sulfanilamide) และรีเอเจนต์ 2 (NED) เกิดปฏิกิริยา) โดยอุณหภูมิที่ศึกษา คือ 20, 25, 30, 35, 45 และ 60 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ทำอุณหภูมิละ 3 ซ้ำ นำค่าเฉลี่ยที่ได้ไปสร้างกราฟระหว่างอุณหภูมิกับค่าการดูดกลืนแสง เพื่อดูแนวโน้มและเลือกอุณหภูมิที่เริ่มทำให้กราฟมีค่าความชันเท่ากับศูนย์ เป็นอุณหภูมิสำหรับการทดลองในข้อ 3.5.3

3.5.1.2 การวิเคราะห์ผลของเวลาที่มีต่อการวิเคราะห์ปริมาณไนไตรท์ตกค้าง

ในการทดลองจะแบ่งเป็น 2 ช่วง ในช่วงที่หนึ่งจะกำหนดเวลาที่ใช้ในการรอให้ รีเอเจนต์ 1 (sulfanilamide) เกิดปฏิกิริยา เป็น 2, 5, 10, 15, 20 และ 30 นาที และ รีเอเจนต์ 2 (NED) เป็น 15 นาที ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำค่าเฉลี่ยที่ได้ไปสร้างกราฟระหว่างเวลากับค่าการดูดกลืนแสง เพื่อดูแนวโน้มและเลือกเวลาที่เริ่มทำให้กราฟมีค่าความชันเท่ากับศูนย์ มาเป็นเวลาสำหรับช่วงที่สอง

ในช่วงที่สองนี้จะใช้เวลารอให้รีเอเจนต์ 2 (NED) เกิดปฏิกิริยาเป็น 5, 15, 30, 45 และ 60 นาที ทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ นำค่าเฉลี่ยที่ได้ไปสร้างกราฟระหว่างเวลากับค่าการดูดกลืนแสง เพื่อดูแนวโน้ม

และเลือกเวลาที่เริ่มทำให้กราฟมีค่าความชันเท่ากับศูนย์ มาเป็นเวลาสำหรับการทดลองต่อไป
วิเคราะห์ทางสถิติหาความแตกต่างของปัจจัยที่มีผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนตกค้าง
ด้วยวิธีทางแคลอริเมตริก โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Complete Randomized Design, CRD)
และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธีของคันแคน (Duncan's New Multiple Range Test)

3.5.2 การศึกษาความสามารถด้านการลดปริมาณไนโตรเจนตกค้างของพืชสมุนไพรและส่วนผสมอื่น ที่นิยมใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป

นำเม็ดผักชีป่น อบเชยป่น ปาปรีก้าป่น พริกขี้หนูสวนป่น พริกไทยดำป่น พริกไทยขาวป่น กระเทียมป่น ยี่หร่าป่น ตะไคร้ป่น ข่าป่น ใบมะกรูดป่น โปรตีนสกัดจากถั่วเหลือง และไข่ขาวผง มาชั่งตัวอย่างละ 0.05 กรัม ใส่หลอดทดลอง รวมทั้งหมด 13 หลอด จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมไนไตรท์ความเข้มข้น 200 ppm ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปิดปากหลอดทดลองด้วยพาราฟิล์มและวางไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน (24 ชั่วโมง) จากนั้นนำมาหมุนเหวี่ยงที่ 8700 รอบ/นาที นาน 15 นาที คัดส่วนใสมาวิเคราะห์หาความเข้มข้นของโซเดียมไนไตรท์ที่เหลือด้วยวิธีตามข้อ 3.5.1 โดยทำการทดลอง 5 ซ้ำ

3.5.3 การศึกษาสมบัติของสารสกัดอบเชย

3.5.3.1 การเตรียมสารสกัดอบเชย

การเตรียมสารสกัดอบเชยดัดแปลงจากวิธีของ Mathew และ Abraham (2006) โดยนำผงเปลือกอบเชยแช่ตัวทำละลายในอัตราส่วนอบเชยต่อตัวทำละลายเท่ากับ 1 ต่อ 10 ในขวดรูปชมพู่ เขย่าที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นจะนำไปทำเป็นสารสกัดในรูปแบบต่างๆดังนี้

1) กรณีที่ใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย จะนำสารชั้นหนืดที่ได้หลังผ่านการแช่ไปแยกส่วนใสและส่วนที่เป็นตะกอนผงอบเชยด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 9,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 20 นาที เก็บส่วนใสด้านบนมาทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความเร็ว 130 รอบ/นาที เป็นเวลา 90 นาที ได้เป็นสารละลายชั้นหนืดสีน้ำตาล (สารสกัด ก)

นำสารละลายชั้นหนืดไปอบแห้งด้วยเตาอบมรร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง แล้วบดละเอียดเป็นผง (สารสกัด ข)

นำสารละลายชั้นหนืดไปอบแห้งด้วยเตาอบมรร้อนที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง แล้วบดละเอียดเป็นผง (สารสกัด ค)

2) กรณีที่ใช้เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวทำละลายจะนำสารละลายสีน้ำตาลแดง เข้มที่ได้หลังจากผ่านการแช่ผ่านการกรองด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 4 ระเหยตัวทำละลาย ออกโดยใช้เครื่องระเหยแบบสุญญากาศที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ความเร็ว 40 รอบ/นาที เป็นเวลา 25 นาที จากนั้นนำไปอบแห้งด้วยเตาอบร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมงแล้ว บดละเอียดเป็นผง(สารสกัด ง)

เก็บสารสกัด ก ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส ส่วนสารสกัดที่อยู่ในรูปผงซึ่งได้แก่ สารสกัด ข ค และ ง จะเก็บในถุงซิปล็อค 2 ชั้นและใส่ในขวดสีชาเก็บที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส นำสาร สกัดต่างๆมาทำการวิเคราะห์ตามข้อที่ 3.5.3.2 – 3.5.3.4

3.5.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมด (Total polyphenol contents)

วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดตามวิธีของ ประพันธ์และวันทนีย์ (2545) โดยสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดจะทำปฏิกิริยากับ Folin-Ciocalteu reagent เกิดเป็นสารประกอบ เชิงซ้อนสีน้ำเงิน ซึ่งสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร และใช้กรดแกล ลิกเป็นสารประกอบฟีนอลมาตรฐาน รายงานผลของปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมด ในหน่วย ของ มิลลิกรัมกรดแกลลิก/กรัมตัวอย่างแห้ง รายละเอียดการวิเคราะห์แสดงในภาคผนวก ก.

3.5.3.3 การวิเคราะห์ความสามารถด้านการเป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัด อบเชยรูปแบบต่างๆ

1) การวิเคราะห์ความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระ DPPH

วิเคราะห์ความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระ DPPH จะใช้วิธี DPPH method ซึ่งดัดแปลง จากรายงานของ Murakami และคณะ (2004) รายละเอียดการวิเคราะห์แสดงในภาคผนวก ก.

2) การวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริก

วิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริก จะใช้วิธี ที่ดัดแปลงจาก Benzie และ Strain (1999) รายละเอียดการวิเคราะห์แสดงในภาคผนวก ก.

3) การวิเคราะห์ความสามารถในการทำลายไนตริกออกไซด์ (nitric oxide scavenging)

การวิเคราะห์ความสามารถในการทำลายไนตริกออกไซด์ ตามวิธีของ Govindarajan และคณะ (2003) รายละเอียดการวิเคราะห์แสดงในภาคผนวก ก.

3.5.3.4 การวิเคราะห์ความสามารถในการลดปริมาณไนโตรที่ตกค้างของสารสกัดอบเชย

เดิมสารสกัดอบเชยรูปแบบ ก ข ค และ ง (รูปแบบละ 5 ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5

กรัมน้ำหนักแห้ง/มิลลิลิตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในสารละลายโซเดียมไนไตรท์ ความเข้มข้น 200 ppm ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ปิดปากหลอดทดลองด้วยพาราฟิล์ม วางไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน(24 ชั่วโมง) จากนั้นนำมาหมุนเหวี่ยงที่ 9000 รอบ/นาที นาน 15 นาที ดูค่าส่วนใสมาวิเคราะห์หาความเข้มข้นของไนไตรท์ที่เหลือตามวิธีข้อ 3.5.1

3.5.4 การวิเคราะห์ความสามารถในการลดปริมาณไนไตรท์ตกค้างของสารสกัดอบเชยในไส้กรอกหมูรมควัน

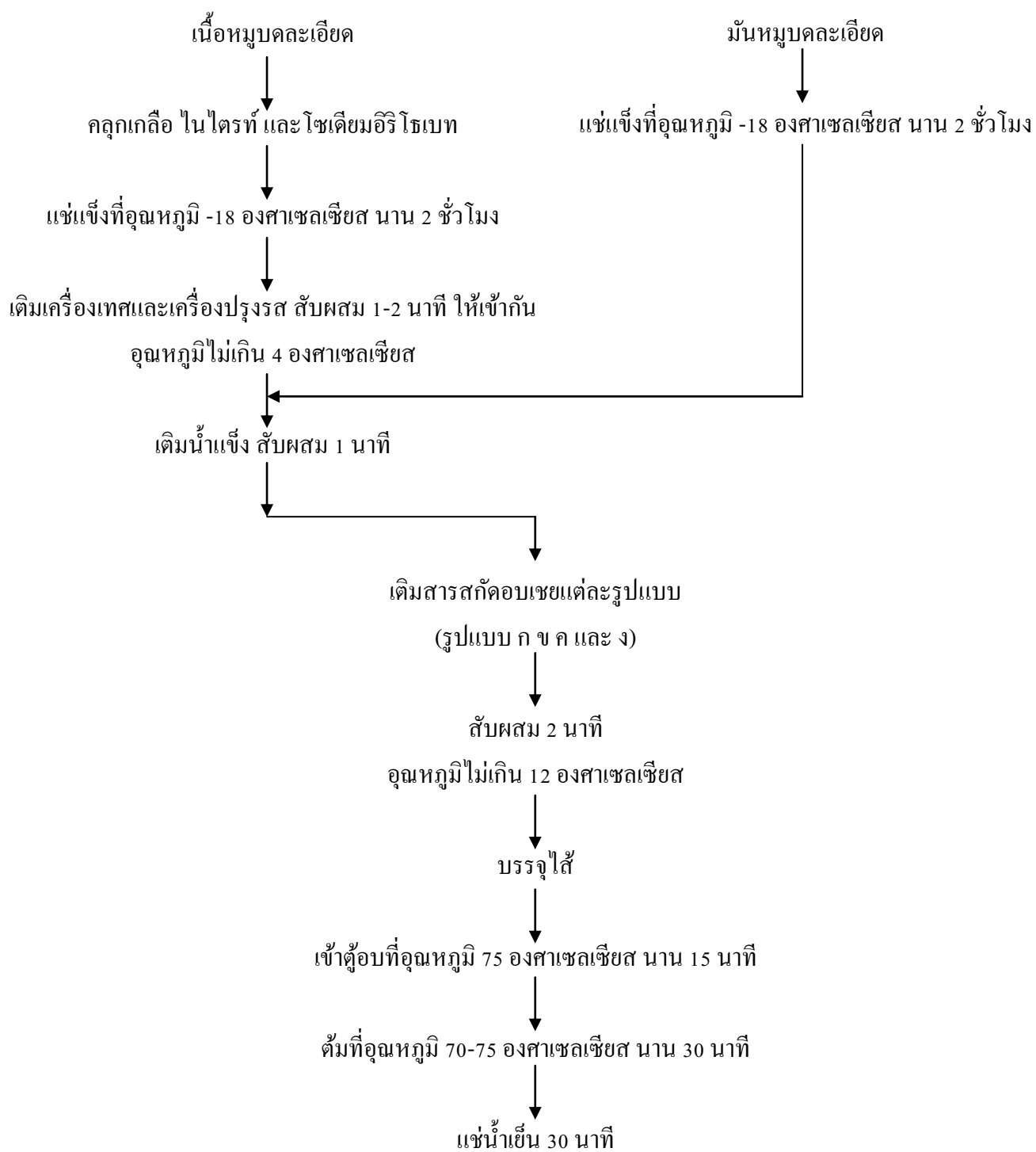
3.5.4.1 การเตรียมไส้กรอกหมูรมควัน

ทำการเตรียมไส้กรอกหมูรมควันดังภาพที่ 3.2 โดยใช้ส่วนผสมตามตารางที่ 3.1 และเติมสารสกัดอบเชยในปริมาณต่างๆ จากนั้นนำไส้กรอกหมูรมควันที่ผลิตได้เก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปวิเคราะห์ตามข้อ 3.5.4.2

ตารางที่ 3.1 สูตรในการผลิตไส้กรอกหมูรมควัน

ส่วนผสม	น้ำหนัก (กรัม)
เนื้อหมู	800
มันแข็ง	200
น้ำแข็งป่น	240
เกลือ	15
ไนไตรท์ (200 ppm)	0.26
พอสเฟต	3
ไข่ขาวผง	15
กระเทียมผง	6
ลูกผักชีป่น	2.5
ดอกจันทน์ป่น	2.5
พริกไทยดำป่น	6
น้ำตาล	9
ผงควัน	3.5
โซเดียมอริโซเบต	0.25

ที่มา : คัดแปลงจากประวัติ (2552)



ภาพที่ 3.2 : ขั้นตอนการผลิตไส้กรอกหมูรมควัน

ที่มา : ดัดแปลงจากปรวัด (2552) และ เขียวลักษณ์ (2551)

3.5.4.2 การวิเคราะห์ความสามารถในการลดปริมาณไนโตรที่ตกค้างของสารสกัดอบเชยใน ไส้กรอกหมูรมควันและการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ระหว่างการเก็บรักษา

นำไส้กรอกหมูรมควันที่เก็บเป็นเวลา 0, 1, 3 และ 5 วัน มาเตรียมตัวอย่างซึ่งดัดแปลงวิธีการเตรียมตัวอย่างจาก AOAC (2000) โดยนำไส้กรอกหมูรมควันมาบดละเอียดทั้งชิ้น(ห้ามตัดแต่หัวหรือท้ายของไส้กรอกมาวัดเพราะส่วนหัวและส่วนท้ายของไส้กรอกจะมีไนโตรตกค้างน้อยกว่าบริเวณกลางแท่งของไส้กรอกเสมอ) และชั่งน้ำหนัก 5 กรัม ใน flask 250 ml เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าหรือใช้แท่งแก้วให้เข้ากัน 30 วินาที แต่อย่าคนแรงมากระวังขึ้นไส้กรอกติดข้างภาชนะหรือแท่งแก้ว(ถ้าเนื้อไส้กรอกคนหรือเขย่าเบาๆแล้วไม่กระจายตัวและจำเป็นต้องเขย่าแรงๆควรเปลี่ยนจากการเติมน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร เป็นเดิมเพียง 50 มิลลิลิตรแล้วเขย่าแรงๆจนไส้กรอกกระจายตัวแล้วจึงใช้น้ำกลั่นอีก 50 มิลลิลิตร รินใส่ไส้กรอกที่ติดตามขอบภาชนะให้หล่นลงไปรวมจะได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เท่าเดิม) จากนั้นปิดภาชนะด้วยอะลูมิเนียมฟลอย นำมาแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 70 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง เขย่าเบาๆขวดเป็นระยะ เมื่อครบเวลาจึงนำมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 หากสารละลายที่ได้ยังมีความขุ่นอยู่ให้นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 8000 รอบ/นาที นาน 10 นาที จากนั้นค่อยๆเทส่วนใสออกมาใส่หลอดทดลอง(ไม่เอาส่วนตะกอนด้านล่าง) นำตัวอย่างในหลอดทดลองไปแช่ในตู้เย็นนาน 15-20 นาที จนไขมันลอยแข็ง จากนั้นใช้แท่งแก้วค่อยๆแหวกแผ่นฟิล์มไขมันมันที่ผิวหน้าออก แล้วคนตัวอย่างด้านล่างด้วยปลายปิเปตก่อนดูดตัวอย่างใสขึ้นมา 1 มิลลิลิตร (ถ้าเครื่อง centrifuge คุมอุณหภูมิได้ ให้เลือกที่ 4 °C พอเสร็จแล้วไม่ต้องไปแช่ตู้เย็น ดูส่วนใสไปวิเคราะห์ได้เลย) วิเคราะห์หาปริมาณไนโตรที่ตกค้าง

วิเคราะห์ความเป็นกรด-ด่างตามวิธีของ Bloukas และคณะ (2000) โดย นำไส้กรอกหมูรมควันมาบดละเอียดทั้งชิ้นและชั่งน้ำหนัก 5 กรัม เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน 30 วินาที วัดค่า pH และวิเคราะห์ความเป็นกรด-ด่าง ด้วยเครื่อง pH meter ขั้วอิเล็กโทรดแก้ว

3.5.5 การทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสของไส้กรอกหมูรมควันที่เติมสารสกัดอบเชย

ทำการเตรียมไส้กรอกหมูรมควันที่เติมสารสกัดอบเชยด้วยวิธีการในข้อ 3.5.4.1 ก่อนนำมาทดสอบความชอบ (affective test) ด้วยวิธีการหาอัตราความชอบ (hedonic scaling) โดยใช้สเกลความชอบ 1 ถึง 7 คะแนน (รายละเอียดดังภาคผนวก ข.) โดยใช้ผู้ชิมที่ไม่ผ่านการฝึก 30 คน ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ (randomized complete block design) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธีของดันแคน (Duncan's New Multiple Range Test)

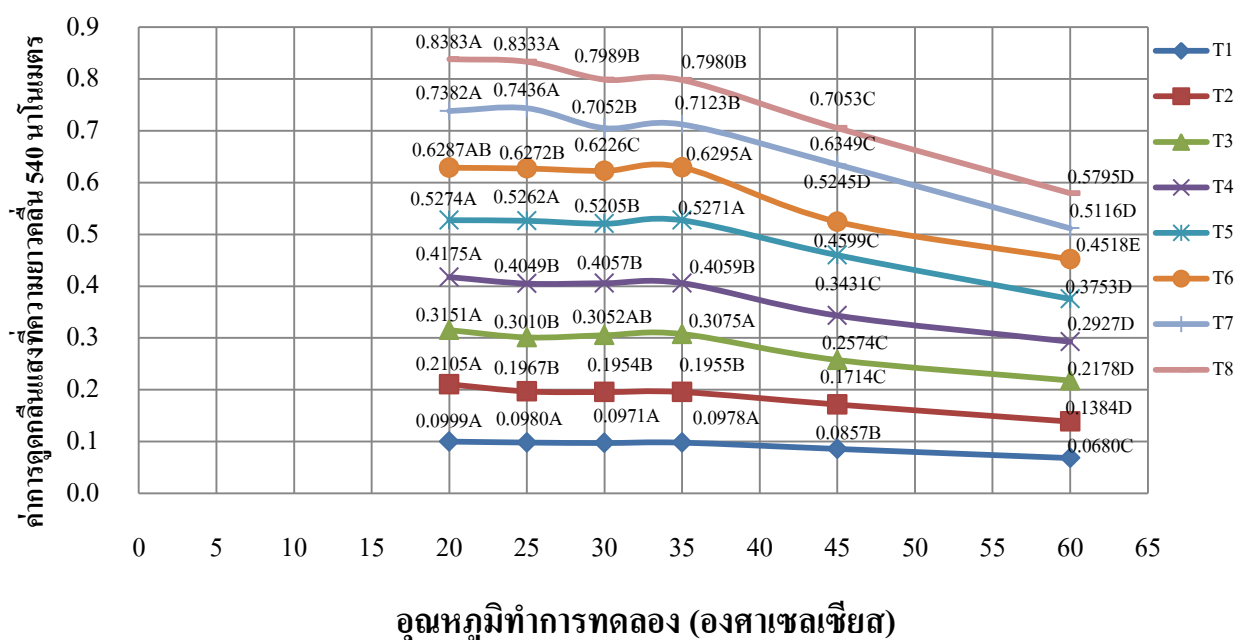
บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ผลการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณไนไตรท์ตกค้าง

4.1.1 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อการวิเคราะห์ปริมาณไนไตรท์ตกค้าง

จากการวิเคราะห์ผลของอุณหภูมิที่มีต่อการวิเคราะห์ปริมาณไนไตรท์ตกค้างในตัวอย่างสารละลายโซเดียมไนไตรท์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยวิธีทางแคลอริเมตริก (AOAC Official Method 973.31, Nitrites in cured meat, Colorimetric method 2000) โดยควบคุมอุณหภูมิที่ใช้ทำการทดลอง คือ 20, 25, 35, 45 และ 60 องศาเซลเซียส ได้ผลดังภาพที่ 4.1.1 ค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้มีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณไนไตรท์ตกค้าง



ภาพที่ 4.1.1 : ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายโซเดียมไนไตรท์ที่อุณหภูมิ 20, 25, 35, 45 และ 60 องศาเซลเซียส

^{ABCD} ตัวอักษรกำกับต่างกันในเส้นกราฟเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

T1 ถึง T8 หมายถึง ตัวอย่างสารละลายโซเดียมไนไตรท์ที่ความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4 และ 1.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

จากภาพที่ 4.1 เมื่อพิจารณาค่าการดูดกลืนแสงที่อุณหภูมิการทดลองต่าง ๆ กัน จะพบว่าส่วนใหญ่ค่าการดูดกลืนแสงค่อยๆ ลดลงเมื่ออุณหภูมิในการทำการทดลองสูงขึ้น และมีแนวโน้มลดลงอย่างรวดเร็วในตัวอย่างที่มีความเข้มข้นสูง คือ ตัวอย่างสารละลายโซเดียมไนไตรท์ที่มีความเข้มข้น 1.2, 1.4 และ 1.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร โดยพบว่าค่าการดูดกลืนแสงเริ่มลดลงที่อุณหภูมิทดลอง 35 องศาเซลเซียส ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับการทดลองของ Narayana และ Sunil (2009) พบว่าการทำปฏิกิริยาต่อ (coupling) ระหว่างไดอะโซเนียมไอออนกับเมทิลแอนธราโนเลท (methyl anthranilate) ได้เป็นสารประกอบให้สีนั้นจะเกิดสีได้ดีที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และความเข้มข้นจะลดลงในกรณีที่อุณหภูมิทำการทดลองสูงกว่า 35 องศาเซลเซียส ดังนั้นจึงเลือกอุณหภูมิที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณไนไตรท์ตกค้างเป็น 25 องศาเซลเซียส

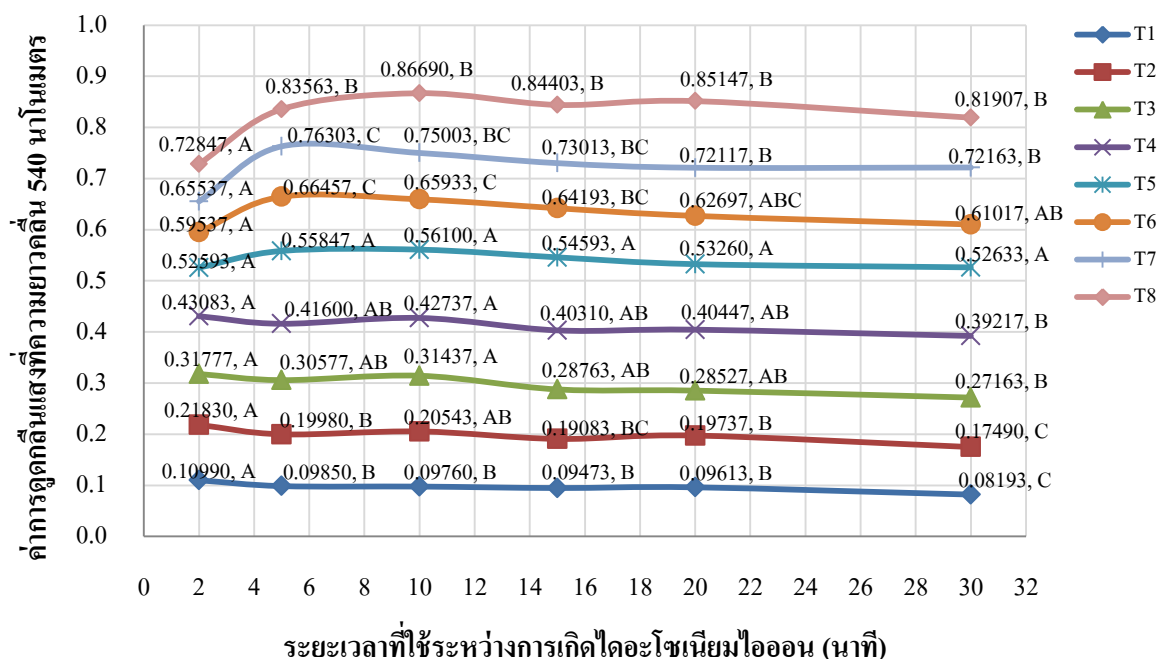
4.1.2 ผลของเวลาต่อการวิเคราะห์ปริมาณไนไตรท์ตกค้าง

1.) เมื่อทำการศึกษาระยะเวลาที่ใช้ระหว่างการเกิดไดอะโซเนียมไอออนที่ 2, 5, 10, 15, 20 และ 30 นาที โดยใช้อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิทำการทดลอง และใช้เวลาการเกิดปฏิกิริยาร่วมกัน (coupling) ระหว่างไดอะโซเนียมไอออนกับ NED (N-(1-naphthyl) ethylenediamine) ตามวิธีของ AOAC (2000) ได้ผลแสดงดังภาพที่ 4.2 ซึ่งพบว่า ระยะเวลา 2 นาทียังไม่เพียงพอให้ไดอะโซเนียมไอออนเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ ระยะเวลาที่ใช้ระหว่างการเกิดไดอะโซเนียมไอออนที่ 5, 10, 15 และ 20 นาที พบว่าค่าการดูดกลืนแสงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) มีเพียงตัวอย่าง T7 ที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 20 นาที แตกต่างจาก 5, 10 และ 15 นาที และเมื่อระยะเวลาที่ใช้ระหว่างการเกิดไดอะโซเนียมไอออนเพิ่มเป็น 30 นาที พบว่าเมื่อเปรียบเทียบกับที่ระยะ 5 นาที ส่วนใหญ่ค่าการดูดกลืนแสงลดลง โดยเฉพาะในกรณี T1, T2, T6 และ T7 มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สาเหตุอาจเกิดจากวงแหวนเอมีนถูกออกซิไดซ์เมื่อสัมผัสกับอากาศเป็นเวลานาน (Song และ Kaylor, 2007).

จากการที่ระยะเวลาที่ใช้รอให้เกิดไดอะโซเนียมไอออนที่ 5, 10, 15 และ 20 นาที แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ไม่แตกต่างกัน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกระยะเวลาที่ 5 นาที เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ขั้นต่อไป

2.) เมื่อทำการศึกษาระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยาระหว่างไดอะโซเนียมไอออนกับ NED (N-(1-naphthyl) ethylenediamine) ที่ 5, 15, 30, 45 และ 60 นาที โดยใช้อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสและระยะเวลาที่ใช้ระหว่างการเกิดไดอะโซเนียมไอออน 5 นาที ได้ผลดังภาพที่ 4.3 พบว่าเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้นจาก 5 นาที ไปเป็น 15, 30, 35, 45 และ 60 นาที ส่วนใหญ่ค่าการดูดกลืนแสงมีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ยกเว้นเมื่อเปรียบเทียบกับที่ระยะเวลา 5 นาที กับที่ระยะเวลา 30, 35, 45 และ 60 นาที ของ T6 และ T7 และที่ความเข้มข้นต่ำ T1 และ T2 พบว่ามีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) แสดงว่า ระยะเวลา 5

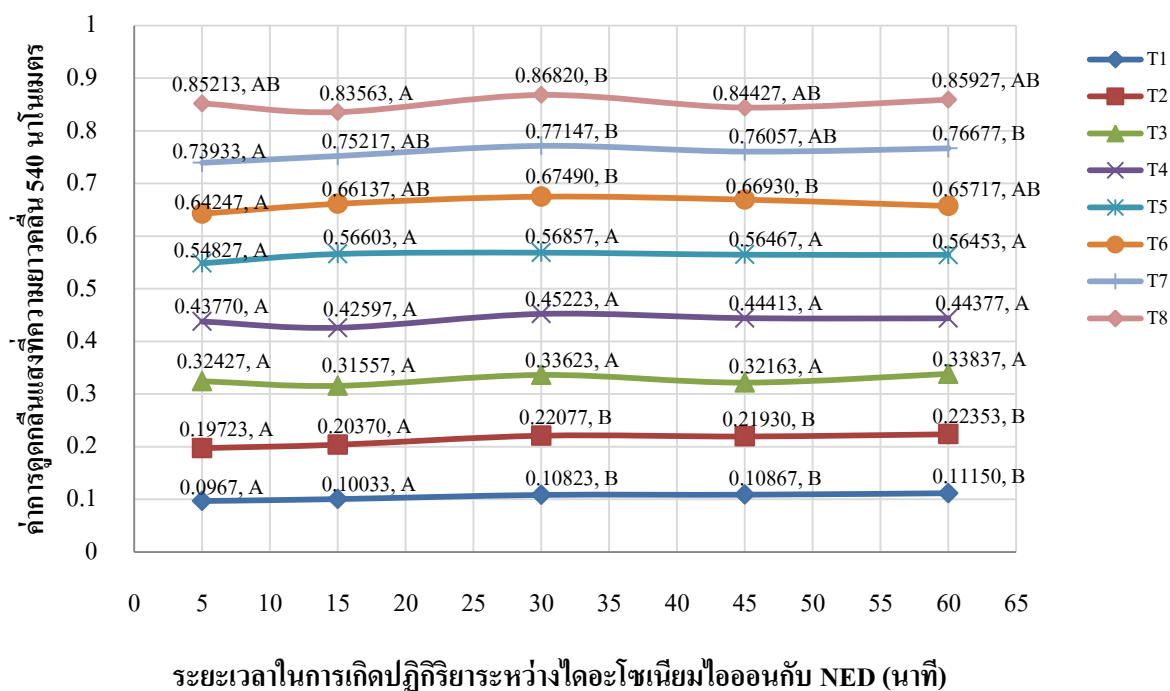
นาที่ อาจไม่เพียงพอให้ปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์ และจากภาพดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าค่าการดูดกลืนแสงเริ่มมีความเสถียรที่ระยะเวลาการเกิดปฏิกิริยาระหว่างไดอะโซเนียมไอออนกับ NED 30-35 นาที และเมื่อเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงของระยะเวลาการเกิดปฏิกิริยาระหว่างไดอะโซเนียมไอออนกับ NED ที่ 30 และ 35 นาที พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($p \leq 0.05$) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกสภาวะเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาระหว่างไดอะโซเนียมไอออนกับ NED เป็น 30 นาที



ภาพที่ 4.1.2 : ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายโซเดียมไนไตรท์ที่ระยะเวลาที่ใช้ระหว่างการเกิดไดอะโซเนียมไอออน 2, 5, 10, 15, 20 และ 30 นาที

ABCD ตัวอักษรกำกับต่างกันในเส้นกราฟเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

T1 ถึง T8 หมายถึง ตัวอย่างสารละลายโซเดียมไนไตรท์ที่ความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4 และ 1.6 โมลกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ



ภาพที่ 4.1.3 : ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายไคโชนิยมไอออนในไตรท์ที่ระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยา

ระหว่างไคโชนิยมไอออนกับ NED 5, 15, 30, 45 และ 60 นาที่

T1 ถึง T8 หมายถึง ตัวอย่างสารละลายไคโชนิยมไอออนในไตรท์ที่ความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4 และ 1.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

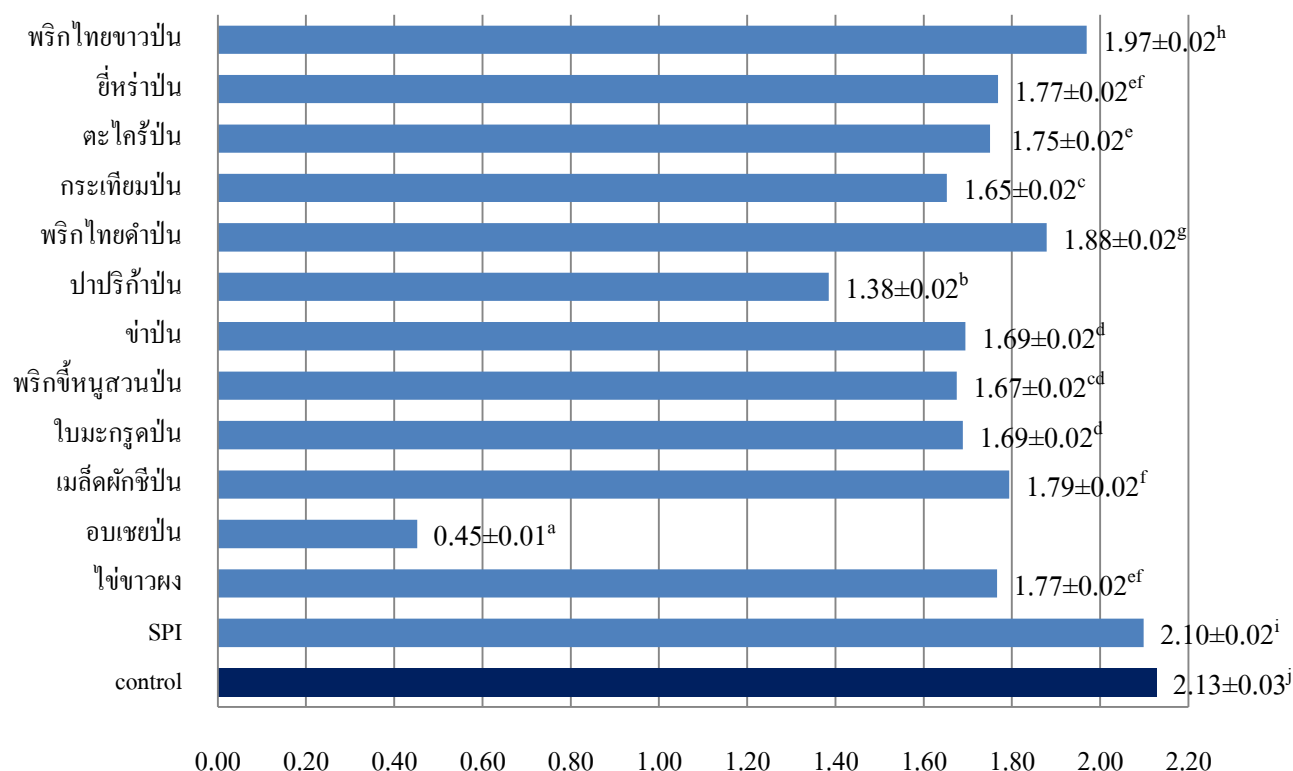
4.2 ผลการศึกษาความสามารถด้านการลดปริมาณไนโตรเจนตกค้างของพืชสมุนไพรและส่วนผสมอื่นที่นิยมใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป

ผลการศึกษาความสามารถด้านการลดปริมาณไนโตรเจนตกค้างของเมล็ดผักชีป่น อบเชยป่น ปาปรีก้าป่น พริกชี้หนูสวนป่น พริกไทยดำป่น พริกไทยขาวป่น กระเทียมป่น ยี่หร่าป่น ตะไคร้ป่น ข่าป่น ใบมะกรูดป่น โปสเตอร์สกัดจากถั่วเหลือง และไข่ขาวผง ทำในสถานะในหลอดทดลอง โดยการเติมพืชสมุนไพรหรือส่วนผสมดังกล่าว ในหลอดทดลองที่มีปริมาณไคโชนิยมไอออนในไตรท์ 2 มิลลิกรัม (control) ก่อนนำไปวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนตกค้างที่เหลือตามสถานะที่คัดเลือกได้จากข้อ 4.1 ได้ผลดังตารางที่ 4.1 และภาพที่ 4.4 พบว่าอบเชยป่นมีความสามารถในการลดปริมาณไนโตรเจนตกค้างได้ดีที่สุด โดยอบเชยป่นปริมาณ 1.5 และ 2 กรัมมีความสามารถในการลดปริมาณไนโตรเจนตกค้างได้ถึง 98.92 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมที่ไม่ได้เติมอบเชยป่น ดังนั้นจึงคัดเลือกอบเชยไปทำการสกัดและศึกษาสมบัติด้านต่างๆ ในการศึกษาต่อไป

ตารางที่ 4.2 : ปริมาณไนโตรเจนที่ตกค้างที่เหลือหลังผ่านการเติมตัวอย่างพืชสมุนไพรและส่วนผสมอื่นที่นิยมใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป

ตัวอย่าง	ปริมาณตัวอย่างที่ทำการทดลอง (กรัม)												
	0.03	0.05	0.07	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.5	0.7	1	1.5	2
พริกไทยขาวป่น	1.82±0.02 ^c	1.85±0.01 ^f	1.70±0.02 ^{de}	1.70±0.02 ^h	1.70±0.01 ^h	1.92±0.02 ^g	1.92±0.01 ⁱ	1.97±0.02 ^h	1.97±0.02 ^h	1.98±0.01 ^h	1.73±0.01 ^j	1.62±0.01 ^j	1.60±0.01 ^k
ชีหว่าป่น	1.84±0.04 ^c	1.82±0.05 ^{def}	1.73±0.02 ^{fg}	1.64±0.01 ^e	1.64±0.01 ^e	1.85±0.03 ^f	1.82±0.01 ^f	1.80±0.02 ^f	1.77±0.02 ^{ef}	1.77±0.02 ^f	1.51±0.02 ^g	1.38±0.01 ^h	1.20±0.01 ^h
ตะไคร้ป่น	1.81±0.02 ^{bc}	1.80±0.02 ^{cd}	1.71±0.01 ^{ef}	1.60±0.01 ^c	1.59±0.01 ^d	1.75±0.02 ^d	1.75±0.01 ^{de}	1.76±0.01 ^e	1.75±0.02 ^e	1.75±0.02 ^f	1.52±0.02 ^g	1.38±0.01 ^h	1.20±0.01 ^h
กระเทียมป่น	1.78±0.02 ^b	1.76±0.01 ^b	1.64±0.01 ^c	1.65±0.01 ^{ef}	1.65±0.01 ^e	1.76±0.03 ^{de}	1.75±0.01 ^{de}	1.67±0.02 ^c	1.65±0.02 ^c	1.63±0.02 ^c	1.28±0.01 ^d	0.93±0.01 ^c	0.78±0.01 ^d
พริกไทยดำป่น	1.81±0.06 ^{bc}	1.77±0.03 ^{bc}	1.79±0.02 ⁱ	1.70±0.01 ^h	1.66±0.01 ^f	1.87±0.02 ^f	1.88±0.02 ^g	1.87±0.02 ^g	1.88±0.02 ^g	1.88±0.02 ^g	1.59±0.03 ⁱ	1.57±0.01 ⁱ	1.54±0.01 ^j
ปาปริก้าป่น	1.78±0.05 ^b	1.81±0.04 ^{de}	1.57±0.01 ^b	1.50±0.01 ^b	1.49±0.01 ^b	1.63±0.02 ^b	1.37±0.01 ^b	1.40±0.02 ^b	1.38±0.02 ^b	1.37±0.02 ^b	1.02±0.02 ^b	0.54±0.01 ^b	0.53±0.01 ^b
ข่าป่น	1.77±0.01 ^b	1.76±0.00 ^b	1.76±0.02 ^h	1.67±0.01 ^g	1.66±0.01 ^f	1.70±0.02 ^c	1.72±0.01 ^c	1.71±0.02 ^d	1.69±0.02 ^d	1.68±0.02 ^e	1.31±0.02 ^e	1.12±0.02 ^f	0.84±0.02 ^e
พริกขี้หนูสวนป่น	1.82±0.03 ^{bc}	1.82±0.04 ^{def}	1.71±0.02 ^{ef}	1.69±0.01 ^h	1.68±0.01 ^g	1.84±0.02 ^f	1.82±0.01 ^f	1.69±0.02 ^{cd}	1.67±0.02 ^{cd}	1.66±0.02 ^d	1.43±0.02 ^f	0.96±0.01 ^d	0.60±0.02 ^c
ใบมะกรูดป่น	1.84±0.03 ^c	1.85±0.01 ^{def}	1.75±0.01 ^{gh}	1.62±0.01 ^d	1.56±0.01 ^c	1.79±0.01 ^e	1.74±0.02 ^d	1.69±0.02 ^{cd}	1.69±0.02 ^d	1.68±0.02 ^e	1.44±0.02 ^f	1.23±0.01 ^g	1.14±0.02 ^g
เม็ดผักชีป่น	1.84±0.02 ^c	1.84±0.02 ^{ef}	1.83±0.02 ^j	1.80±0.01 ⁱ	1.80±0.01 ⁱ	2.04±0.02 ^h	1.90±0.01 ^h	1.86±0.02 ^g	1.79±0.02 ^f	1.77±0.02 ^f	1.55±0.01 ^h	1.56±0.02 ⁱ	1.47±0.02 ⁱ
อบเชยป่น	1.46±0.03 ^a	1.38±0.01 ^a	0.95±0.01 ^a	0.67±0.01 ^a	0.62±0.00 ^a	0.65±0.01 ^a	0.62±0.01 ^a	0.47±0.01 ^a	0.45±0.01 ^a	0.44±0.01 ^a	0.26±0.01 ^a	0.02±0.01 ^a	0.02±0.01 ^a
ไข่ขาวผง	1.84±0.03 ^c	1.83±0.03 ^{def}	1.69±0.01 ^d	1.66±0.01 ^{fg}	1.67±0.00 ^g	1.84±0.02 ^f	1.77±0.01 ^e	1.77±0.02 ^e	1.77±0.02 ^{ef}	1.76±0.01 ^f	1.12±0.01 ^c	0.98±0.01 ^e	1.12±0.01 ^f
โปรตีนถั่วเหลือง	1.84±0.03 ^c	1.84±0.02 ^{ef}	1.82±0.01 ^j	1.80±0.01 ⁱ	1.87±0.01 ^j	2.14±0.02 ⁱ	2.13±0.01 ^j	2.09±0.02 ⁱ	2.10±0.02 ⁱ	2.10±0.02 ⁱ	1.96±0.02 ^l	-	-
control	1.84±0.02 ^c	1.83±0.02 ^{def}	1.87±0.01 ^k	1.87±0.01 ^j	1.87±0.02 ^j	2.11±0.02 ⁱ	2.12±0.02 ^j	2.12±0.01 ⁱ	2.13±0.03 ^j	2.14±0.01 ^j	1.86±0.01 ^k	1.86±0.02 ^k	1.86±0.01 ^l

^{a-l} อักษรกำกับแตกต่างกันในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)



ปริมาณไนโตรเจนในไถ่ที่ตกค้างที่เหลือ (มิลลิกรัม)

ภาพที่ 4.4 : ความสามารถในการลดปริมาณไนโตรเจนที่ตกค้างของพืชสมุนไพรและส่วนผสมอื่นที่นิยม

ใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปปริมาณ 0.5 กรัม

^{a-j} อักษรกำกับแตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

4.3 ผลการศึกษาสมบัติของสารสกัดอบเชย

4.3.1 ลักษณะทางกายภาพของสารสกัดอบเชย

เมื่อทำการสกัดสารสกัดอบเชยโดยนำผงเปลือกอบเชยแช่ตัวทำละลายในอัตราส่วนอบเชยต่อตัวทำละลายเท่ากับ 1 ต่อ 10 ในขวดรูปชมพู่ เขย่าที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นนำไปทำเป็นสารสกัดในรูปแบบต่างๆ โดยการสกัดแต่ละครั้งมีปริมาณสารสกัดที่ได้เฉลี่ยแสดงดังตารางที่ 4.3.1

1) สารสกัด ก ใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย สารละลายขึ้นหืนสีน้ำตาล

2) สารสกัด ข ได้จากการนำสารสกัด ก ไปอบแห้งด้วยเตาอบร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง แล้วบดละเอียดเป็นผงสีน้ำตาล

3) สารสกัด ค ได้จากการนำสารสกัด ก ไปอบแห้งด้วยเตาอบร้อนที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง แล้วบดละเอียดเป็นผงสีน้ำตาล

4) สารสกัด ง ใช้เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวทำละลาย จากนั้นนำไปอบแห้งด้วยเตาอบร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมงแล้วบดละเอียดเป็นผงสีน้ำตาลแดง

ตารางที่ 4.3.1 : ปริมาณสารสกัดที่ได้โดยเฉลี่ยในแต่ละครั้ง

อบเชยป่น : ตัวทำละลาย เท่ากับ 60 : 600 (g:ml)	ชนิดตัวทำละลาย	
	น้ำ	ethanol 95 %
ปริมาณเริ่มต้นตอนแช่ (ml)	600.00	600.00
น้ำหนักหลังหมุนเหวี่ยง(สกัดด้วยน้ำ) หรือกรอง(สกัดด้วย ethanol 95 %) (g)	297.94	571.72
ปริมาณสารละลายที่เสียไป	302.06	28.28
น้ำหนักหลังทำให้เข้มข้น (g)	62.35	27.11
%total solid	5.20	40.23
สารสกัดเหลว(ทำให้เข้มข้นอย่างเดียว) (g)	62.35	27.11
สารสกัดผง (หลังอบ 90 °C 5 ชั่วโมง) (g)	3.22	10.91
สารสกัดผง (หลังอบ 130 °C 5 ชั่วโมง)(g)	3.26	-

4.3.2 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมด (Total polyphenol contents)

จากการนำสารสกัดอบเชยไปวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดพบว่าสารสกัดอบเชย (*Cinnanomum burmanii* Blume) มีปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดแสดงดังตารางที่ 4.3.2 โดยกรณีที่เป็นสารสกัดด้วยน้ำและไม่ผ่านการอบมีปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมด 13.912 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่ออบเชยป่น 1 กรัม ซึ่งน้อยกว่าปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดของสารสกัดอบเชยสายพันธุ์ *Cinnanomum Zeylanicum* ที่มี 87.6 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่ออบเชยป่น 1 กรัม (Areewan และคณะ, 2011) ส่วนสารสกัดอบเชยที่มี ethanol 95 % เป็นตัวทำละลายมีปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมด 362.57 ± 26.38 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อสารสกัดเริ่มต้น 1 กรัม หรือเท่ากับ 90.64 ± 6.59 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่ออบเชยป่น 1 กรัม ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลในอบเชยสายพันธุ์อื่นๆดังนี้ Mathew และ Abraham (2006) ได้ศึกษาสมบัติของสารสกัดจากเปลือกอบเชย (*Cinnanomum verum*) พบว่าสารสกัดจากเปลือกอบเชยที่ใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย มีปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอล

นอลทั้งหมดเท่ากับ 289.0 ± 2.2 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อสารสกัดเริ่มต้น 1 กรัม Ho และคณะ (2008) พบว่าสารสกัดจากเปลือกอบเชย (*Cinnamomum cassia* Presl) มีปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดเท่ากับ 269 ± 3 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อสารสกัดเริ่มต้น 1 กรัม นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดกับสารสกัดจากพืชสมุนไพรชนิดอื่น พบว่าสารสกัดอบเชย (*Cinnamomum burmanii* Blume) มีปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมด มากกว่า โรสแมรี่ (rosemary) ยี่ห่วยฝรั่ง (fennel) จันทน์เทศ (nutmeg) ออริกาโน (oregano) (Kong และคณะ , 2010) องุ่นที่นิยมใช้ทำไวน์ในประเทศบราซิล 4 สายพันธุ์ Cabernet Sauvignon, Merlot, Bordeaux และ Isabel (Rockenbach และคณะ, 2011)

ตารางที่ 4.3.2 : ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดและรูปแบบ

รูปแบบสารสกัด	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อตัวอย่างป่น 1 กรัม)
สารสกัด ก	13.912 ± 0.10
สารสกัด ข	17.418 ± 0.03
สารสกัด ค	15.145 ± 0.07
สารสกัดเหลว (ethanol 95 %)	90.64 ± 6.59
สารสกัด ง	50.860 ± 0.10

หมายเหตุ สารสกัด ก คือสารสกัดอบเชยที่ใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย
 สารสกัด ข คือสารสกัด ก ที่อบแห้งที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง
 สารสกัด ค คือสารสกัด ก ที่อบแห้งที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง
 สารสกัด ง คือสารสกัดอบเชยที่ใช้เอทานอล 95 % เป็นตัวทำละลาย และอบแห้งที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง

4.5.3 การวิเคราะห์ความสามารถด้านการเป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดอบเชยรูปแบบต่างๆ

4.3.3.1 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระ DPPH

การวิเคราะห์ความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดอบเชย โดยดัดแปลงจากวิธีของ Murakami และคณะ (2004) พบว่าสารสกัดอบเชยที่ใช้ตัวทำละลายต่างชนิดกัน และความเข้มข้นต่างกัน มีความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระ DPPH แตกต่างกัน ดังในตารางที่ 4.3.3.1 โดยสารสกัดอบเชยมี % DPPH Scavenging แปรผันตรงกับ ความเข้มข้นของสารสกัด และสารพฤษเคมีที่ได้จากการใช้ตัวทำละลายต่างชนิดกันจะมีความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระ DPPH ที่ต่างกัน โดยพบว่า สารสกัดอบเชยรูปแบบ ข และ ง ซึ่งผ่าน

กระบวนการสกัดแบบเดียวกัน แต่สารสกัดอบเชยรูปแบบ ข ที่ใช้น้ำเป็นตัวทำละลายนั้นมีความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระ DPPH ต่ำกว่าสารสกัดอบเชยรูปแบบ ง ที่ใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อสารสกัดอบเชยโดนความร้อนในการทำให้เป็นผง ยังส่งผลทำให้ความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระ DPPH ลดลง

ตารางที่ 4.3.3.1 : ความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดอบเชยรูปแบบต่างๆ

สารสกัดอบเชย	% สารสกัด	% DPPH Scavenging	ความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระ DPPH (มิลลิกรัมสมมูล โทรอกซ์ต่อ 1 กรัมตัวอย่างป่น) (โดยคำนวณจากการใช้ความเข้มข้น 0.0001 %)
สารสกัด ก	0.0001	2.92	9.002±0.31 ^B
	0.0002	12.66	
	0.0003	23.27	
	0.0004	34.48	
	0.0005	43.85	
สารสกัด ข	0.0001	1.089	0.3333±0.01 ^C
	0.0002	1.856	
	0.0003	2.538	
	0.0004	3.252	
	0.0005	3.889	
สารสกัด ค	0.0001	0.428	0.1327±0.03 ^D
	0.0002	0.604	
	0.0003	0.663	
	0.0004	0.813	
	0.0005	1.111	
สารสกัด ง	0.0001	0.98	10.150±1.57 ^A
	0.0002	7.07	
	0.0003	11.07	
	0.0004	15.54	
	0.0005	21.75	

หมายเหตุ สารสกัด ก คือสารสกัดอบเชยที่ใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย
 สารสกัด ข คือสารสกัด ก ที่อบแห้งที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง
 สารสกัด ค คือสารสกัด ก ที่อบแห้งที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง
 สารสกัด ง คือสารสกัดอบเชยที่ใช้เอทานอล 95 % เป็นตัวทำละลาย และอบแห้งที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง

4.3.3.2 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริก

การวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารสกัดอบเชย โดยใช้วิธีที่ดัดแปลงจากการทดลองของ Benzie และ Strain (1999) ได้ผลดังตารางที่ 4.3.3.2 โดยพบว่า สารสกัดอบเชยมีความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกแปรผันตามความเข้มข้น แต่เมื่อนำมาคำนวณความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริก (มิลลิกรัมสมมูล ไทรอลอกซ์ต่อกรัมตัวอย่างผงสด) เพื่อหาความเข้มข้นของสารสกัดที่มีประสิทธิภาพในการรีดิวซ์เฟอร์ริกที่ดีที่สุดพบว่า กรณีสารสกัด ก ที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ มีประสิทธิภาพในการรีดิวซ์เฟอร์ริกดีที่สุด โดยมีความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริก 45.15 ± 2.93 มิลลิกรัมสมมูล ไทรอลอกซ์ต่อกรัมตัวอย่างผงสด กรณีสารสกัด ข ที่ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/ml}$ มีประสิทธิภาพในการรีดิวซ์เฟอร์ริกดีที่สุด โดยมีความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริก 37.77 ± 0.61 มิลลิกรัมสมมูล ไทรอลอกซ์ต่อกรัมตัวอย่างผงสด กรณีสารสกัด ค ที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ มีประสิทธิภาพในการรีดิวซ์เฟอร์ริกดีที่สุด โดยมีความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริก 24.49 ± 2.41 มิลลิกรัมสมมูล ไทรอลอกซ์ต่อกรัมตัวอย่างผงสด และกรณีสารสกัด ง ที่ความเข้มข้น 400 $\mu\text{g/ml}$ มีประสิทธิภาพในการรีดิวซ์เฟอร์ริกดีที่สุด โดยมีความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริก 50.36 ± 0.22 มิลลิกรัมสมมูล ไทรอลอกซ์ต่อกรัมตัวอย่างผงสด

ตารางที่ 4.3.3.2 : ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารสกัดอบเชยรูปแบบต่างๆ

สารสกัด อบเชย	ความเข้มข้นของ สารสกัด ($\mu\text{g/ml}$)	ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริก (ไมโครกรัมสมมูลไทรอลอกซ์)	ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริก (มิลลิกรัมสมมูล ไทรอลอกซ์ต่อกรัมตัวอย่างผงสด)
สารสกัด ก	400	25.09 ± 1.09^p	33.90 ± 1.48^c
	300	18.67 ± 0.88^n	33.63 ± 1.58^c
	200	13.80 ± 0.58^l	37.28 ± 1.56^f
	100	8.36 ± 0.54^h	45.15 ± 2.93^g
	50	3.60 ± 0.03^d	38.92 ± 0.36^f
สารสกัด ข	400	23.65 ± 0.40^o	31.76 ± 0.54^c
	300	16.29 ± 0.46^m	29.17 ± 0.82^d

	200	12.63 ± 0.09^k	33.92 ± 0.25^c
	100	6.94 ± 0.14^f	37.27 ± 0.78^f
	50	3.52 ± 0.06^d	37.77 ± 0.61^f
สารสกัด ก	400	13.39 ± 0.27^l	18.21 ± 0.36^a
	300	10.12 ± 0.09^i	18.35 ± 0.15^a
	200	8.15 ± 0.70^{gh}	22.17 ± 1.90^b
	100	4.50 ± 0.44^c	24.49 ± 2.41^c
	50	1.85 ± 0.01^b	20.16 ± 0.16^{ab}
สารสกัด ง	400	11.08 ± 0.05^j	50.36 ± 0.22^h
	300	7.45 ± 0.05^{fg}	45.15 ± 0.32^g
	200	5.08 ± 0.15^c	46.18 ± 1.40^g
	100	2.68 ± 0.06^c	48.79 ± 1.13^h
	50	1.06 ± 0.03^a	38.41 ± 1.15^f

หมายเหตุ สารสกัด ก คือสารสกัดอบเชยที่ใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย
 สารสกัด ข คือสารสกัด ก ที่อบแห้งที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง
 สารสกัด ค คือสารสกัด ก ที่อบแห้งที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง
 สารสกัด ง คือสารสกัดอบเชยที่ใช้เอทานอล 95 % เป็นตัวทำละลาย และอบแห้งที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง

4.3.3.3 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการทำลายไนตริกออกไซด์ (nitric oxide scavenging)

ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการทำลายไนตริกออกไซด์ของสารสกัดอบเชย ปริมาณ 50, 100, 200, 300 และ 400 ไมโครกรัม เปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม (control) ได้ผลดังตารางที่ 4.3.4 ซึ่งพบว่าสารสกัดอบเชยมีความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระไนตริกออกไซด์ โดยค่า เปอร์เซ็นต์ความสามารถในการทำลายไนตริกออกไซด์ จะสูงขึ้นตามปริมาณของสารสกัดอบเชยที่เติมลงไป ซึ่งพบว่าสกัดอบเชยที่สกัดด้วยน้ำทั้งที่ไม่ผ่านการอบ (สารสกัด ก) และผ่านการอบที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง แล้วบดละเอียดเป็นผง (สารสกัด ข) ที่ความเข้มข้น 400 มีความสามารถในการทำลายไนตริกออกไซด์สูงที่สุดไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ 63.31 และ 63.02 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการทำลายไนตริกออกไซด์ระหว่างสกัดอบเชยดังกล่าวกับสารสกัดของต้นโบริจ (*Coleus aromaticus*) (Kumaran และ Joelkarunakaran, 2006) พบว่าสารสกัดอบเชยทั้งรูปแบบ ก และ ข ที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการทำลายไนตริก

กออกไซด์ใกล้เคียงกับสารสกัดของต้นโบริจ ซึ่งสารสกัดของต้นโบริจความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร มีเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการทำลายไนตริกออกไซด์ เท่ากับ 55.6 เปอร์เซ็นต์ แต่ยังมีเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการทำลายไนตริกออกไซด์น้อยกว่าสารสกัดอบเชยที่สกัดด้วยเอทานอลที่ไม่ผ่านการอบ เมื่อเทียบที่ความเข้มข้นเท่ากัน.

ตารางที่ 4.3.4 ความสามารถในการทำลายไนตริกออกไซด์ของสารสกัดอบเชยที่ระดับต่างๆ

ตัวอย่าง	ความเข้มข้น (µg/ml)	% nitric oxide scavenging
Control	-	0 ^a
สารสกัด ก	50	22.74 ^d
	100	42.43 ^g
	200	55.36 ⁱ
	300	60.05 ^j
	400	63.31 ^k
สารสกัด ข	50	23.08 ^d
	100	42.60 ^g
	200	56.42 ⁱ
	300	59.74 ^j
	400	63.02 ^k
สารสกัด ค	50	13.16 ^{cd}
	100	26.77 ^c
	200	42.85 ^g
	300	54.29 ^{hi}
	400	56.82 ⁱ
สารสกัด ง	50	11.56 ^b
	100	15.13 ^c
	200	31.20 ^f
	300	42.64 ^g
	400	51.88 ^h

หมายเหตุ ^{abcde} อักษรกำกับแตกต่างกันในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

สารสกัด ก คือสารสกัดอบเชยที่ใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย

สารสกัด ข คือสารสกัด ก ที่อบแห้งที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง

สารสกัด ค คือสารสกัด ก ที่อบแห้งที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง

สารสกัด ง คือสารสกัดอบเชยที่ใช้เอทานอล 95 % เป็นตัวทำละลาย และอบแห้งที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง

4.3.4 การวิเคราะห์ความสามารถในการลดปริมาณไนไตรท์ตกค้างของสารสกัดอบเชย

เมื่อนำสารสกัดอบเชยมาวิเคราะห์ความสามารถในการลดปริมาณไนไตรท์ตกค้างในหลอดทดลองโดยเติมสารสกัดอบเชยที่ความเข้มข้นระดับต่างๆคือ 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ได้ผลดังตารางที่ 4.3.3 พบว่าสารสกัดอบเชยมีความสามารถในการลดปริมาณไนไตรท์ตกค้างและความสามารถในการลดปริมาณไนไตรท์ตกค้างนั้นจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัดอบเชยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยพบว่าสารสกัดอบเชยที่สกัดด้วยน้ำและไม่ผ่านการอบ(สารสกัด ก) ที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ มีความสามารถในการลดไนไตรท์(nitrite scavenging) ได้ดีที่สุด คือ 71.25 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม (control) ที่ไม่มีการเติมสารสกัด โดยเหลือไนไตรท์เพียง 499.29 μg

ตารางที่ 4.3.3 ความสามารถในการลดปริมาณไนไตรท์ตกค้างของสารสกัดอบเชยที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น (%)	ปริมาณไนไตรท์ที่เหลือ (μg)				% ความสามารถในการลดไนไตรท์			
	สารสกัด ก	สารสกัด ข	สารสกัด ค	สารสกัด ง	สารสกัด ก	สารสกัด ข	สารสกัด ค	สารสกัด ง
0.1	1238.59 $\pm$ 5.37 ^h	1397.93 $\pm$ 5.13 ^k	1620.50 $\pm$ 5.11 ^p	1653.55 $\pm$ 2.57 ^q	28.69 ^L	19.51 ^H	6.70 ^C	4.79 ^B
0.2	994.57 $\pm$ 4.86 ^c	1260.06 $\pm$ 3.87 ⁱ	1540.45 $\pm$ 4.80 ⁿ	1556.41 $\pm$ 8.13 ^o	42.74 ^O	27.45 ^K	11.31 ^E	10.39 ^D
0.3	812.93 $\pm$ 3.58 ^c	1054.6 $\pm$ 10.67 ^f	1389.64 $\pm$ 8.15 ^k	1491.75 $\pm$ 2.89 ^m	53.19 ^Q	39.28 ^N	19.99 ^I	14.11 ^F
0.4	619.45 $\pm$ 3.49 ^b	959.57 $\pm$ 7.60 ^d	1361.43 $\pm$ 4.60 ^j	1436.75 $\pm$ 3.62 ^l	64.33 ^R	44.75 ^P	21.61 ^J	17.28 ^G
0.5	499.29 $\pm$ 3.31 ^a	816.07 $\pm$ 1.91 ^c	1245.31 $\pm$ 3.89 ^h	1204.19 $\pm$ 1.86 ^g	71.25 ^S	53.01 ^Q	28.30 ^L	30.67 ^M
Control	1736.80 $\pm$ 2.03 ^r				0 ^A			

หมายเหตุ ^{a-r} อักษรกำกับแตกต่างกันในคอลัมน์ปริมาณไนไตรท์ที่เหลือแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

^{A-S} อักษรกำกับแตกต่างกันในคอลัมน์% ความสามารถในการลดไนไตรท์ แสดงถึงความแตกต่างกัน

อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

สารสกัด ก คือสารสกัดอบเชยที่ใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย

สารสกัด ข คือสารสกัด ก ที่อบแห้งที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง

สารสกัด ค คือสารสกัด ก ที่อบแห้งที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง

สารสกัด ง คือสารสกัดอบเชยที่ใช้เอทานอล 95 % เป็นตัวทำละลาย และอบแห้งที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง

เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการลดปริมาณไนไตรท์ตกค้างของสารสกัดอบเชยในตารางที่ 4.3.3 กับสารสกัดชนิดอื่นพบว่า สารสกัดอบเชยที่ผ่านการสกัดรูปแบบ ก ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ มีความสามารถในการทำลายไนไตรท์ สูงกว่าสารสกัดเปลือกส้มที่ใช้เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวทำละลาย โดยสารสกัดเปลือกส้ม 1 มิลลิลิตร มีความสามารถในการทำลายไนไตรท์ 60 % (Kang และคณะ, 2006) นอกจากนี้ Choi และคณะ (2009) พบว่า BHT 1 มิลลิลิตร หรือ สารสกัด *Achyranthis radix* 1 มิลลิลิตร มีความสามารถในการทำลายไนไตรท์ ใกล้เคียงกันคือประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์

4.4 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการลดปริมาณไนไตรท์ตกค้างของสารสกัดอบเชยในไส้กรอกหมูรมควัน

4.4.1 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการลดปริมาณไนไตรท์ตกค้างของสารสกัดอบเชยในไส้กรอกหมูรมควัน และการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ระหว่างการเก็บรักษา

จากการเติมสารสกัดอบเชยปริมาณ 0.1, 0.3, และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ลงในไส้กรอกหมูรมควัน (มีโซเดียมไนไตรท์ อยู่ 20 ppm) เพื่อวิเคราะห์ความสามารถในการลดปริมาณไนไตรท์ตกค้างได้ผลดังตารางที่ 4.4.1 พบว่าไส้กรอกหมูรมควันที่เติมสารสกัดอบเชยจะมีปริมาณไนไตรท์ตกค้างน้อยกว่าไส้กรอกหมูรมควันที่ไม่เติมสารสกัด (control) และในระหว่างการเก็บรักษาพบว่าปริมาณไนไตรท์ตกค้างในไส้กรอกหมูรมควันจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกๆความเข้มข้น อย่างไรก็ตามค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ไม่มีการเปลี่ยนแปลงดังแสดงในตารางที่ 4.4.2 แสดงให้เห็นว่าสารสกัดอบเชยที่เติมไม่ทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างเปลี่ยนแปลง และเมื่อระยะเวลาการเก็บเพิ่มขึ้นเป็น 5 วัน ค่าความเป็นกรด-ด่างไม่เปลี่ยนแปลงอาจเกิดจากการอบและการต้มไส้กรอกที่ 75 องศาเซลเซียส นานรวม 1 ชั่วโมง รวมทั้งการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ช่วยชะลอหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มที่สร้างกรดแลกติก ทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างไม่เปลี่ยนแปลงในช่วงเวลาเก็บรักษาเป็นเวลา 5 วัน

ตารางที่ 4.4.1 ปริมาณไนโตรเจนที่ตกค้าง (ppm) ของไส้กรอกหมูรมควันที่เติมสารสกัดอบเชยที่ระดับต่างๆ ในระหว่างการเก็บรักษา

ความ เข้มข้น (เปอร์เซ็นต์)	ระยะเวลาเก็บรักษา (วัน)							
	0		1		3		5	
	สารสกัด ก	สารสกัด ง	สารสกัด ก	สารสกัด ง	สารสกัด ก	สารสกัด ง	สารสกัด ก	สารสกัด ง
0 (control)	170.21±1.18 ^{F,d}	170.21±1.45 ^{F,d}	165.04±1.35 ^{G,c}	165.04±1.10 ^{G,c}	147.87±1.48 ^{G,b}	147.87±1.48 ^{G,b}	126.19±1.51 ^{E,a}	126.52±1.28 ^{E,a}
0.1	150.67±1.05 ^{C,e}	166.95±1.42 ^{E,g}	146.10±1.19 ^{D,d}	161.88±1.08 ^{F,f}	130.90±1.31 ^{D,c}	145.03±1.45 ^{F,d}	111.71±1.34 ^{C,a}	124.10±1.25 ^{E,b}
0.3	134.01±0.88 ^{B,e}	160.60±1.37 ^{D,h}	129.94±1.00 ^{B,d}	155.72±1.04 ^{E,g}	116.42±1.14 ^{B,b}	139.52±1.40 ^{E,f}	99.36±1.15 ^{B,a}	119.38±1.21 ^{D,c}
0.5	120.26±2.18 ^{A,e}	147.79±2.11 ^{C,h}	116.61±2.65 ^{A,d}	143.30±1.71 ^{C,g}	104.47±1.95 ^{A,b}	128.38±1.09 ^{C,f}	89.16±1.58 ^{A,a}	109.86±1.65 ^{C,c}

ABCD อักษรกำกับแตกต่างกันในแนวดิ่งแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

abcdef อักษรกำกับแตกต่างกันในแนวนอนแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

สารสกัด ก คือสารสกัดอบเชยที่ใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย

สารสกัด ง คือสารสกัดอบเชยที่ใช้เอทานอล 95 % เป็นตัวทำละลาย และอบแห้งที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง

ตารางที่ 4.4.2 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ระหว่างการเก็บรักษาของไส้กรอกหมูรมควันที่เติมสารสกัด
อบเชยที่ระดับต่างๆ

ความ เข้มข้น (เปอร์เซ็นต์)	ระยะเวลาในการเก็บรักษา (วัน) ^{ns}							
	0		1		3		5	
	สารสกัด ก	สารสกัด ง	สารสกัด ก	สารสกัด ง	สารสกัด ก	สารสกัด ง	สารสกัด ก	สารสกัด ง
0 (control)	6.19	6.19	6.20	6.20	6.16	6.19	6.20	6.19
0.1	6.20	6.20	6.18	6.19	6.17	6.17	6.17	6.17
0.3	6.20	6.18	6.18	6.18	6.19	6.16	6.19	6.16
0.5	6.19	6.20	6.20	6.20	6.20	6.20	6.19	6.19

^{ns} อักษรกำกับแสดงถึงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

ตารางที่ 4.4.3 เปอร์เซ็นต์ความสามารถในการลดปริมาณไนโตรัสตกค้างของสารสกัดอบเชยระดับต่างๆในตัวอย่าง
สารละลายโซเดียมไนไตรท์(หลอดทดลอง)และในตัวอย่างไส้กรอกหมูรมควันเมื่อผ่านไป 24 ชั่วโมง

ความ เข้มข้น (เปอร์เซ็นต์)	เวลาที่ศึกษา (24 ชั่วโมง) ^{ns}			
	ในหลอดทดลอง		ในตัวอย่างไส้กรอกหมูรมควัน	
	สารสกัด ก	สารสกัด ง	สารสกัด ก	สารสกัด ง
0 (control)	0.00	0.00	0.00	0.00
0.1	28.69	4.79	11.48	1.92
0.3	53.19	14.11	21.26	5.64
0.5	71.25	30.67	29.34	13.17

สารสกัด ก คือสารสกัดอบเชยที่ใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย

สารสกัด ง คือสารสกัดอบเชยที่ใช้เอทานอล 95 % เป็นตัวทำละลาย และอบแห้งที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส
นาน 5 ชั่วโมง

เมื่อเปรียบเทียบ เปอร์เซ็นต์ความสามารถในการทำลายไนโตรัส ของสารสกัดอบเชยกรณีวิเคราะห์ในหลอด
ทดลอง (ตารางที่ 4.3.3) กับกรณีวิเคราะห์ในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมูรมควัน (ตารางที่ 4.4.3) พบว่า เปอร์เซ็นต์
ความสามารถในการทำลายไนโตรัส ของสารสกัดอบเชยกรณีวิเคราะห์ในหลอดทดลองมีค่าสูงกว่ากรณีวิเคราะห์ใน
ไส้กรอกหมูรมควันมาก อาจเนื่องมาจากในตัวอย่างไส้กรอกหมูรมควันมีสารประกอบอื่น เช่น โปรตีน ไขมัน เกลือ

ฯลฯ ที่อาจขัดขวางการเข้าทำปฏิกิริยาระหว่างสารสกัดและไนไตรท์ หรือสภาวะในการผลิตไส้กรอก เช่น การตีบ้น การใช้ความร้อน อาจทำให้โครงสร้างของสารสกัดออบเชยเปลี่ยนแปลงไป เป็นผลให้ความสามารถในการทำลายไนไตรท์ ลดลง Pedraza-Chaverri และคณะ (2007) ได้ศึกษาผลของความร้อนที่มีต่อความสามารถในการทำลายเปอร์ออกซิไนไตรท์ของสารสกัดกระเทียมพบว่า ความร้อนส่งผลต่อสมบัติด้านต่างๆของสารสกัดกระเทียมและลดความสามารถในการทำลายเปอร์ออกซิไนไตรท์ของสารสกัดกระเทียม นอกจากนี้สมบัติการละลายก็มีผลต่อการทำหน้าที่ของสารสกัด เช่น งานวิจัยของ Lara และคณะ (2011) พบว่า สารสกัดโรสแมรี่ และ BHT มีสมบัติการเป็นแอนติออกซิแดนท์ในแพตตีหมู่มากกว่าสารสกัดสะระแหน่ (lemon balm) เนื่องจากสารสกัดสะระแหน่นั้นสามารถละลายได้ดีในน้ำ แต่สารสกัดโรสแมรี่และ BHT สามารถละลายได้ในไขมันหรือน้ำมันในแพตตีหมู

4.5 ผลการทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสของไส้กรอกหมูรมควันที่เติมสารสกัดออบเชย

ผลการทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสไส้กรอกหมูรมควันที่เติมสารสกัด ก (สารสกัดออบเชยที่ใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย) และไส้กรอกหมูรมควันที่เติมสารสกัด ง (สารสกัดออบเชยที่ใช้เอทานอล 95 % เป็นตัวทำละลาย และอบแห้งที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง) ด้วยวิธีหาอัตราความชอบ (7 point-hedonic scaleing) โดยใช้ผู้ทดสอบที่ไม่ฝึกฝน 90 คน ได้ผลดังตารางที่ 4.5.1 และ 4.5.2 ตามลำดับโดยไส้กรอกหมูรมควันที่เติมสารสกัด ก ได้คะแนนด้านสีสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเติมสารสกัด ก 0.1 และ 0.3% (ไส้กรอกสีเข้มสวขึ้น) คะแนนด้านกลิ่นนั้นพบว่าสารสกัด ก 0.1 และ 0.3% ทำให้กลิ่นไส้กรอกหอมขึ้นและคาวน้อยกว่า control แต่ถ้าเติมถึง 0.5% จะมีกลิ่นออบเชยแรงเกินไป คะแนนด้านรสชาติและเนื้อสัมผัสพบว่าสารสกัด ก ไม่ส่งผลต่อรสชาติและเนื้อสัมผัส ด้านคะแนนความชอบรวมพบว่าไส้กรอกที่เติมสารสกัด ก 0.1 และ 0.3% มีความชอบรวมไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากไส้กรอก control ส่วนไส้กรอกหมูรมควันที่เติมสารสกัด ง มีคะแนนด้านสี กลิ่น รสชาติ เนื้อสัมผัสและความชอบรวมที่ต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัด

ตารางที่ 4.5.1 คะแนนความชอบของผู้ทดสอบต่อไส้กรอกหมูรมควันที่เติมสารสกัด ก ที่ระดับต่างๆ

ความเข้มข้น %	สี	กลิ่น	รสชาติ	เนื้อสัมผัส	ความชอบรวม
0(control)	4.60±1.35 ^a	4.98±1.02 ^a	5.00±1.37	5.06±1.25	5.16±1.10 ^b
0.1	5.18±1.12 ^b	5.08±1.10 ^b	5.00±0.95	5.12±1.11	5.27±0.87 ^b
0.3	5.32±0.96 ^b	5.06±1.17 ^b	4.84±1.16	5.06±1.03	5.14±1.05 ^b
0.5	4.71±1.10 ^a	4.53±1.33 ^a	4.92±1.02	5.06±1.06	4.77±1.17 ^a

^{abcd} อักษรกำกับแตกต่างกันในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

^{ns} อักษรกำกับแสดงถึงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

สารสกัด ก คือสารสกัดอบเชยที่ใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย

ตารางที่ 4.5.2 คะแนนความชอบของผู้ทดสอบต่อไส้กรอกหมูรมควันที่เติมสารสกัด ง ที่ระดับต่างๆ

ความเข้มข้น %	สี	กลิ่น	รสชาติ	เนื้อสัมผัส	ความชอบรวม
0(control)	4.94±1.26 ^{bc}	5.33±1.02 ^d	4.59±1.33 ^c	4.99±1.14 ^b	5.09±0.92 ^d
0.1	5.00±1.02 ^c	4.59±1.30 ^c	4.31±1.21 ^c	4.76±1.14 ^{ab}	4.66±1.24 ^c
0.3	4.58±1.44 ^{ab}	4.19±1.36 ^b	3.59±1.62 ^b	4.58±1.43 ^a	4.03±1.55 ^b
0.5	4.27±1.36 ^a	3.64±1.26 ^a	3.02±1.80 ^a	4.49±1.42 ^a	3.30±1.51 ^a

^{abcd} อักษรกำกับแตกต่างกันในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

สารสกัด ง คือสารสกัดอบเชยที่ใช้เอทานอล 95 % เป็นตัวทำละลาย และอบแห้งที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1. อุณหภูมิที่ทำการทดลองมีผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณไนไตรท์ตกค้าง โดยค่าการดูดกลืนแสงจะค่อยๆ ลดลงเมื่ออุณหภูมิในการทำการทดลองสูงขึ้น และลดลงอย่างรวดเร็วในตัวอย่างที่มีความเข้มข้นสูง ดังนั้นจึงควรควบคุมอุณหภูมิที่ใช้ทำการทดลองให้เท่ากันในทุกๆ การทดลองที่ต้องการใช้ผลมาเปรียบเทียบกัน

2. ระยะเวลาที่ใช้รอการเกิดโคะโซเนียมไอออนที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงเสถียรที่สุดและเหมาะสมในการทำการทดลองวิเคราะห์ปริมาณไนไตรท์ตกค้างที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส คือ 5 นาที และระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยาระหว่างโคะโซเนียมไอออนกับ NED (N-(1-naphthyl) ethylenediamine) ที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่สูงและเสถียรในการวิเคราะห์ปริมาณไนไตรท์ตกค้าง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส คือ 30 นาที

3. ออบเชยแป้นมีความสามารถในการลดปริมาณไนไตรท์ตกค้างในสภาวะในหลอดทดลองได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับเม็ดผักชีแป้น ออบเชยแป้น ปาปริก้าแป้น พริกชี้หูสวนแป้น พริกไทยดำแป้น พริกไทยขาวแป้น กระเทียมแป้น ยี่ห่วยแป้น ตะไคร้แป้น ข่าแป้น ใบมะกรูดแป้น โปรีดินสกัดจากถั่วเหลือง และไข่ขาวผง

4. สารสกัดออบเชยที่ใช้ ethanol 95 % ในการสกัดจะได้ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดมากกว่าสารสกัดออบเชยที่ใช้น้ำในการสกัด แต่กลุ่มสารประกอบโพลีฟีนอลที่ได้จากการสกัดด้วย ethanol 95 % จะไวต่อการถูกทำลายด้วยความร้อนมากกว่ากลุ่มสารประกอบโพลีฟีนอลที่ได้จากการสกัดออบเชยด้วยน้ำ

5. สารสกัดออบเชยที่ใช้เอทานอล 95 % เป็นตัวทำลาย และอบแห้งที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมงมีความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระ DPPH ดีที่สุด รองลงมาคือ สารสกัดออบเชยที่ใช้น้ำเป็นตัวทำลาย

6. สารสกัดออบเชยมีความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกโดยจะมีความสามารถในการรีดิวซ์ได้ดีขึ้นเมื่อความเข้มข้นสูงขึ้น

7. สารสกัดออบเชยมีความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระไนตริกออกไซด์และความสามารถจะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นสูงขึ้น โดยสกัดออบเชยที่สกัดด้วยน้ำมีความสามารถในการทำลายได้ดีกว่าสารสกัดออบเชยที่สกัดด้วยเอทานอล 95%

8. สารสกัดออบเชยมีความสามารถในการลดปริมาณไนไตรท์ตกค้างในหลอดทดลองและความสามารถในการลดปริมาณไนไตรท์ตกค้างนั้นจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้น และสารสกัดออบเชยที่สกัดด้วยน้ำจะมีความสามารถดีกว่าสาร

สัปดาห์ที่สกัดด้วยเอทานอล 95% ที่วิธีการสกัดแบบเดียวกัน โดยอุณหภูมิในการสกัดที่สูงขึ้นจะทำให้ประสิทธิภาพของสารสกัดลดลง

9. สารสกัดอบเชยที่เติมในไส้กรอกหมูรมควันไม่ทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างเปลี่ยนแปลง และสารสกัดอบเชยมีความสามารถในการลดไนโตรที่ตกค้างในไส้กรอกหมูรมควันได้แต่ประสิทธิภาพจะไม่ดีเท่ากับในหลอดทดลอง

10. สารสกัดอบเชยที่ใช้น้ำเป็นตัวทำละลายทำให้ไส้กรอกหมูรมควันสีเข้มเล็กน้อยซึ่งสวยงามขึ้น ช่วยดับกลิ่นคาวได้แต่ถ้าใช้มากเกินไปจะฉุนและไม่ส่งผลกระทบต่อรสชาติและเนื้อสัมผัส ส่วนสารสกัดอบเชยที่ใช้เอทานอลในการสกัดแล้วอบแห้งเมื่อเติมในไส้กรอกจะทำให้สีไม่สวยเพราะเห็นเป็นจุดดำๆกระจายอยู่เนื่องจากผงสารสกัดไม่สามารถละลายได้ในเบสที่เป็นน้ำ และทำให้รสชาติแย่งเมื่อเคี้ยวไปโดนเกล็ดผงสารสกัด

บรรณานุกรม

- ประพันธ์ ปันศิริโรคม และ วันทนี ช้างน้อย. 2545. การเปรียบเทียบปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดและศักยภาพการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดจากเมล็ดพืชตระกูลส้มสายพันธุ์ต่างๆที่ปลูกในประเทศไทย. *อาหาร*. 32(4) : 300-307.
- ประสงค์ คุณานุวัฒน์ชัยเดช. 2549. สารก่อมะเร็งในโตรซามีน. จดหมายข่าว ชีวเคมี หน่วยวารสารวิชาการ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. หน้า 4.
- ปรวิธ นาคแสง. 2552. การใช้ถั่วแดงหลวงทดแทนเนื้อหมูในไส้กรอกเวียนนา วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ
- พิชไนไตรท์กับไนเตรท. เข้าถึงได้จาก <http://www.nfi.or.th/publication/thairath/thairath47.html> เข้าถึงเมื่อวันที่ 14 ตุลาคม 2553
- เขวาลักษณ์ สุรพันธ์พิชัย. 2551. บทปฏิบัติการวิชาเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์. คณะอุตสาหกรรมเกษตร, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ.
- วรลักษณ์ ปัญญาธิพงศ์. 2545. การศึกษากระบวนการผลิตผงเต้าหู้และการใช้ประโยชน์ของผงเต้าหู้ในลูกชิ้นหมู วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ
- ศิวพร ศิวเวช. 2546. วัตถุดิบอาหาร เล่ม 1. นครปฐม : ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน. หน้า 47, 306, 365.
- สุนิษา ปันสุข. 2552. ผลการดัดแปรด้วยกระบวนการทางเอนไซม์และเคมีต่อสมบัติเชิงหน้าที่ของไข่ขาวผง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ
- สุภาวดี ทรัพย์ศิริไพบูลย์. 2550. ความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ดัดแปรด้วยวิธีทางเอนไซม์และวิธีทางเคมี. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ
- สันติสุข โสภณศิริ. 2549. ยาคูบเซย ภูมิปัญญาไทยเพื่อสุขภาพอันยั่งยืน. กรุงเทพฯ: วิ.พันธ์สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. 2547
- กฎระเบียบของสหภาพยุโรปเกี่ยวกับวัตถุดิบอาหาร. ภาคผนวกที่ 15

- AOAC. 2000 Association of Official Analytical Chemists Official Method. Nitrites in cured meat 973.31
- Benzie, I. and Strain, J. 1999. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. **Methods Enzymol.** 299 : 15-27.
- Cheeptham, N. and Towers, G.H.N. 2002. Light-mediated activities of some Thai medicinal plant teas. **Fitoterapia.** 73 : 651-662.
- Choi, H.S., Lee, M.J., Na, M.S., Lee, M.Y. and Choi, D. 2009. Antioxidant properties of *Achyranthis radix* extract in rats. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry.** 15 : 275-280.
- Choi, S.Y., Chung, M.J., Lee, S.J., Shin, J.H. and Sung, N.J. 2007. N-nitrosamine inhibition by strawberry, garlic, kale, and the effects of nitrite-scavenging and N-nitrosamine formation by functional compounds in strawberry and garlic. **Food Control.** 18 : 485-491.
- Chung, M.J., Lee, S.H. and Sung, N.J. 2002. Inhibitory effect of whole strawberries, garlic juice or kale juice on endogenous formation of N-nitrosodimethylamine in humans. **Cancer Letters.** 182 : 1-10
- Cowan, M.M. 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Reviews.** 12(4) : 564-582
- Demeyer, D., Honikel, K. and DeSmet, S. 2008. The World Cancer Research Fund report 2007 : A challenge for the meat processing industry. **Meat Science.** 80 : 953-959.
- Flower, D.W. 2002. **Food chemical safty.** In : Watson, D.H., editor. Abington : Woodhead Publishing. Abington. p. 34-35.
- Govindarajan, R., Rastogi, S., Vijayakumar, M., Shirwaikar, A., Rawat, A.K.S., Mehrotra, S. and Pushpangadan, P. 2003. Studies on the antioxidant activities of *Desmodium angeticum*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin.** 26(10) : 1424-1427.
- Hazra, B., Biswa, S. and Mandal, N. 2008. Antioxidant and free radical scavenging activity of *Spondias pinnata*. **BioMed Central Complementary and Alternative Medicine.** 8 : 63.
- Hazra, B., Sarkar, R., Biswas, S. and Mandal, N. 2010. Comparative study of the antioxidant and reactive oxygen species scavenging properties in the extracts of the fruits of *Terminalia chebula*,

Terminalia belerica and *Emblica officinalis*. **BioMed Central Complementary and Alternative Medicine**. 10 : 20.

- Ho, S.C., Tsai, T.H., Tsai, P.J. and Lin, C.C. 2008. Protective capacities of certain spices against peroxynitrite-mediated biomolecular damage. **Food and Chemical Toxicology**. 46: 920–928
- Jayaprakasha, G.K., Singh, R.P. and Sakariah, K.K. 2001. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation model in vitro. **Food Chemistry**. 73 : 285-290.
- Kang, H.J., Chawla, S.P., Jo, C., Kwon, J.H. and Byun, M.W. 2006. Studies on the development of functional powder from citrus peel. **Bioresource Technology**. 97 : 614–620 Research
- Koca, I. and Karadeniz, B. 2009. Antioxidant properties of blackberry and blueberry fruits grown in the Black Sea Region of Turkey. **Scientia Horticulturae**. 121 : 447-450.
- Kong, B., Zhang, H. and Xiong, L.Y. 2010. Antioxidant activity of spice extracts in a liposome system and in cooked pork patties and the possible mode of action. **Meat Science**. 85 : 772–778
- Kumaran, A. and Joelkarunakaran, R. 2006. Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of *Coleus Aromaticus*. **Food Chemistry**. 97 : 109-114.
- Lara, M.S., Gutierrez, J.I., Timón, M. and Andrés, A.I. 2011. Evaluation of two natural extracts (*Rosmarinus officinalis* L. and *Melissa officinalis* L.) as antioxidants in cooked pork patties packed in MAP. **Meat Science**. 88 : 481–488
- Loeppky, R.N. 1994. **Nitrosamine and N-Nitroso compound chemistry and biochemistry**.
In : Loeppky, R.N. and Michejda, C. J., editors. Washington, D.C. : American Chemical Society. p. 2, 126, 130, 148, 287.
- Lo'pez-Malo, A., Barreto-Valdivieso, J., Palou, E. and Martí'n , F.S. 2007. *Aspergillus flavus* growth response to cinnamon extract and sodium benzoate mixtures. **Food Control**. 18 : 1358-362.
- Lu, M.J. and Chen, C. 2007. Enzymatic tannase treatment of green tea increases in vitro inhibitory activity against N-nitrosation of dimethylamine. **Process Biochemistry**. 42 : 1285-1290.
- Madhavi, D.L., Salunkhe, D.K., Sofos, J.N., and Raharjo, S. 1995. **Food additives Toxicology** :Antioxidant Curing Agent. In: Maga, J.A. and Tu, A.T., editors. New York : Marcel Dekker
- Markiewicz, G.D., Dejaegher, B., Meya, E.D., Impens, S., Kowalska, T., Paelinck, H. and Heyden, Y.V. 2010. Evaluation of the influence of proline, hydroxyproline or pyrrolidine in the presence of sodium nitrite on N-nitrosamine formation when heating cured meat. **Analytica Chimica**

Acta. 657 : 123-130.

Mathew S and Abraham TE. 2006. Studies on the antioxidant activities of cinnamon (*Cinnamomum verum*) bark extracts, through various in vitro models. **Food Chemistry** 94 : 520-528.

Murakami, M., Yamaguchi, T., Takamura, H. and Matoba, T. 2004. Effects of thermal treatment on radical-scavenging activity of single and mixed polyphenolic compounds. **Journal of Food Science.** 69(1) : FCT7-FCT10.

Narayana B. and Sunil K. 2009. A spectrophotometric method for the determination of nitrite and nitrate. **Eurasian Journal of Analytical Chemistry.** 4(2):204-214.

Pedraza-Chaverri, J., Medina-Campos, O.M. and Segoviano-Murillo, S. 2007. Effect of heating on peroxynitrite scavenging capacity of garlic. **Food and Chemical Toxicology.** 45 : 622–627

Pokpong, A., Srisa-Ard, K., Phongsakad, P., and Khuwijitjaru, P. 2011. Total Phenolic Content and Radical Scavenging Activity of Extracts from Cinnamon (*Cinnamomum Zeylanicum*) Bark Obtained by Ultrasound Assisted Aqueous Extraction. The 12th ASEAN FOOD CONFERENCE 2011, 260.

Richard A. Scanlan, Nitrosamines and Cancer. เข้าถึงได้จาก <http://lpi.oregonstate.edu/f-w00/nitrosamine.html> เข้าถึงเมื่อวันที่ 14 เมษายน 2554

Rockenbach, I.I., Gonzaga, V.L., Caliari, V., Genovese, I.M., Gonçalves, A.E. de S.S. and Fett, R. 2011. Phenolic compounds content and antioxidant activity in pomace from selected red grapes (*Vitis vinifera* L. and *Vitis labrusca* L.) widely produced in Brazil. **Food Chemistry.** 127 : 174–179

Romans, J.R. 1994. **The meat we eat.** Illinois : interstate publishers 730-734, 741-761, 766-768

Song, X. and Kaylor, R.M.M., inventors; Kimberly-Clark Worldwide, Inc, assignee. Nitrite detection Technique. **United States patent US 0048182 A1.** 1 March 2007 .

Tabak, M., Armon, R. and Neeman, I. 1999. Cinnamon extracts inhibitory effect on *Helicobacter pylori*. **Journal of Ethnopharmacology.** 67 : 269–277.

Veena, K. and Narayana, B. 2009. Spectrophotometric determination of nitrite using new coupling agents. **Journal of Chemical Technology.** 16 : 89-92.

Vidua-Martos, M., Ferná'ndez-L'opez, J., Sayas-Barbera, E., Sendra, E., Navarro, C. and Pe'rez-A'lvarez, J.A. 2009. Citrus co-products as technological strategy to reduce residual nitrite content in meat products. **Journal of Food Science.** 74 : 93-100.

Wang, Z.H., Hsu, C.C. and Yin, M.C. 2009. Antioxidative characteristics of aqueous and ethanol

extracts of glossy privet fruit. **Food Chemistry**. 112 : 914-918.

Zia-ur-Rehman. 2006. Citrus peel extract—A natural source of antioxidant. **Food Chemistry**.

99 : 450-454.

ภาคผนวก ก.

การวิเคราะห์ทางเคมี

1. การวิเคราะห์ปริมาณไนไตรท์ตกค้าง

1.1 การเตรียมสารทดสอบและสารละลายมาตรฐาน

- NED Reagent

ละลาย N-(1-naphthyl) ethylenediamine 0.2 กรัม ในกรดอะซิติกความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 150 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชา

- Sulfanilamide Reagent

ละลาย salicylic acid 0.5 กรัม ในกรดอะซิติกความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 150 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชา

1.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานโซเดียมไนไตรท์

- Stock solution (สารละลายโซเดียมไนไตรท์ 1,000 ppm หรือ 1,000 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร)

ละลาย NaNO_2 1.0 กรัม ด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นเป็น 1 ลิตร

- Intermediat solution (สารละลายโซเดียมไนไตรท์ 100 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร)

ปิเปต Stock solution จำนวน 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นเป็น 1 ลิตร

- Working solution (สารละลายโซเดียมไนไตรท์ 2 ppm หรือ 2 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร)

ปิเปต intermediat solution มา 20 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นเป็น 1 ลิตร

1.3 การเตรียมกราฟมาตรฐาน

1. ปิเปต working solution มา 0, 1, 2, 3, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง

2. เติม sulfanilamide reagent หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที

3. เติม NED reagent หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

1.4 การคำนวณและแปลผล

การแปลผลนั้นจะนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการวิเคราะห์ปริมาณไนไตรท์ตกค้างของตัวอย่างมาคำนวณกับสมการกราฟมาตรฐานได้เป็นค่าปริมาณไนไตรท์ตกค้าง นอกจากนี้ยังสามารถนำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณเป็นความสามารถในการทำลายไนไตรท์ ของสารสกัดโดย เปอร์เซ็นต์ความสามารถในการทำลายไนไตรท์ (nitrite scavenging) เท่ากับ

$$(A_{540 \text{ nm of control}} - A_{540 \text{ nm of sample}}) \times 100 / A_{540 \text{ nm of control}}$$

2. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมด (Total polyphenol content)

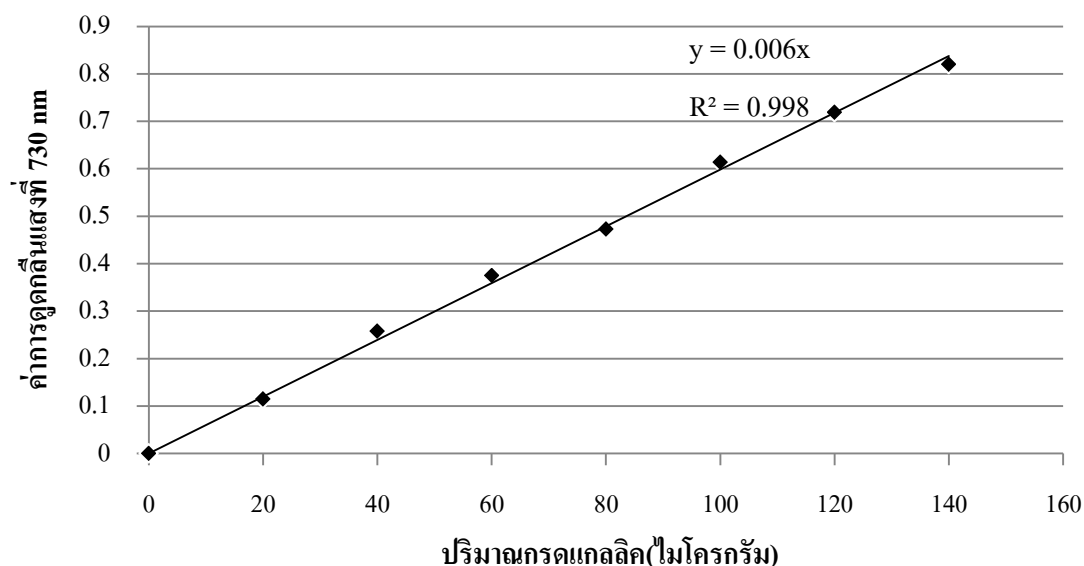
การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมด จะใช้วิธีที่รายงานโดยประพันธ์และวันทนี (2545) โดยมีหลักการคือ สารประกอบโพลีฟีนอลจะทำปฏิกิริยากับ Folin-Ciocalteu reagent เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงิน ซึ่งสามารถติดตามโดยการตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร และใช้กรดแกลลิกเป็นสารประกอบโพลีฟีนอลมาตรฐาน

2.1 สารเคมี

1. Folin-Ciocalteu
2. โซเดียมคาร์บอเนต (NaCO_3) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์
3. สารละลายกรดแกลลิกความเข้มข้น 400 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร

2.2. การเตรียมกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกความเข้มข้นเริ่มต้น 400 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร
2. ปิเปตสารละลายมาตรฐานดังกล่าวใส่หลอดทดลองหลอดละ 0, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30, 0.35 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ปริมาตรรวมในแต่ละหลอดเป็น 10 มิลลิลิตร
3. เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที
4. เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน วางตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที
5. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร โดยใช้ น้ำกลั่นเป็น blank
6. เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณกรดแกลลิกในหน่วยไมโครกรัม



2.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดในตัวอย่างสารสกัด

1. ปิเปตตัวอย่างสารสกัดอบเชย (CEE) 0.5 มิลลิลิตร เจือจางและปรับปริมาตรด้วยเอทานอล95 เปอร์เซ็นต์ ปิเปตสารสกัดที่เจือจางใส่ในหลอดทดลอง 0.5 มิลลิลิตรและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ปริมาตรรวมในแต่ละหลอดเป็น 10 มิลลิลิตร
2. เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน วางตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที
3. เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน วางตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที
4. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร โดยใช้ น้ำกลั่นเป็นblank
5. คำนวณปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดในตัวอย่างสารสกัด

3. การวิเคราะห์ความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระ DPPH

ความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระ DPPH จะใช้วิธี DPPH method ซึ่งดัดแปลงจากรายงานของ Murakami และคณะ (2004) หลักการคือ สารละลายอนุมูลอิสระ DPPH จะมีสีม่วงแดง ซึ่งดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ในกรณีที่ตัวอย่างสารสกัดมีความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดี จะทำให้สีม่วงแดงของสารละลายอนุมูลอิสระ DPPH จางลงมากกว่าตัวอย่างสารสกัดที่มีความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระ DPPH ต่ำ

3.1 สารเคมี

1. สารละลายอนุมูลอิสระ DPPH ความเข้มข้น 0.8 มิลลิโมลาร์ เตรียมโดยชั่ง DPPH 0.0158 กรัม ละลายในเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ปรับปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิลิตร
2. เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์
3. โทรลอกซ์

3.2 วิธีวิเคราะห์

3.2.1 การเตรียมกราฟมาตรฐานโทรลอกซ์

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานสารละลายอนุมูลอิสระ DPPH ความเข้มข้น 0.8 มิลลิโมลาร์ เตรียมโดยชั่ง DPPH 0.0158 กรัม ละลายในเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ปรับปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิลิตร
2. เตรียมสารละลายมาตรฐานสารละลายโทรลอกซ์ที่ความเข้มข้นรวมในหลอดทดลองเป็น 5, 10, 15, 20, 25, 30 และ 35 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยเตรียมสารละลายโทรลอกซ์ที่ความเข้มข้น 250 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ชั่งโทรลอกซ์ 0.025 กรัม ปรับปริมาตรด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ให้มีปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตมา 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1, 0.12 และ 0.14 มิลลิลิตร ตามลำดับแล้วปรับปริมาตรด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ให้ปริมาตรรวมแต่ละหลอดเป็น 5.4 มิลลิลิตร
3. เติมสารละลาย DPPH 0.6 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที ในที่มืด
4. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยใช้เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ เป็น blank
5. คำนวณเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระ DPPH

$$= (A_{517 \text{ nm of control}} - A_{517 \text{ nm of sample}}) \times 100 / A_{517 \text{ nm of control}}$$

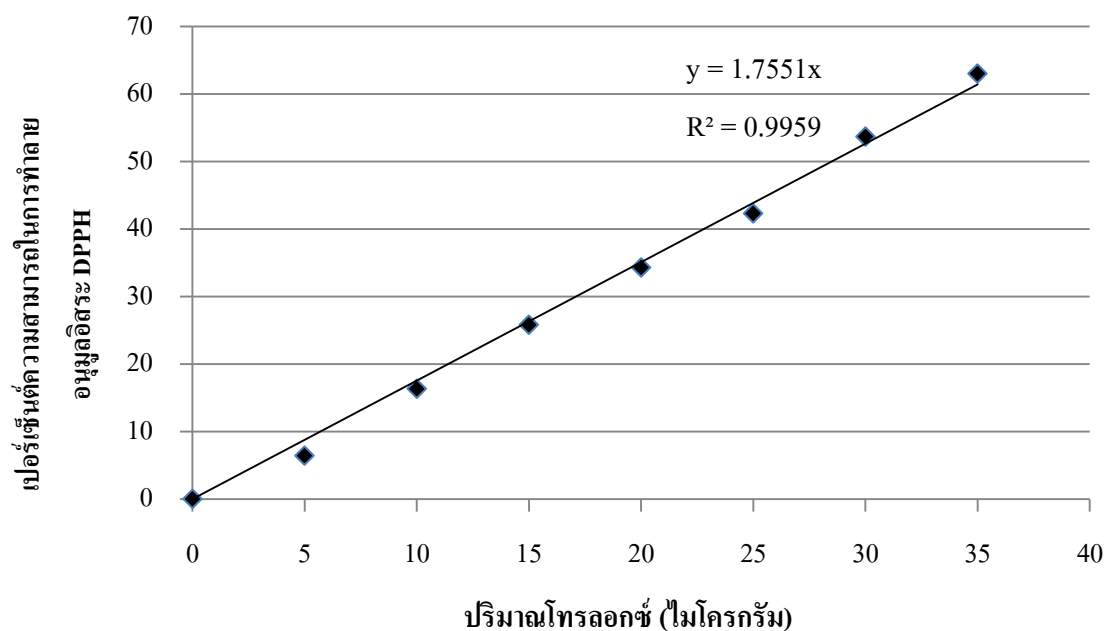
โดยที่ $A_{517 \text{ nm of control}}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาควบคุม

(ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายอนุมูลอิสระ DPPH)

$A_{517 \text{ nm of sample}}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาระหว่างสารละลายอนุมูลอิสระ DPPH กับสารละลายโทรลอกซ์หรือตัวอย่างสารสกัด

7. เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการทำลาย

อนุมูลอิสระ DPPH กับปริมาณไทรลอกซ์หน่วยไมโครกรัม



ภาพที่ ก1 กราฟมาตรฐานของสารละลายไทรลอกซ์

3.2.1 การวิเคราะห์ความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดอบเชย

1. นำสารสกัดอบเชยรูปแบบต่างมาเจือจางที่ความเข้มข้นแต่ละระดับให้เหมาะสม
2. ปรับปริมาตรด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ให้ปริมาตรรวมแต่ละหลอดเป็น 5.4 มิลลิลิตร
3. เติมสารละลายอนุมูลอิสระ DPPH 0.6 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที ในที่มืด
4. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตรโดยใช้เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ เป็น blank
5. คำนวณเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระ DPPH จากสมการใน 3.2.1 ข้อ 5 และคำนวณ

ความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระ DPPH ในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลย์ไทรลอกซ์ต่อกรัมอบเชยป่น โดยใช้สมการจากกราฟมาตรฐานของสารละลายไทรลอกซ์

4. การวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริก

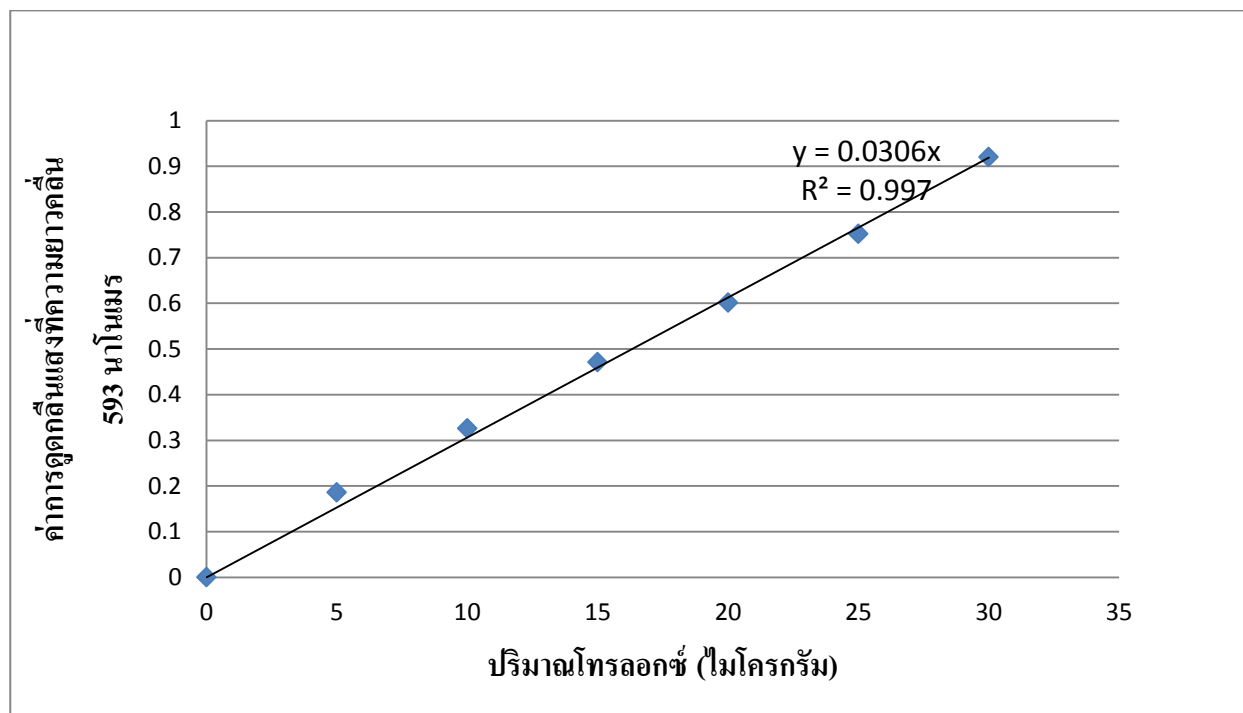
ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริก จะใช้วิธี ที่ดัดแปลงจาก Benzie และ Strain (1999) มีหลักการคือ ดูความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริก(Fe^{3+})ให้เป็นเฟอร์รัส (Fe^{2+})ซึ่งทำปฏิกิริยากับสารละลาย TPTZ ภายใต้สภาวะที่เป็นกรด ได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงิน ที่ดูดกลืนแสงได้ที่ 593 นาโนเมตร

4.1 สารเคมี

1. อะซิติกบัฟเฟอร์ pH 3.6 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ชั่งโซเดียมอะซิเตตไตรไฮเดรต 3.1 กรัม ผสมกับกรดกลีเซอริก 16 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1 ลิตร
2. สารละลาย TPTZ(2,4,6-tripyridyl-s-triazine) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ใน HCl ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ โดยชั่ง TPTZ 0.156 กรัมละลายใน HCl ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิลิตร
3. สารละลาย $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ โดยชั่ง $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.27 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 50 ml
4. FRAP reagent โดยนำสารที่เตรียมจากข้อ 1-3 มาผสมกัน ในอัตราส่วนอะซิติกบัฟเฟอร์:สารละลาย TPTZ: สารละลาย $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ เท่ากับ 10:1:1 (ต้องเตรียมใหม่ทุกวัน)

การเตรียมกราฟมาตรฐานโทรลอกซ์

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์ความเข้มข้นหลอดละ 5, 10, 15, 20, 25, 30 ไมโครกรัม โดยเตรียมสารละลายโทรลอกซ์ 250 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร(ชั่งโทรลอกซ์ 0.025 กรัม ปรับปริมาตรด้วยเอทานอลเป็น 100 มิลลิลิตร) และปิเปตใส่แต่ละหลอด 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05 และ 0.06 มิลลิลิตร ตามลำดับ แล้วปรับปริมาตรรวมแต่ละหลอดเป็น 0.1 มิลลิลิตร
2. เติมสารละลาย FRAP reagent 3 มิลลิลิตร (ใช้ 6 มิลลิลิตร ถ้าปิเปตสารละลายโทรลอกซ์ 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10 และ 0.12 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรรวมแต่ละหลอดเป็น 0.2 มิลลิลิตร)
3. ผสมให้เข้ากัน ด้วย vortex mixer และตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 8 นาที
4. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร
5. เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณโทรลอกซ์ในหน่วยไมโครกรัม



ภาพที่ ก1 กราฟมาตรฐานของสารละลายโทรลอกซ์

4.2 วิธีวิเคราะห์

1. ปิเปตตัวอย่างสารสกัด ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร
2. เติมสารละลาย FRAP reagent 3 มิลลิลิตร
3. ผสมให้เข้ากัน ด้วย vortex mixer และตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 8 นาที
4. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร
5. คำนวณความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริก จากสมการกราฟมาตรฐานของสารละลายโทรลอกซ์

5. การวิเคราะห์ความสามารถในการทำลายไนตริกออกไซด์ (nitric oxide scavenging)

การวิเคราะห์ความสามารถในการทำลายไนตริกออกไซด์ (nitric oxide scavenging) ตามวิธีของ Govindarajan และคณะ (2003)

3.1 สารเคมี

1. ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.2-7.4
2. กรดอะซิติกความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์
3. Sodium nitroprusside 10 mM
4. Sulfanilamide reagent (ละลาย Sulfanilamide 0.33 กรัม ปรับปริมาตรด้วยกรดอะซิติกความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์เป็น 100 มิลลิลิตร)
5. 0.1 % NED reagent (ละลาย N-(1-naphthyl) ethylenediamine 0.1 กรัม ปรับปริมาตรด้วยกรดอะซิติกความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์เป็น 100 มิลลิลิตร)

3.2 การวิเคราะห์ความสามารถในการทำลายไนตริกออกไซด์ของสารสกัดอบเชย

1. เตรียมตัวอย่างสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ (50-200 ไมโครกรัมต่อ 0.5 มิลลิลิตร)
2. เติมน้ำละลาย Sodium nitroprusside 2 มิลลิลิตร ในตัวอย่างสารสกัด 0.5 มิลลิลิตร
3. เติมน้ำฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 150 นาที
4. ปิเปตมา 1 มิลลิลิตร เติมน้ำ Sulfanilamide reagent 2 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่ 5 นาที
5. เติมน้ำ 0.1 % NED reagent 2 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่ 30 นาที
6. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร
7. คำนวณเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการทำลายไนตริกออกไซด์

จากเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการทำลายไนตริกออกไซด์

$$= (A_{540 \text{ nm of control}} - A_{540 \text{ nm of sample}}) \times 100 / A_{540 \text{ nm of control}}$$

ภาคผนวก ข.
การทดสอบทางประสาทสัมผัส

แบบทดสอบความชอบ (7-point hedonic scale)

ชื่อผู้ทดสอบ.....วันที่ทำการทดสอบ.....

ชื่อผลิตภัณฑ์ ไข่กรอกหมูรมควัน

กรุณาชิมตัวอย่างจากซ้ายไปขวา และให้คะแนนความชอบตามระดับคะแนนที่ท่านคิดว่าเหมาะสมในระหว่างการชิมกรุณาดื่มน้ำก่อนชิมตัวอย่างรหัสถัดไป

ระดับคะแนน

- | | |
|---|-------------------------------------|
| 7 | ชอบมากที่สุด (Like extremely) |
| 6 | ชอบมาก (Like very much) |
| 5 | ชอบเล็กน้อย (Like slightly) |
| 4 | เฉยๆ (Neither like nor dislike) |
| 3 | ไม่ชอบเล็กน้อย (Dislike slightly) |
| 2 | ไม่ชอบมาก (Dislike very much) |
| 1 | ไม่ชอบมากที่สุด (Dislike extremely) |

รหัสตัวอย่าง

สี (color)

กลิ่น (odor)

รสชาติ (flavor)

เนื้อสัมผัส (texture)

ความชอบโดยรวม (overall liking)

_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____

ข้อเสนอแนะ (suggestion)
