

บทที่ 3

วิธีดำเนินการ

3.1 วัตถุดิบ

3.1.1 มะรุม (*Moringa*) ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยสาขากิจชุมชนเกษตรอินทรีย์ลพบุรี

3.2 เครื่องมือ

- 3.2.1 เครื่องกระเทาะเปลือกแบบไม่หิน
- 3.2.2 เครื่องบด (Blender) (Moulinex, China)
- 3.2.3 ตู้อบแบบถาด (Tray dryer) (Progress, Thailand)
- 3.2.4 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) (Memmert UM 400, Germany)
- 3.2.5 เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) (Beckman Coulter, USA.)
- 3.2.6 เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) (Hettich zentrifugen , Germany)
- 3.2.7 เครื่องชั่งละเอียด 2 ตำแหน่ง (Pioneer, USA.)
- 3.2.8 เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง (Denver, Germany)
- 3.2.9 เครื่องวิเคราะห์ความคงตัวของไขมัน (Metrohm's743Rancimat,switzerland)
- 3.2.10 เครื่อง ระเหย (Evaporater) (B'U'CHI, Switzerland)
- 3.2.11 เครื่องสกัดไขมัน (Gerhardt S306AK, Germany)
- 3.2.12 เครื่องกลั่นไนโตรเจน (Gerhardt vap 30S, Germany)
- 3.2.13 เครื่องวัดสี (HunterLab Color Quest XE, USA.)
- 3.2.14 เครื่องวิเคราะห์เยื่อใย
- 3.2.15 เครื่อง Differential Scanning Calorimetry (DSC 204 F1 Phoenix® ,Germany)
- 3.2.16 เครื่อง Gas Chromatography (GC) (Agilent 6890N, USA.)
- 3.2.17 เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (Agilent series 1100, USA.)
- 3.2.18 UV-VIS Spectrophotometer (Shimadzu UV-1601, Japan)
- 3.2.19 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) (Memmert-WNB 7-45, Germany)
- 3.2.20 เตาเผา (Muffle furnance) (Nabertherm LT40, Germany)
- 3.2.21 เตาหลอม
- 3.2.22 Micro-pipettors และ Tips
- 3.2.23 โถสำหรับดูดความชื้น (Desiccator)
- 3.2.24 Magnetic stirrers และ stirring bars
- 3.2.25 Vortex mixer
- 3.2.26 Thermometer
- 3.2.27 อุปกรณ์เครื่องแก้ว

3.3 สารเคมี

3.3.1 Acetic acid	(Merck, Germany)
3.3.2 Acetone	(Merck, Germany)
3.3.3 Acetate buffer	
3.3.4 Calcium chloride (CaCl ₂)	(Ajax Finechem, New Zealand)
3.3.5 Celite	(Fluka, Germany)
3.3.6 Cyclohexane	(Merck, Germany)
3.3.7 DPPH (2,2- diphenyl – l- picrylhydrazyl)	(Merck, Germany)
3.3.8 Ethyl alcohol	(Local)
3.3.9 Folin-Ciocalteu reagent	(Carlo Erba, Italy)
3.3.10 Hydrochloric acid (HCl)	(Merck, Germany)
3.3.11 Hexane commercial	(Local)
3.3.12 Iodine (I ₂)	(Carlo Erba Reagenti, Italy)
3.3.13 Potassium hydroxide (KOH)	(Ajax Finechem, New Zealand)
3.3.14 Potassium iodide (KI)	(Carlo Erba Reagenti, Italy)
3.3.15 Potassium dichromate	(Carlo Erba Reagenti, Italy)
3.3.16 Starch	(Fluka, Germany)
3.3.17 Sodium hydroxide (NaOH)	(Carlo Erba Reagenti, Italy)
3.3.18 Sodium thiosulfate	(Fluka, Germany)
3.3.19 Trolox	(Merck, Germany)
3.3.20 TPTZ(2,4,6-tripyridyl-s-triazine)	(Fluka Chemicals, Switzerland)
3.3.21 Wijs solution	(Merck, Germany)

3.4 สถานที่ทำการทดลอง

คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และศูนย์วิสาหกิจชุมชนเกษตรอินทรีย์ลพบุรี ตำบลท่าวัง อำเภوتاวัง จังหวัดลพบุรี

3.5 วิธีการทดลอง

3.5.1 การเตรียมเมล็ดมะรุมและศึกษาองค์ประกอบ

เมล็ดมะรุมที่แก่เต็มที่แห้งอยู่กับต้นลักษณะฝักสีน้ำตาล แกะเอาเมล็ดในตากแดดหรือ อบแห้งที่ 45-50 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง (ความชื้นร้อยละ < 5) (อบในกรณีเมล็ดมะรุมมีความชื้นเกินที่กำหนด) แยกเปลือกออกเก็บบรรจุใส่ถุงพลาสติกแบบสุญญากาศเก็บในภาชนะที่ปิดสนิทไว้ในตู้เย็น ได้ตัวอย่างเมล็ดมะรุม มาเป็นตัวอย่างในการสกัดน้ำมัน จากนั้นนำมาหาองค์ประกอบของเมล็ดมะรุมแห้ง หาปริมาณ ความชื้น (moisture) ตามวิธี AOAC, (2000), เถ้า (ash), ไขมัน (crude fat), โปรตีน (crude protein), ใยอาหาร (crude fiber) และ คาร์โบไฮเดรต (crude carbohydrate) ตามวิธี AOAC, (2011)

3.5.2 การศึกษาผลของวิธีการสกัดน้ำมัน

ศึกษาวิธีการสกัดน้ำมันที่มีต่อคุณสมบัติของน้ำมันจากตัวอย่างเมล็ดมะรุม ทำการสกัดน้ำมัน ดังนี้

3.5.2.1 โดยการบีบเย็น ใช้เครื่องบีบอัดแบบสกรู (CSP)

นำเมล็ดมะรุมแห้ง (ไม่เอาเปลือกหุ้มเมล็ดออก) (ความชื้นร้อยละ <5) ใส่ลงในเครื่องบีบอัดแบบสกรู (screw press) ได้น้ำมันที่มีกากของเมล็ดบางส่วนปนอยู่ ทำให้ใส โดยตั้งไว้ให้ตกตะกอน 6 ชั่วโมง แยกเอาน้ำมันแต่ส่วนใสแล้วนำมากรองโดยกระดาษกรอง (Whatman) เบอร์ 113 (สำหรับงานกรองน้ำมันโดยเฉพาะ) เก็บในขวดสีชาปิดสนิท (เก็บในตู้เย็น) คำนวณปริมาณร้อยละของน้ำมันที่ได้

3.5.2.2 สกัดโดยวิธี Soxhlet ใช้ตัวทำละลายเฮกเซน (SE)

นำเมล็ดมะรุมแห้งที่ได้จาก (ข้อ 3.5.1) มาบดโดยเครื่องบดหยาบ (blender) ซังมะรุม 10 ± 0.1 กรัมห่อด้วยกระดาษกรอง สกัดน้ำมันโดยใช้เครื่อง soxtherm ที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 150 นาที จากนั้นนำมาระเหยตัวทำละลายออกโดย rotary evaporator ควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส ระเหยจนกว่าตัวทำละลายหมด ได้น้ำมันมะรุมดิบ (Crude moringa oil) และนำมากำจัดยางเหนียว (degumming) ดัดแปลงวิธีจาก Anwar and Bhanger (2003) โดยเติมน้ำร้อนอุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียส ปริมาณร้อยละ 20 กวนผสมนาน 10 นาที โดยใช้แท่งแม่เหล็กกวน จากนั้นทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้องปั่นเหวี่ยงที่ 6000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แล้วนำมากรองสุญญากาศ ด้วยกระดาษกรอง (Whatman) เบอร์ 113 (สำหรับงานกรองน้ำมันโดยเฉพาะ) กรองเอาส่วนที่เป็นของแข็ง (solid) ออก ได้น้ำมันมะรุมบริสุทธิ์เก็บในขวดสีชาในตู้เย็น และคำนวณปริมาณร้อยละของน้ำมันที่ได้

3.5.2.3 สกัดโดยแช่ในตัวทำละลายเฮกเซน (CSE)

นำเมล็ดมะรุมแห้งที่ได้จาก (ข้อ 3.5.1) มาบดโดยเครื่องบดหยาบ (blender) แช่มะรุมแห้งบดในอัตราส่วนมะรุม: เฮกเซน 1:3 เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำของเหลวแยกจากของแข็งมาระเหยตัวทำละลายออกโดย rotary evaporator ควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส ระเหยจนกว่าตัวทำละลายหมด เมื่อได้น้ำมันมะรุมดิบ (crude moringa oil) นำมากำจัดยางเหนียว (degumming) เช่นเดียวกับวิธี 3.5.2.2

3.5.3 ศึกษาสมบัติของน้ำมันที่สกัดจากเมล็ดมะรุมด้วยวิธีแตกต่างกัน

3.5.3.1 ทางด้านกายภาพ

3.5.3.1.1 ความหนืดวัดโดยใช้ Brookfield viscometer รุ่น (Brookfield DV-III) หัววัดเบอร์ 18 Small sample adapter

3.5.3.1.2 สี วัดโดยเครื่องวัดสี Hunterlab รุ่น (Color Quest XE) วัดค่าสีของน้ำมันในระบบ CIE อ่านค่าสีเป็น $L^*a^*b^*$ ค่า L^* หมายถึง ค่าความสว่าง ที่มีอยู่ในช่วง 0 (สีดำ) ถึง 100 (สีขาว) ค่า a^* หมายถึง ค่าความเป็นสีแดง ถ้าเป็นบวก (+) และค่าความเป็นสีเขียว ถ้าเป็น (-) ค่า b^* หมายถึง ค่าความเป็นสีเหลือง ถ้าเป็นบวก (+) และค่าความเป็นสีน้ำเงิน ถ้าเป็น (-)

3.5.3.1.3 สมบัติด้านความร้อน (Thermal properties) โดยใช้เครื่องมือ Differential Scanning Calorimetry (DSC) รุ่น DSC 204 F1 Phoenix®

3.5.3.2 ทางด้านเคมี

3.5.3.2.1 ค่าฟอนนิฟเคชัน (AOCS Official Method Cd 3-25)

3.5.3.2.2 ค่าความเป็นกรด (AOCS Official Method Cd 3d-63)

3.5.3.2.3 ค่าไอโอดีน (AOCS Official Method Cd 1-25)

3.5.3.2.4 ค่าปริมาณสารที่ซาฟอนิไฟต์ไม่ได้ (AOCS Official Method 6b - 53)

3.5.3.2.5 ปริมาณ Tocopherols และ Tocotrienols โดยใช้เครื่อง HPLC (AOCS Official Method Ce 8-89)

3.5.3.2.6 ชนิดและปริมาณกรดไขมัน โดยใช้เครื่อง GC (In-house method based on AOAC (2005), 996.06 (NFI T 974))

3.5.3.2.7 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic compound) โดยดัดแปลงจาก Singleton and Lamuela-Raventos (1999)

3.5.3.3 ความคงตัวของน้ำมัน

3.5.3.3.1 ตรวจสอบความคงตัวต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยใช้เครื่อง Rancimat กำหนดอัตราการไหลของอากาศ 20 ลิตรต่อชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส

3.5.3.4 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity)

3.5.3.4.1 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH (DPPH scavenging activity) โดยดัดแปลงจาก Murakami และ คณะ (2004)

3.5.3.4.2 ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริก (Ferric reducing antioxidative potential, FRAP) โดย Benzie and Strain (1996)

3.5.4 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ยกเว้นข้อ 3.5.3.1.3, 3.5.3.2.5 และ 3.5.3.2.6 ทำการทดลอง 2 ซ้ำ การวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) โดยนำข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์หาค่าความแปรปรวน (ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 วิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป