บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบ

3.1.1 ตัวอย่างพืช

ตัวอย่างพืชพื้นบ้านที่บริโภคได้จำนวนทั้งหมด 22 ตัวอย่าง ได้รับจากแหล่งที่มา 2 แหล่ง คือ สถานีเกษตรหลวงอ่างขาง อำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 11 ตัวอย่าง และจากตลาดสดในจังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 11 ตัวอย่าง รายชื่อพืชทั้งหมดเรียงตามลำดับชื่อวิทยาศาสตร์ ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ตัวอย่างพืชที่ใช้ในการทดลอง

ลำดับ	ชื่อ	ส่วนที่ใช้	ชื่อวิทยาศาสตร์	แหล่งที่มา
1	ผักชีลาว	ลำต้น/ ใบ	*Anethum graveolens* L.	ตลาดวโรรส
2	ผักปลัง	ใบ	*Basella alba* L.	ตลาดวโรรส ตลาดแม่มาลัย, ตลาดไชยปราการ
3	ผักเสี้ยวแก้ว	ใบ	*Bauhinii nervosa* (Wall. Ex Benth.) Baker	ตลาดวโรรส
4	เมี่ยงป่า	ใบ	*Camellia sinensis* (L.)Kuntze var. *assamica* (J.Masters) Kitam	สถานีเกษตรหลวงอ่างขาง
5	ผักชี	ลำต้น/ ใบ	*Carum carvi* L.	ตลาดบ้านทม
6	ก่อข้าว	ใบ	*Castanopsis inermis* (Lind .ex Wall.) Benth. & Hook. f.	สถานีเกษตรหลวงอ่างขาง
7	ติ้วเกลี้ยง	ใบ	*Cratoxylum Cochinchinense* (Lour.) Blume	สถานีเกษตรหลวงอ่างขาง
8	ติ้วขาว	ใบ	*Cratoxylum formosum* (Jack) Dyer spp. Pruniflorum (Kurz) Gogel	ตลาดแม่ทม
9	กระทุงหมาบ้า	ใบ	*Dregea volubilis* (L.f.) Hook. F.	ตลาดวโรรส, ตลาดแม่มาลัย
10	ผักแปม	ใบ	*Eleutherococcus trifoliatum* (L.) S.Y. Hu.	สถานีเกษตรหลวงอ่างขาง

ตารางที่ 3.1 ตัวอย่างพืช (ต่อ)

ลำดับ	ชื่อ	ส่วนที่ใช้	ชื่อวิทยาศาสตร์	แหล่งที่มา
11	ส้มจี้	ใบ	*Embelia ribes* Burm. F.	สถานีเกษตรหลวงอ่างขาง
12	มันปลา	ใบ	*Glochidion sphaerogynum* (MÜll Arg.) Kurz.	สถานีเกษตรหลวงอ่างขาง
13	ผักเชียงดา	ใบ	*Gymnema inodorum* (Lour.) Decne	ตลาดวโรรส, ตลาดแม่ทม
14	บอนแบ้ว	หน่อ	*Hapaline hookeriana* Schott	ตลาดแม่ทม
15	หมีเหม็น	ใบ	*Litsea glutinosa* (Lour.) C.B. Rob.	สถานีเกษตรหลวงอ่างขาง
16	หมีบัง	ใบ	*Litsea salicifolia* Nees ex Roxb.	สถานีเกษตรหลวงอ่างขาง
17	ผักแส้ว	ใบ	*Marsdenia glabra* Costa	ตลาดไชยปราการ
18	ผักไผ่	ลำต้น	*Persicaria odorata* (Lour.) Sojak.	ตลาดวโรรส
19	ทะโล้	ใบ	*Schima Wallichii (*DC.*) Korth*	สถานีเกษตรหลวงอ่างขาง
20	หญ้าหวาน	ใบ	*Stevia Rebaudiana* Bertoni	สถานีเกษตรหลวงอ่างขาง
21	นางเลว	ดอก	*Tupista albiflora* K. Larsen	ตลาดแม่มาลัย
22	ส้มปี้	ใบ	*Vaccinium sprengelii* (G.Don) Sleumer	สถานีเกษตรหลวงอ่างขาง

3.1.2 ตัวอย่างแพตตี้หมู

- เนื้อหมูบริเวณสะโพก (CP fresh mart, จังหวัดกรุงเทพฯ)
- มันหมูแข็ง (CP fresh mart, จังหวัดกรุงเทพฯ)
- เกลือบริโภคผสมไอโอดีน 99.9 เปอร์เซ็นต์ (ปรุงทิพย์, จังหวัดนครราชสีมา)

3.1.3 สารเคมี

- กรดแกลลิก (Fluka, ประเทศเยอรมัน)
- กรดไขมันลิโนเลอิก (Sigma, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- กรดไตรคลอโรอะซีติก (trichloroacetic acid) (Merck, ประเทศเยอรมัน)
- กรดไทโอบาร์บิทูริก (thiobarbituric acid) (Merck, ประเทศเยอรมัน)
- กรดอะซีติก (Lab-scan, ประเทศไอร์แลนด์)

- กรดไฮโดรคลอริก (Lab-scan, ประเทศไอร์แลนด์)
- โซเดียมคาร์บอเนต (Carlo, ประเทศอิตาลี)
- ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเตตระ-ไฮเดรท (Merck, ประเทศเยอรมัน)
- บิวทิลเลเทดไฮดรอกซีโทลูอีน (butylated hydroxytoluene, BHT) (BHD, ประเทศมาเลเซีย)
- ปิโตรเลียมอีเทอร์ (Esso, ประเทศไทย)
- โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Merck, ประเทศเยอรมัน)
- เอทานอล (องค์การสุรา, ประเทศไทย)
- ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Carlo, ประเทศอิตาลี)
- 2-deoxy-D-ribose (Sigma, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- 2,2-diphenyl-1-picryhydrazyl radical (DPPH) (Sigma, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- 2,2,4-trimethylpentane (isooctane) (Lab-scan, ประเทศไอร์แลนด์)
- 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) (Sigma, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- Ascorbic acid (Sigma, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- Catechin hydrate (Fluka, ประเทศเยอรมัน)
- Ethylenedinitrilotetraacetic acid (EDTA) (Merck, ประเทศเยอรมัน)
- Ferric chloride anhydrous ($FeCl_3$) (Carlo, ประเทศอิตาลี)
- Folin-Ciocalteau reagent (Carlo, ประเทศอิตาลี)
- Para-anisidine (Merck, ประเทศเยอรมัน)
- Tween 40 (Merck, ประเทศเยอรมัน)

3.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์

- เครื่องชั่ง (4 ตำแหน่ง) (Sartorius TE 214, ประเทศเยอรมัน)
- เครื่องชั่ง (2 ตำแหน่ง) (Metter Toledo PL 1502-S, ประเทศเยอรมัน)
- ตู้อบลมร้อน (Patch OV 663, ประเทศไทย)
- เครื่องบด (Blender) (Moulinex, ประเทศฝรั่งเศส)
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Memmert WB 14, ประเทศเยอรมัน)
- Microtiter Plate Reader (Beckman DTX 880, ประเทศสหรัฐอเมริกา)

- Vortex mixer	(Vortex genie 2 G-560E, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง	(Sartorious PB-10, ประเทศเยอรมัน)
- เครื่องระเหยแบบสุญญากาศ	(Rotavapor BUCHI R-114, ประเทศสวิตเซอร์แลนด์)
- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง ที่ใช้สำหรับวัดตัวอย่างเนื้อ	(Oakton Waterproof, ประเทศมาเลเซีย)
- เครื่องวัดสี	(Konica Minolta CR400, ประเทศญี่ปุ่น)
- เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์	(Shimadzu UV-1700, ประเทศญี่ปุ่น)
- เครื่องโฮโมจีไนซ์เซอร์	(CAT X120, ประเทศเยอรมัน)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงตะกอน	(Hettich Zentrifugen EBA 20, ประเทศเยอรมัน)
- เครื่องบดเนื้อ	(Seven Five, ประเทศไทย)
- เครื่องผสม	(Dito Sama K-55, ประเทศญี่ปุ่น)
- เครื่องซีลแบบเท้าเหยียบ	(Santo, ประเทศไทย)
- เครื่องวิเคราะห์ไขมัน	(Gerhardt, ประเทศเยอรมัน)
- ตู้เย็นควบคุมอุณหภูมิ	(Sanyo, ประเทศญี่ปุ่น)

3.3 สถานที่ดำเนินงาน

คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การเตรียมตัวอย่าง

3.4.1.1 การเตรียมตัวอย่างพืช

นำตัวอย่างพืชสดมาล้างให้สะอาดด้วยน้ำกรองแล้วผึ่งให้สะเด็ดน้ำ อบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ประมาณ 18-24 ชั่วโมง จนพืชมีความชื้นไม่เกิน 10 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำไปบดเป็นผง แล้วกรองผ่านตะแกรงขนาด 60 เมช (mesh)

3.4.1.2 การเตรียมสารสกัดพืช

1) การสกัดตัวอย่างพืช ดัดแปลงจากวิธีของ Pilarski และคณะ (2006)

ชั่งตัวอย่างผงพืช ผสมกับเอทานอล (ความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 10 ปั่นผสมด้วยเครื่องปั่นนาน 1 นาที แล้วให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที สกัดซ้ำอีก 1 ครั้ง จากนั้นเทสารสกัดจากพืชรวมกัน แล้วจึงกรองด้วยกระดาษกรอง (Whatman เบอร์ 4) นำสารสกัดพืชใส่ในขวดสีชา เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ (-18) ±1 องศาเซลเซียส ทำการวิเคราะห์สารพฤกษเคมีที่สำคัญภายใน 1 สัปดาห์

2) การเตรียมสารสกัดพืชเข้มข้น สำหรับเติมลงในแพตตี้หมู

นำสารสกัดพืชที่ได้จากการสกัดดังกล่าวข้างต้น มาทำลายสีของรงควัตถุคลอโรฟิลล์ โดยการเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 10 นอร์มอล ลงในสารสกัดพืชจนสารสกัดพืชมีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 2.0 แล้วจึงปรับความเป็นกรด-ด่างของสารสกัดพืชอีกครั้งให้มีค่าเท่ากับ 7.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 12.5 นอร์มอล จากนั้นนำสารสกัดพืชไปทำให้เข้มข้น ด้วยการระเหยตัวทำละลายออกในสภาวะสุญญากาศด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จนมีปริมาณของแข็งประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ แล้วจึงนำสารสกัดพืชเข้มข้นบรรจุในขวดสีชา และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ (-18) ±1 องศาเซลเซียส

3) การวิเคราะห์ปริมาณของแข็งทั้งหมด ตามวิธีการของ AOAC method966.02 (2000)

นำสารสกัดพืช 1-3 กรัมชั่งน้ำหนักให้แน่นอน ใส่ลงในภาชนะหาความชื้นซึ่งทราบน้ำหนักแล้ว จากนั้น ระเหยตัวทำละลายออกจากตัวอย่างด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 105±1 องศาเซลเซียส จนตัวอย่างมีน้ำหนักคงที่ และนำไปคำนวณปริมาณของแข็งทั้งหมดจากสูตร

ปริมาณของแข็งทั้งหมด (%) = 100 – เปอร์เซ็นต์ตัวทำละลาย

3.4.1.3 การเตรียมตัวอย่างแพตตี้หมู

นำเนื้อหมูส่วนสะโพก 700 กรัม มันหมูแข็ง 300 กรัม และเกลือ 1 กรัม มาบดรวมกันให้เป็นเนื้อเดียวกัน จะได้ส่วนประกอบของแพตตี้หมูที่มีไขมันประมาณ 20-30 เปอร์เซ็นต์ แล้วนวดด้วยเครื่องผสมนาน 3 นาที จากนั้นนำส่วนผสมที่ได้ ขึ้นรูปตัวอย่างในพิมพ์รูปวงกลมเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 4 เซนติเมตร แล้วบรรจุลงในถุงโพลีเอทิลีน (polyethylene, PE) ปิดผนึกปากถุงด้วยเครื่องซีลแบบเท้าเหยียบ นำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 4±1 องศาเซลเซียส 6-8 ชั่วโมง แล้วจึงนึ่งให้สุก จนอุณหภูมิใจกลางของผลิตภัณฑ์อยู่ระหว่าง 75-78 องศาเซลเซียส

3.4.2 การวิเคราะห์ปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด และ ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดพืช

การวิเคราะห์ปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด และความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดพืชทำได้ ดังนี้

3.4.2.1 การวิเคราะห์หาปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu method ดัดแปลงจาก Singleton และ Rossi (1999)

นำสารสกัดตัวอย่างมาเจือจางด้วยน้ำกลั่น ปิเปตสารสกัดปริมาตร 250 ไมโครลิตร ลงในหลุมไมโครเพลท แล้วเติมรีเอเจนต์ Folin-Ciocalteu ปริมาตร 12.5 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) (ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร โดยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท (microtiter plate reader)

นำค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างไปคำนวณหาปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดโดยใช้กราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก แสดงค่าในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลย์ของกรดแกลลิกต่อกรัมตัวอย่างน้ำหนักแห้ง (mg Gallic Acid Equivalence /g dry basis)

3.4.2.2 การวิเคราะห์ความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระ DPPH ด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity ดัดแปลงจาก Brand-Williams และคณะ (1995)

นำสารสกัดตัวอย่างมาเจือจางด้วยน้ำกลั่น 4 ระดับ ปิเปตสารสกัดปริมาตร 70 ไมโครลิตร ลงในหลุมไมโครเพลท แล้วเติมสารละลาย DPPH (ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 210 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร โดยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท

$$\% \text{ inhibition} = [1-(A_{sample}/ A_{control})] \times 100$$

โดย % inhibition หมายถึง ความสามารถในการยับยั้งสารต้านอนุมูลอิสระ

A_{sample} หมายถึง ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่าง

$A_{control}$ หมายถึง ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH

จากนั้นคำนวณหา IC_{50} (Inhibition Concentration โดยเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งกับความเข้มข้นของสารสกัดพืช จากนั้น คำนวณหาสมการความสัมพันธ์ และ หาความเข้มข้นของสารสกัดที่จุดตัดแกน Y ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งค่าที่ได้จะแสดงในรูปความสามารถในการยับยั้งอนุมูล DPPH จะแสดงในรูปความเข้มข้นของสารสกัดพืชที่ใช้ทำลายอนุมูล DPPH ลง 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}, มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

สำหรับ EC_{50} (Effective Concentration) คำนวณโดยใช้วิธีการเดียวกันกับ IC_{50} แต่เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งกับ น้ำหนักพืชแห้ง แล้วหาสมการความสัมพันธ์ตามลำดับ ค่า EC_{50} ที่ได้แสดงถึงปริมาณพืช (น้ำหนักพืชแห้ง) ที่ต้องใช้ในการทำลาย

อนุมูล DPPH ลง 50 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นคำนวณ ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Antioxidant activity; AOA, ต่อมิลลิกรัม (น้ำหนักพืชแห้ง) จากสมการต่อไปนี้

$$\text{Antioxidant activity (AOA)} = 1/\ EC_{50}$$

โดย Antioxidant activity หมายถึง ความสามารถในการต้านออกซิเดชัน

EC_{50} หมายถึง ปริมาณพืชที่ใช้ในการทำลายอนุมูล DPPH 50%

3.4.2.3 การวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งการเกิดอนุมูลไฮดรอกซิลด้วย วิธี 2-Deoxyribose assay ดัดแปลงจาก Aruoma (1994)

ปิเปตสารละลายปฏิกิริยา EDTA-$FeCl_3$ (ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติมสารละลายกรดแอสคอร์บิก (ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ตัวอย่างสารสกัดพืชที่เจือจางด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 50 ไมโครลิตร สารละลายดีออกซี-ไรโบส (ความเข้มข้น 15 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4) ปริมาตร 450 ไมโครลิตร ตามลำดับ ผสมให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นปิเปตสารละลายปฏิกิริยา ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร และสารละลายปฏิกิริยา TCA-TBA-HCl (Trichloroacetic acid-thiobarbituric acid-hydrochloric acid) ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง ต้มจนเดือดเป็นเวลา 20 นาที ทิ้งให้เย็น จากนั้นปิเปตสารละลายที่ได้ 300 ไมโครลิตร ลงในหลุมไมโครเพลท แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท

นำค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างไปคำนวณหาความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน (antioxidant activity, AOA) ดังสมการ

$$\%AOA = [1-(A_{sample}/ A_{control})] \times 100$$

โดย A_{sample} หมายถึง ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างสารสกัดพืช

$A_{control}$ หมายถึง ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำกลั่น

จากนั้นนำค่า %AOA ไปคำนวณหาความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยใช้กราฟมาตรฐานของสารละลายโทรลอกซ์

3.4.2.4 การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน ด้วยวิธีThiobarbituric acid reactive substances (TBARS) ดัดแปลงจาก McDonald และ Hultin (1987)

นำสารสกัดตัวอย่างมาเจือจางด้วยน้ำกลั่น ปิเปตสารสกัด ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง แล้วเติมอิมัลชันของกรดไขมันลิโนเลอิก (ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 50±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลายปฏิกิริยา TCA-TBA-HCl ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ต้มจน

เดือด นาน 15 นาที ทิ้งให้เย็น จากนั้นปิเปตสารละลายที่ได้ 300 ไมโครลิตร ลงในหลุมไมโครเพลท แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท

นำค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างไปคำนวณหาความสามารถในการต้านออกซิเดชัน (antioxidant activity, AOA) ดังสมการ

$$\%AOA = [1-(A_{sample}/ A_{control})] \times 100$$

จากนั้นนำค่า %AOA ไปคำนวณหาความสามารถในการต้านออกซิเดชันของไขมัน โดยใช้กราฟมาตรฐานของสารละลายโทรลอกซ์

3.4.2.5 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

การทดลองนี้วางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (Complete Randomized Design, CRD) โดยทำการทดลอง 2 ซ้ำ จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อหาความแปรปรวน (ANOVA) ของปริมาณและความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารพฤกษเคมีในพืชแต่ละชนิด และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยของข้อมูลด้วยวิธี Duncan's multiple range test โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำผลการทดลองที่ได้จากแต่ละวิธี มาหาความสัมพันธ์ทางสถิติ โดยการวิเคราะห์หาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป

3.4.3 การคัดเลือกชนิดของพืชที่มีความเป็นไปได้ในการใช้ในแพตตี้หมู

3.4.3.1 การเตรียมตัวอย่างแพตตี้หมูผสมผงพืช

นำผงพืช เติมลงส่วนผสม ให้ได้สัดส่วนพืช 1 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนัก) ของแพตตี้หมู นวดส่วนผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน นาน 3 นาที จากนั้น ขึ้นรูปแพตตี้หมูในพิมพ์รูปวงกลมเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 4 เซนติเมตร แล้วบรรจุลงในถุงโพลีเอทิลีน ปิดผนึกปากถุงด้วยเครื่องซีลแบบเท้าเหยียบ นำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 4±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6-8 ชั่วโมง จากนั้นปรุงสุก ตามวิธีดังข้อ 3.4.1.3

3.4.3.2 การคัดเลือกชนิดขอพืชที่มีความเป็นไปได้ในการยอมรับทางประสาทสัมผัสของแพตตี้หมูที่เติมผงพืช

นำแพตตี้หมูที่เติมผงพืชแต่ละชนิด ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนัก) จำนวนทั้งหมด 22 ตัวอย่าง มาทดสอบความเป็นไปได้ในการใช้พืชในแพตตี้หมู โดยจะคัดเลือกให้เหลือพืช 5 ชนิด ด้วยการประเมินความแตกต่างโดยรวม (Overall difference test) ตามวิธีการจัดลำดับคุณภาพ (quality test) ด้านสี กลิ่นรส รสชาติ เนื้อสัมผัส และความชอบโดยรวม ตามวิธีการของ Meilgard และคณะ (1999) ในการทดสอบใช้การสุ่มตัวอย่างแพตตี้หมูออกเป็น 4 กลุ่ม โดย 2 กลุ่มแรก ประกอบด้วย ตัวอย่างจำนวน 5 ตัวอย่าง และ 2 กลุ่มหลังประกอบด้วยตัวอย่างจำนวน 6 ตัวอย่าง และใช้ผู้ทดสอบซึ่งเป็นนักศึกษาระดับปริญญาตรีและปริญญาโท คณะ

อุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่เคยได้รับประทานผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ (ได้แก่ แพตตี้หมู หรือ ไส้กรอก) ภายใน 2 สัปดาห์ก่อนการทดสอบ เพื่อคัดเลือกแพตตี้หมูที่เติมพืช 5 ชนิด ที่ได้คะแนนการยอมรับสูงสุด 5 ลำดับ เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

เตรียมตัวอย่างแพตตี้หมูที่เติมพืชผงที่คัดเลือกได้แต่ละชนิด 5 ตัวอย่าง มาทดสอบการยอมรับทางประสาทสัมผัส ด้วยวิธี 7- points hedonic scale กับผู้ทดสอบที่ไม่ผ่านการฝึกฝน จำนวน 30 คน โดยทดสอบในด้านคุณลักษณะด้านสี กลิ่น รสชาติ เนื้อสัมผัส และความชอบโดยรวมของผลิตภัณฑ์

3.4.3.3 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

นำคะแนนการทดสอบมาวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของการยอมรับทางด้านประสาทสัมผัสของผู้ทดสอบที่มีต่อแพตตี้หมูที่เติมผงพืช โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (Random Complete Randomized Design, RCRD) ทำการทดลอง 2 ซ้ำ โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นคัดเลือกพืชมา 2 ชนิด เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3.4.4 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและเคมีในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ ของแพตตี้หมูปรุงสุกที่เติมผงพืชและสารสกัดพืช

นำตัวอย่างพืชที่คัดเลือกจำนวน 2 ชนิดจากข้อ 3.4.3 มาเติมลงในแพตตี้หมู โดยวางแผนการทดลองแบบ Complete Randomized Design (CRD) มีตัวแปรที่ต้องการศึกษา คือ ชนิดของพืช (2 ชนิด) วิธีการเติมพืช (2 แบบ) ความเข้มข้นของพืช (3 ระดับ) อุณหภูมิในการเก็บรักษา (2 ระดับ) และระยะเวลาการเก็บรักษา (8 ระดับ) โดยวิธีการเติมพืชนั้นแบ่งออกเป็น 2 แบบ คือ การเติมผงพืช และการเติมสารสกัดพืชเข้มข้น ซึ่งการเตรียมตัวอย่างแพตตี้หมูที่เติมผงพืชทำเช่นเดียวกับข้อ 3.4.3 ที่ความเข้มข้นต่างๆ 3 ระดับ ได้แก่ 300, 500 และ 700 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมตัวอย่างแพตตี้หมู ส่วนแพตตี้หมูที่เติมสารสกัดพืชเข้มข้น ใช้สารสกัดพืชเข้มข้นที่ผ่านการกำจัดคลอโรฟิลล์ที่ได้จากข้อ 3.4.1.2 เติมลงไปแทนส่วนของผงพืช ที่ความเข้มข้นต่างๆ 3 ระดับ ได้แก่ 190, 320 และ 450 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมตัวอย่าง แพตตี้หมู แบ่งตัวอย่างแพตตี้หมู ออกเป็น 2 ส่วน โดยส่วนที่ 1 นำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 32 วัน และสุ่มเก็บตัวอย่างทุก ๆ 4 วัน สำหรับส่วนที่ 2 นำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส และสุ่มเก็บตัวอย่างทุกๆ 15 วัน นาน 120 วัน

สุ่มเก็บตัวอย่างจำนวน 3 ชิ้นต่อตัวอย่าง เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ และทางเคมีที่เกิดขึ้นในระหว่างการเก็บรักษา เปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมที่ไม่เติมสารสกัดจากพืช

และตัวอย่างเติมบีเอชที ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมตัวอย่าง และเติมคาทิชิน ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมตัวอย่าง โดยวิเคราะห์ดังนี้

3.4.4.1 ความเป็นกรด-ด่าง ด้วยเครื่องวัดพีเอชที่ใช้สำหรับวัดตัวอย่างเนื้อ

3.4.4.2 ค่าสี ด้วยเครื่องวัดสี Konica Minolta CR-400

นำตัวอย่างแพตตี้หมูมาผ่าตามแนวขวาง แล้ววัดค่าสีจำนวน 3 ครั้งต่อตัวอย่าง ที่ตำแหน่งต่างๆ ของด้านในตัวอย่างแพตตี้หมู โดยค่าสีแสดงผลในค่า CIE $L^*a^*b^*$ และคำนวณหาความแตกต่างของสี (Total color difference, ΔE) ดังสมการดังนี้

$$\Delta E = (\Delta L^{*2}+\Delta a^{*2}+\Delta b^{*2})^{1/2}$$

3.4.4.3 ค่า Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) ดัดแปลงจากวิธีของ Buege และ Aust (1978)

ชั่งตัวอย่างแพตตี้หมู 0.5 กรัมลงในหลอดทดลอง แล้วเติมสารละลาย TCA-TBA-HCl ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน ด้วยเครื่องโฮโมจีไนเซอร์ นาน 3 นาที จากนั้นนำไปต้มจนเดือด นาน 15 นาที ทิ้งให้เย็น แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,500 รอบต่อนาที นาน 10 นาที จากนั้นทำการกรองสารละลายปฏิกิริยา ด้วยประดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 532 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ นำค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างไปคำนวณหาค่า TBARS โดยใช้กราฟมาตรฐานของสารละลายมาลอนไดอัลดีไฮด์ (Malondialdehyde, MDA) ในหน่วยมิลลิกรัมมาลอนไดอัลดีไฮด์ต่อกิโลกรัมตัวอย่างเนื้อ (mg MDA/ kg sample)

3.4.4.4 ค่า *p*-Anisidine value (*p*-Av) ตามวิธีของ AOCS Cd 18-90 (1997)

ชั่งน้ำมันของตัวอย่างแพตตี้หมูที่ได้จากการสกัดไขมันด้วยเครื่อง Gerhardt ปริมาณ 0.5-4.0 ±0.001 กรัม ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วย isooctane ผสมให้เข้ากัน จากนั้นปิเปตสารละลายดังกล่าว ปริมาตร 5 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง แล้วเติมรีเอเจนต์ *p*-anisidine ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปิดฝาหลอดทดลอง และผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด นาน 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 350 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโต-มิเตอร์

นำค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างไปคำนวณหาค่า *p*-Anisidine value (*p*-Av) จากสมการ

$$p\text{-Av} = [25 \times (1.2A_{sample} - A_{blank})]/m$$

โดย A_{sample} หมายถึง ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

A_{blank} หมายถึง ค่าการดูดกลืนแสงของไอโซออกเทน

m หมายถึง น้ำหนักของตัวอย่าง

3.4.4.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของการเปลี่ยนแปลงสมบัติทางกายภาพและเคมีในระหว่างการเก็บรักษาของแพตตี้หมูที่เติมผงพืช และสารสกัดพืชที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (Complete Randomized Design, CRD) ทำการทดลอง 2 ซ้ำ แล้วนำผลการทดลองมาวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan’s New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์