วัสดุและวิธีวิจัย

1. วัสดุ

1.1 สารเคมี

Chemical	Grade	Supplier/ Manufacture
Acetonitrile	HPLC reagent grade	Labscan., Ireland
Ammonnium dihyrogen orthophosphate	Analytical reagent grade	Ajax Finchem., Australia
Barium hydroxide	Analytical reagent grade	Fisher Scientific., UK.
Citric acid	Analytical reagent grade	Fisher Scientific., UK.
D-arabinose	Analytical reagent grade	Sigma-Aldrich., U.S.A.
D-fructose	Analytical reagent grade	E. Merck., Germany.
D-glucose anhydrate	Analytical reagent grade	E. Merck., Germany.
D-galactose	Analytical reagent grade	E. Merck., Germany.
D-xylose	Analytical reagent grade	E. Merck., Germany.
Ethanol	Commercial grade	The Government Pharmaceutical Organization., Thailand.
Fumaric acid	Analytical reagent grade	Fluka., Switzerland.
Fructose	Food grade	Bakery art., Thailand
Gallic acid	Analytical reagent grade	Sigma-Aldrich., U.S.A.

Chemical	Grade	Supplier/ Manufacture
L-ascorbic acid	Analytical reagent grade	Fisher Scientific., UK.
L-malic acid	Analytical reagent grade	Fluka., Switzerland.
L-rhamnose	Analytical reagent grade	Fluka., Switzerland.
Maltodextrin	Food grade	CT Laboratory., Thailand.
Methanol	HPLC reagent grade	Fisher Scientific., UK.
Orthophophoric acid	Analytical reagent grade	Ajax Finchem., Australia
Oxalic acid	Analytical reagent grade	Fisher Scientific., UK.
Pectin	Food grade	Danisco., Mexico.
Potassium bromide	Analytical reagent grade	E. Merck., Germany.
Sodium bicarbonate	Food grade	Bakery art., Thailand
Silicon dioxide	Commercial grade	Maxway Co., Ltd., Germany.
Sucrose	Food grade	Bakery art., Thailand
Sodium chloride	Analytical reagent grade	E. Merck., Germany.
Sodium dihydrogen phosphate	Analytical reagent grade	E. Merck., Germany.
Succinic acid	Analytical reagent grade	Ajax Finchem., Australia
Sulfuric acid	Analytical reagent grade	J.T. Baker., U.S.A.
Tartaric acid	Analytical reagent grade	Ajax Finchem., Australia

1.2 ตัวอย่างพืช มะขาม *Tamarindus indica* L. สายพันธุ์ปลูกต่อไปนี้

มะขามสายพันธุ์เปรี้ยวยักษ์ (TI-PY/P) ศรีชมภู (TI-SP/K) ขันตี (TI-K/P) สีทองหนัก (TI-STN/K) สีทองเบา (TI-STB/P) จากไร่ชนิกา ของนายบุญเลิศ พุทธเจริญ 319 หมู่ 9 ต.ซับสมอทอด อ. บึงสามพัน จ. เพชรบูรณ์ มะขามสายพันธุ์เปรี้ยว (TI-PY/K) ศรีชมภู (TI-SP/K) สีทองหนัก (TI-STN/K) จากสวนคุณประนอม คงสมภักตร์ 134 หมู่ 2 ต.โป่งตาลอง อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา

2. วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดอินทรีย์และ polysaccharide ในเนื้อมะขาม

การเตรียมตัวอย่างเนื้อมะขาม

นำตัวอย่างฝักมะขามมาแยกเปลือกและเมล็ดออกจากเนื้อ นำเนื้อมะขามไปอบแห้งด้วยตู้อบเป่าลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ บันทึกน้ำหนักคำนวณค่าความชื้นของเนื้อมะขาม จากนั้นนำเก็บในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาทดลอง

2.1.1 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดอินทรีย์ในตัวอย่างเนื้อมะขาม

2.1.1.1 การเตรียมตัวอย่างมะขาม

1) ชั่งน้ำหนักมะขามสายพันธุ์ละ 75 กรัม
2) เติมน้ำ 200 มิลลิลิตร นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่น จนได้น้ำมะขามที่มีลักษณะข้นและเนื้อมะขามที่บดละเอียด
3) นำน้ำมะขามและกากตะกอนมะขามใส่ในขวดเซนตริฟิวจ์ ทิ้งไว้ข้ามคืน
4) วันรุ่งขึ้น นำน้ำมะขามไปเซนตริฟิวจ์ที่ 6800xg นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส
5) เก็บส่วนน้ำใสครั้งที่ 1 วัดปริมาตร นำส่วนของตะกอนถ่ายใส่บีกเกอร์ เติมน้ำ 150 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน
6) นำบีกเกอร์ที่น้ำมะขามไปแช่ในน้ำเดือด เป็นเวลา 1 ชั่วโมง คนทุกๆ 5 นาที
7) ใส่น้ำ 75 มิลลิลิตร เซนตริฟิวจ์ที่ 6800xg นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส
8) เก็บส่วนน้ำใสครั้งที่ 2 วัดปริมาตร ส่วนของตะกอนแยกเก็บใส่ถุงแช่ในตู้เย็น

9) นำส่วนน้ำใสที่ได้ทั้ง 2 ครั้งมารวมกัน วัดปริมาตร จากนั้นนำไประเหยน้ำออกที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ให้เหลือน้ำมะขามปริมาตรสุทธิ 100 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดอินทรีย์ด้วยวิธี HPLC

2.1.1.2 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดอินทรีย์ในน้ำสกัดเนื้อมะขามด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography: HPLC)

1) สภาวะที่เหมาะสมของการวิเคราะห์ด้วย HPLC (Chromatographic condition)

ใช้คอลัมน์ C18 (Hypersil gold, 5 µm, 250x4.6 mm. i.d.) ซึ่งเป็นคอลัมน์ที่สามารถใช้วิเคราะห์กรดอินทรีย์ชนิดต่างๆได้ ได้แก่ กรดออกซาลิก ทาร์ทาริก มาลิก ซิตริก ฟูมาริก และซักซินิก โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายบัฟเฟอร์ 0.5% $(NH_4)H_2PO_4$, pH=2.6 อัตราการไหล 1 มิลลิลิตร/นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ตรวจวิเคราะห์ด้วย UV detector ที่ 210 นาโนเมตร และใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐานภายใน

2) การเตรียมสารละลายกรดอินทรีย์มาตรฐานและสารมาตรฐานภายใน

เตรียมสารละลายมาตรฐาน stock solution โดยละลายกรดอินทรีย์มาตรฐานและสารมาตรฐานภายในด้วยน้ำ Ultra Pure เตรียมสารละลายตั้งต้นของกรดออกซาลิก (OA) ทาร์ทาริก (TA) มาลิก (L-MA) ซิตริก (CA) ฟูมาลิก (FA) และซักซินิก (SA) มีความเข้มข้นเท่ากับ 6, 40, 40, 10, 2 และ 35 กรัม/ลิตร ตามลำดับ เตรียมสารมาตรฐานภายใน กรดแกลลิก (GA) ให้มีความเข้มข้น 0.8 กรัม/ลิตร จากนั้นปิเปตสารละลายตั้งต้นของกรดออกซาลิก ทาร์ทาริก มาลิก ซิตริก ฟูมาลิก และซักซินิก ปริมาตร 1, 1, 1, 1, 1 และ 2 มิลลิลิตรตามลำดับ ใส่ในขวดวัดปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยเฟสเคลื่อนที่จนมีปริมาตรเท่ากับ 10 มิลลิลิตร สำหรับใช้เป็นสารละลาย standard solution เพื่อการวิเคราะห์สารตัวอย่างต่อไป

3) การยืนยันความถูกต้องสมบูรณ์ของวิธีวิเคราะห์ (Analytical Method Validation) ยืนยันความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ที่ใช้ในการศึกษา ดังนี้

3.1) ความจำเพาะเจาะจง (Specificity)

วิธีวิเคราะห์จะมีความจำเพาะเจาะจงต่อสารที่ต้องการแยกเมื่อค่าการแยก (Resolution) มีค่ามากกว่า 1.5 นำสารละลายผสมของกรดอินทรีย์มาตรฐานและสารมาตรฐานภายในที่เตรียมได้จากข้อ 2.2.2 มาเจือจางด้วยเฟสเคลื่อนที่ให้มีความเข้มข้นของกรดออกซาลิก ทาร์ทาริก มาลิก

ซิตริก ฟูมาลิก ซักซินิก และแกลลิก มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.3, 2, 2, 0.5, 0.005, 3.5 และ 0.04 กรัม/ลิตร ตามลำดับ กรองสารละลายผ่าน nylon syringe filter ที่มีรูพรุนขนาด 0.45 ไมครอน และนำไปฉีดเข้าคอลัมน์ HPLC ในปริมาตร 15 ไมโครลิตร โดยปฏิบัติการภายใต้ภาวะที่เหมาะสม คำนวณค่าการแยก (Resolution) จากสูตร

$$R = 2(t_2-t_1)/(W_2+W_1)$$

เมื่อ R คือ ค่า resolution ระหว่างพีคของกรดอินทรีย์ที่สนใจ (พีคที่2) กับพีคสารที่แยกออกมาก่อน (พีคที่1)

t_2 คือ retention time ของพีคที่2

t_1 คือ retention time ของพีคที่1

W_2 คือ ความสูงของพีคที่ 2

W_1 คือ ความสูงของพีคที่ 1

3. 2) <u>ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (Linearity)</u>

ระหว่างอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคของกรดอินทรีย์มาตรฐานต่อสารมาตรฐานภายใน (Peak area ratio) และความเข้มข้นของกรดอินทรีย์มาตรฐาน เตรียมสารละลายผสมของกรดอินทรีย์มาตรฐานตามตารางข้างล่างนี้ กรองสารละลายผ่าน nylon syringe filter ที่มีรูพรุนขนาด 0.45 ไมครอน และนำไปฉีดเข้าคอลัมน์ HPLC ในปริมาตร 15 ไมโครลิตร โดยปฏิบัติการภายใต้ภาวะที่เหมาะสม ทำการฉีดซ้ำ 3 ครั้งของแต่ละความเข้มข้น concentration 1-5 ตามตารางที่แสดงไว้ นำค่าเฉลี่ยมาสร้างเส้นกราฟความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีค (Peak area ratio) และความเข้มข้นของกรดอินทรีย์มาตรฐาน ใช้ linear regression ในการสร้างสมการเส้นตรง

Standard Mixture	Concentration of organic acid (g/L)						
	OA	TA	L-MA	CA	FA	SA	GA
Concentration 1	0.02	1.00	0.10	0.01	0.0001	0.03	0.04
Concentration 2	0.09	2.25	0.80	0.06	0.0080	0.11	0.04
Concentration 3	0.16	3.50	1.50	0.11	0.0160	0.19	0.04
Concentration 4	0.23	4.75	2.20	0.16	0.0240	0.27	0.04
Concentration 5	0.30	6.00	2.90	0.21	0.0320	0.35	0.04

3.3) ความไวของวิธีวิเคราะห์ (Sensitivity)

ความไวของวิธีวิเคราะห์แสดงถึงค่าความเข้มข้นต่ำสุดของกรดอินทรีย์ที่สามารถวิเคราะห์ได้ถูกต้อง (Limit of Detection, LOD) เตรียมสารละลายผสมของกรดอินทรีย์มาตรฐานของกรดออกซาลิก ทาร์ทาริก มาลิก ซิตริก ฟูมาลิก และซักซินิก ดังข้อ 1. กรองสารละลายผ่าน nylon syringe filter ที่มีรูพรุนขนาด 0.45 ไมครอน และนำไปฉีดเข้าคอลัมน์ HPLC ในปริมาตร 15 ไมโครลิตร โดยปฏิบัติการภายใต้ภาวะที่เหมาะสม โดยทำการฉีดซ้ำ 3 ครั้ง คำนวณค่า LOD ของกรดอินทรีย์แต่ละชนิดดังสูตร

$$LOD\ (ASTM) = C \times (S/N) \times N/H$$

เมื่อ S/N คือ อัตราส่วนระหว่างสัญญาณของกรดอินทรีย์กับสัญญาณรบกวนของเฟสเคลื่อนที่ (signal to noise ratio), S/N = 3.3

C คือ ความเข้มข้นของกรดอินทรีย์

H คือ สัญญาณของกรดอินทรีย์เมื่อทำการวิเคราะห์

N คือ สัญญาณรบกวนของเฟสเคลื่อนที่เมื่อทำการวิเคราะห์

3.4) ความถูกต้องและความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ (Accuracy and Precision)

ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์แสดงด้วยค่าเปอร์เซ็นต์คืนกลับ (% recovery) ส่วนความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ประกอบด้วยความเที่ยงตรงเมื่อวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน (Intra-day precision) และความเที่ยงตรงเมื่อวิเคราะห์ต่างวันกัน (Inter-day precision) ซึ่งแสดงผลในรูปของเปอร์เซ็นต์ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% relative standard deviation, %RSD)

3.4.1) ความถูกต้องและเที่ยงตรงเมื่อวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน (Intra-day accuracy and precision)

ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์แสดงด้วยค่าเปอร์เซ็นต์คืนกลับ (%recovery) โดยใช้สูตร

$$\%\ recovery = (C2 \times 100)/C1$$

เมื่อ C2 คือ ความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ที่วิเคราะห์ได้

C1 คือ ความเข้มข้นของกรดอินทีย์ที่มีอยู่จริง

(1) เตรียมสารละลายน้ำสกัดมะขามที่มีสารมาตรฐานภายในที่ความเข้มข้น 0.04 กรัม/ลิตร โดยเจือจางน้ำสกัดมะขามเข้มข้นของมะขามตัวอย่าง ในอัตราส่วนที่เหมาะสมด้วยเฟสเคลื่อนที่

(2) เตรียมสารละลายเข้มข้นของกรดอินทรีย์มาตรฐานมีกรดออกซาลิก ทาร์ทาริก มาลิก ซิตริก ฟูมาลิก ซักซินิกและแกลลิก ดังแสดงไว้ในตาราง นำมาเตรียมสารละลายผสมกรดอินทรีย์มาตรฐาน 3 ความเข้มข้น

Standard Mixture	Concentration of organic acid (g/L)						
	OA	TA	L-MA	CA	FA	SA	GA
Concentration 1	0.03	1.00	0.39	0.02	0.001	0.04	0.04
Concentration 2	0.09	1.51	0.80	0.07	0.003	0.08	0.04
Concentration 3	0.15	2.00	1.20	0.12	0.005	0.12	0.04

(3) เติม (spiked) สารละลายเข้มข้นของกรดอินทรีย์มาตรฐานจากข้อ (2) ลงในสารละลายน้ำสกัดตัวอย่างมะขามผสมจากข้อ (1) โดยเจือจางน้ำมะขามสกัดเข้มข้นของมะขามตัวอย่างและ spiked ด้วยสารละลายผสมของกรดอินทรีย์

กรองสารละลายที่เตรียมได้จากข้อ (1), (2) และ (3) ผ่าน nylon syringe filter ที่มีรูพรุนขนาด 0.45 ไมครอน และนำไปฉีดเข้าคอลัมน์ HPLC ในปริมาตร 15 ไมโครลิตร โดยปฏิบัติการภายใต้ภาวะที่เหมาะสม ทำการฉีดซ้ำ 3 ครั้ง นำค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ไปคำนวณหาความเข้มข้นของกรดอินทรีย์จากตัวอย่างโดยวิเคราะห์

- ความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ในสารละลายน้ำสกัดมะขาม (C1)
- ความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ในสารละลายผสมของกรดอินทรีย์มาตรฐาน (C2)
- ความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ในสารละลายน้ำสกัดตัวอย่างมะขามที่ spiked ด้วยสารละลายผสมของกรดอินทรีย์มาตรฐาน (C3)

นำค่าความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ในสารละลายที่วิเคราะห์ได้ (C1, C2 และC3) ไปคำนวณหาค่า % recovery จากสูตร

% recovery = (C3)/(C1+C2) x 100

ถ้าค่า recovery ที่คำนวณได้มีค่าอยู่ในช่วง 75-120% แสดงว่า วิธีวิเคราะห์ยอมรับได้ (AOAC, 2002)

3.4.2) ความเที่ยงตรงเมื่อวิเคราะห์ต่างวันกัน (Inter-day precision)

เตรียมสารละลายผสมของกรดอินทรีย์มาตรฐานจำนวน 5 ความเข้มข้น ในช่วงความเข้มข้น 0.05-0.25 กรัม/ลิตร ของกรดออกซาลิก, 1.60-4.00 กรัม/ลิตร ของกรดทาร์ทาริก, 0.70-1.90 กรัม/ลิตร ของกรดมาลิก, 0.075-0.195 กรัม/ลิตร ของกรดซิตริก, 0.003-0.015 กรัม/ลิตร ของกรดฟูมาลิก, 0.09-0.21 กรัม/ลิตร ของกรดซักซินิก และ 0.04 กรัม/ลิตร ของกรดแกลลิก โดยเตรียมความเข้มข้นละ 3 ตัวอย่าง (n=3) กรองสารละลายผ่าน nylon syringe filter ที่มีรูพรุนขนาด 0.45 ไมครอน และนำไปฉีดเข้าคอลัมน์ใน HPLC ปริมาตร 15 ไมโครลิตร โดยปฏิบัติการภายใต้ภาวะที่เหมาะสมของแต่ละวัน เป็นเวลา 3 วัน ติดต่อกันโดยทำการฉีดซ้ำ 3 ครั้ง นำค่าที่วิเคราะห์ได้ไปคำนวณหาความเข้มข้นของกรดอินทรีย์เทียบกับเส้นกราฟมาตรฐาน

4) การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดอินทรีย์ในตัวอย่างน้ำสกัดมะขาม

นำน้ำสกัดมะขามเข้มข้นพันธุ์ปลูก "เปรี้ยวยักษ์" "ขันตี" จากจังหวัดเพชรบูรณ์ และพันธุ์ปลูก "เปรี้ยว" "ศรีชมภู" "สีทองหนัก" จากจังหวัดนครราชสีมา มาเจือจางด้วยเฟสเคลื่อนที่ในอัตราส่วนที่เหมาะสม นำสารละลายตัวอย่างมะขามแต่ละพันธุ์ปลูกมาเติมด้วยสารมาตรฐานภายในให้มีความเข้มข้น 0.04 กรัม/ลิตร กรองสารละลายผ่าน nylon syringe filter ที่มีรูพรุนขนาด 0.45 ไมครอน และนำไปฉีดเข้าคอลัมน์ HPLC ในปริมาตร 15 ไมโครลิตร โดยปฏิบัติการภายใต้ภาวะที่เหมาะสม ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นนำค่าสัดส่วนพื้นที่ใต้พีค (Peak area ratio) ของกรดอินทรีย์มาตรฐานกับสารมาตรฐานภายในที่วิเคราะห์ได้ไปคำนวณหาความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่พบมีอยู่ในน้ำสกัดมะขามโดยเทียบกับเส้นกราฟมาตรฐาน และรายงานค่าที่วิเคราะห์ได้แสดงเป็นค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 10 ส.ค. 255
เลขทะเบียน 245700
เลขเรียกหนังสือ

5) การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในตัวอย่างมะขามด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบจำแนกทางเดียว (One-Way Analysis of Variance, ONE-WAY ANOVA) โดยใช้วิธีการของ Tukey (Tukey's HSD) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS 14.0 ผลการวิเคราะห์แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติขององค์ประกอบทางเคมีระหว่างพันธุ์ปลูกของมะขามที่นำมาศึกษา เมื่อ $p<0.05$

2.1.2 การสกัดพอลิแซ็กคาไรด์และวิเคราะห์สารพอลิแซคคาไรด์จากเนื้อมะขาม

นำเนื้อมะขาม 300 กรัม บดละเอียดมาสกัดในน้ำร้อน ปริมาตร 4 เท่าของน้ำหนักมะขาม ใน water bath ที่อุณหภูมิประมาณ 90 องศาเซลเซียส กวนสารสกัดเป็นระยะๆ นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเซนตริฟิวจ์ที่ 6800xg นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เก็บส่วนน้ำสกัดครั้งที่ 1 นำตะกอนไปต้มสกัดซ้ำตามวิธีดังกล่าว โดยใช้น้ำปริมาตร 1 ใน 4 ของน้ำที่ใช้สกัดครั้งแรก นำไปเซนตริฟิวจ์ เก็บส่วนน้ำสกัดครั้งที่ 2 รวมกับครั้งที่ 1 นำน้ำที่สกัดได้กรองจนได้น้ำใส นำไประเหยน้ำออกที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสที่ความดันต่ำด้วยเครื่องระเหยน้ำ Rotary evaporator (BUCHI R-200) จนได้สารละลายเข้มข้นแล้วนำมาตกตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์ด้วย acid alcohol (4%HCl ใน 75% ethanol) ปริมาตร 3 เท่า และล้างตะกอนด้วย 75%และ95% เอทิลแอลกอฮอล์ ตามลำดับ กรองตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์ นำมาอบที่อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส และบดให้ละเอียด จะได้พอลิแซ็กคาไรด์เป็นผงแห้ง และนำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้ไปวิเคราะห์หาชนิดของน้ำตาลโดยวิธี HPLC

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของ % yield ของการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากเนื้อมะขาม ด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบจำแนกทางเดียว (One-Way Analysis of Variance, ONE-WAY ANOVA) โดยใช้วิธีการของ Tukey (Tukey's HSD) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS 14.0

การวิเคราะห์พอลิแซ็กคาไรด์จากเนื้อมะขาม

2.1.2.1 การวิเคราะห์ FT-IR spectra (Fourier Transform Infrared Spectrometry)

ทำการบดพอลิแซ็กคาไรด์กับผงโพแทสเซียมโบร์ไมด์ (KBr) ที่อบแห้งด้วยอัตราส่วนของโพแทสเซียมโบร์ไมด์:พอลิแซ็กคาไรด์ เท่ากับ 90:10 จนเข้าให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำสาร

ผสมมาอัดเป็นแผ่น transparent disk โดยใช้แรงอัดสูง นำแผ่นตัวอย่างที่อัดได้ใส่ลงไปในเครื่อง FT-IR ทำการสแกนโดยใช้ wave number ในช่วง 4000-450 cm^{-1} สแกน 16 ครั้ง ที่ค่า resolution 4 cm^{-1}

2.1.2.2 <u>การวิเคราะห์องค์ประกอบน้ำตาลของพอลิแซ็กคาไรด์จากเนื้อมะขาม</u>

1. การเตรียมตัวอย่าง

เตรียมสารละลาย acid hydrolyzate ของพอลิแซ็กคาไรด์ของเนื้อมะขามให้มีความเข้มข้น 3% ทิ้งให้สารละลายพองตัวเต็มที่ เติมกรดซัลฟูริก (H_2SO_4) จนสารละลายมีความเข้มข้นสุดท้าย 0.75 M นำไป Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที นำสารละลายที่ได้ไปปรับ pH ให้เป็นกลาง โดยเติมผงแบเรียมไฮดรอกไซด์ทีละน้อยคนจนละลายหมด นำไปปั่นเอาตะกอนแบเรียมซัลเฟตออกด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ที่ 6800xg นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เก็บส่วนน้ำใสของ acid hydrolyzate วัดปริมาตร ทำการระเหยน้ำออก ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้สารละลายมีปริมาตรสุทธิ 10 มิลลิลิตร เก็บตัวอย่างไว้วิเคราะห์หาชนิดของน้ำตาลด้วยเทคนิค HPLC-ELSD และ HPLC-RID เปรียบเทียบค่า retention time เป็นนาทีของน้ำตาลในตัวอย่างกับน้ำตาล standard เช่น น้ำตาลกลูโคส ฟรุกโทส แรมโนส อราบิโนส ไซโลส กาแลกทูโรนิก และกลูคูโรนิก แอซิด

2. การวิเคราะห์หาองค์ประกอบ uronic acid ได้แก่ glucuronic และ galacturonic acid ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (HPLC-RID)

ฉีดสารตัวอย่าง acid hydrolyzate ปริมาตร 20 ไมโครลิตรลงในอะมิโนคอลัมน์ (Carbohydrate NH_2 column, 5 µm, 250x4.6 mm. i.d.) โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายบัฟเฟอร์ NaH_2PO_4, pH=4.6 อัตราการไหล 1.50 มิลลิลิตร/นาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส วิเคราะห์ด้วย Refractive Index Detector (RID) เปรียบเทียบค่า retention time เป็นนาทีของน้ำตาลในตัวอย่างกับน้ำตาล standard galacturonic acid และ glucuronic acid

3. การวิเคราะห์หาองค์ประกอบน้ำตาลด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (HPLC-ELSD)

ฉีดสารตัวอย่าง acid hydrolyzateปริมาตร 5 ไมโครลิตรลงในอะมิโนคอลัมน์ (NH_2 column, 5 µm, 250x4.6 mm. i.d.) ซึ่งเป็นคอลัมน์ที่สามารถใช้วิเคราะห์ชนิดน้ำตาลต่างๆได้ โดย

ใช้เฟสเคลื่อนที่เป็น 90% Acetonitrile ในน้ำ อัตราการไหล 1.90 มิลลิลิตร/นาที ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส วิเคราะห์ด้วย Evaporative Laser Scattering Detector (ELSD) เปรียบเทียบค่า retention time เป็นนาที ของน้ำตาลในตัวอย่างกับน้ำตาล standard ได้แก่ glucose fructose galactose rhamnose arabinose และ xylose

2.2 <u>การสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากเนื้อในเมล็ดมะขาม</u>

นำเนื้อในเมล็ด (Kernel) ของมะขามมาบดให้ละเอียด ด้วยเครื่อง blender และแช่ในน้ำแล้วนำไปโม่ด้วยเครื่องโม่ นำผงเปียกของเมล็ดมะขามที่โม่ได้ไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 60 -70 องศาเซลเซียสจนแห้ง จากนั้นนำไปโม่แบบแห้งด้วยเครื่องโม่ให้เป็นผงอีกครั้งจะได้ Tamarind Kernel Powder (TKP)

ทำการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จาก Tamarind Kernel Powder ด้วยการต้ม TKP 100 กรัม ด้วยน้ำร้อน ปริมาตร 40 เท่าของน้ำหนัก TKP คนเป็นระยะๆ ที่อุณหภูมิ 90-95 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง นำไปเซนตริฟิวจ์ที่ 6800xg นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เก็บน้ำใสครั้งที่ 1 นำตะกอนมาสกัดซ้ำในน้ำร้อน ปริมาตรครึ่งเท่าของน้ำสกัดครั้งแรก ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง นำไปเซนตริฟิวจ์ที่ 6800xg นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เก็บน้ำใสครั้งที่ 2 รวมกับน้ำใสครั้งแรกผสมเข้าด้วยกัน วัดปริมาตร นำน้ำสกัดที่ได้ไประเหยน้ำออกเหลือปริมาณครึ่งหนึ่ง และนำส่วนน้ำเข้มข้นไปตกตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์ใน 95%ของเอทิลแอลกอฮอล์ที่เย็นปริมาตร 1.5 เท่า ได้ตะกอน Tamarind Seed Polysaccharide (TSP) กรองตะกอน TSP ที่ได้ ผ่านผ้าไนลอน นำไปอบที่อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส และบดให้ละเอียด ได้ผง TSP มีลักษณะเป็นผงของแข็งสีขาวขุ่น นำไปละลายน้ำ วัดความหนืด(Brookfield, LVDV-I+, USA) และ ทดสอบคุณลักษณะการไหล โดยใช้เครื่อง Rheometer (Rheowin-RV1, Germany) และนำไปวิเคราะห์หาชนิดของน้ำตาล และนำไปทดลองการใช้ TSP ผสมกับน้ำมะขามในการช่วยเตรียมผงแห้งมะขาม

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของ % yield ของการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากเนื้อในเมล็ดมะขาม ด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบจำแนกทางเดียว (One-Way Analysis of Variance, ONE-WAY ANOVA) โดยใช้วิธีการของ Tukey (Tukey's HSD) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS 14.0

2.2.1 <u>การวิเคราะห์พอลิแซ็กคาไรด์จากเนื้อในเมล็ด (Kernel) มะขาม</u>

การวิเคราะห์องค์ประกอบน้ำตาลของพอลิแซ็กคาไรด์จากเนื้อในเมล็ดมะขาม

1. การเตรียมตัวอย่าง

เตรียมสารละลาย acid hydrolyzate ของพอลิแซ็กคาไรด์ TSP ของเนื้อในเมล็ด(Kernel) มะขามให้มีความเข้มข้น 1 % จากนั้นทำตามวิธี 2.1.2.2 ข้อ 1

2. การวิเคราะห์หาองค์ประกอบน้ำตาลด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (HPLC-ELSD)

ใช้วิธีการเดียวกันกับวิธี 2.1.2.2 ข้อ 3

2.2.2 <u>สมบัติการไหลและความหนืดของพอลิแซ็กคาไรด์ TSP จากเนื้อในเมล็ด (Kernel) มะขาม</u>

ทำการละลายพอลิแซ็กคาไรด์ TSP ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ นำไปทดสอบสมบัติการไหลและวัดความหนืดที่ shear rate 0-6000 1/s ด้วยเครื่อง Rheometer ใช้ sensor ชนิด 35/1 Ti

2.3 <u>การเตรียมผงมะขามด้วยวิธี spray drying</u>

2.3.1 <u>การสกัดน้ำมะขาม</u>

นำเนื้อมะขามพันธุ์ปลูก "เปรี้ยวยักษ์" และ "ขันตี" อย่างละ 60 กรัม เติมน้ำ 500 มิลลิลิตร ปั่นให้ละเอียด นำไปอุ่นในน้ำเดือด 1 ชั่วโมง คนทุกๆ 5 นาที แล้วแช่ทิ้งข้ามคืนในตู้เย็นที่ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปเซนตริฟิวจ์ที่ 6800xg นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เก็บส่วนน้ำใส นำตะกอนไปสกัดซ้ำโดยใช้น้ำ 500 มิลลิลิตร อุ่นในน้ำเดือดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง คนเป็นระยะๆ เซนตริฟิวจ์อีกครั้ง เก็บส่วนน้ำใส ทั้งสองครั้ง มารวมกันวัดปริมาตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้น้ำมะขามปริมาตรสุทธิ 1000 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เตรียมผงมะขามต่อไป

2.3.2 การเตรียมผงมะขาม

สูตรตำรับของผงมะขามประกอบด้วย ingredient ต่างๆ ดังนี้

Ingredients	Function	Content (g)
Tamarind extracted	Main component laxative	30
Tamarind seed polysaccharide (TSP)* or Pectin*	Carrier	5-10
Maltodextrin	Carrier	15-25
Silicon dioxide	Flow aid	0.30
Fructose	Flavor	1.35
Sodium chloride	Flavor	0.45

* สารละลายพอลิแซ็กคาไรด์จากเนื้อในเมล็ดมะขาม หรือ เพคติน นำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 1.02 Kgf/cm^2 นาน 30 นาที

ผสมน้ำมะขามกับสาร พอลิแซ็กคาไรด์ TSP จากเนื้อในเมล็ดมะขามเป็น carrier หรือ เพคติน และ carrier ตัวที่สอง Maltodextrin ให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน และเติมสารช่วยการกระจาย Silicon dioxide และน้ำตาล คนให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำไปทำเป็นผงแห้งด้วยเครื่อง Mini Spray Dryer (Buchi Mini Spray Dryer B-290, Switzerland) โดยกำหนด air inlet 140 องศาเซลเซียส air outlet 80 องศาเซลเซียส aspirator 90 ลูกบาศก์เมตร/ชั่วโมง pump 2.76 มิลลิลิตร/นาที ผงพ่นแห้งมะขามที่ได้นำไปศึกษาลักษณะ particle พื้นผิวภายนอก (particle surface) ด้วยเครื่อง scanning electron microscope

2.4 การศึกษาฤทธิ์การระบายของน้ำมะขามและผลิตภัณฑ์ผงแห้งมะขาม

2.4.1 ศึกษาฤทธิ์ยาระบายของน้ำสกัดมะขามเปรียบเทียบกับ organic acid standard ในหนูขาว (rat)

ศึกษาฤทธิ์ laxative จากน้ำสกัดเนื้อมะขามในหนูขาว (rat) โดยใช้น้ำสกัดเนื้อมะขามความเข้มข้น 20% (w/v) ในน้ำกลั่น แยกกากโดย วิธีกรองด้วยผ้า 2 ชั้น จนได้น้ำค่อนข้างใส นำส่วนน้ำมา

ทดสอบในหนูขาว ดูผลการเป็น laxative โดยดูระยะทางการเคลื่อนที่ของ charcoal ที่ไปได้ไกลกว่ากลุ่ม control ในลำไส้เล็กหนูโดยใช้น้ำกลั่นเป็น control และน้ำลูกพรุนเป็น positive control

ตัวอย่างมะขาม

มะขามสุกสายพันธุ์เปรี้ยวยักษ์ มะขามหวานขันตี ศรีชมพู สีทองเบา และสีทองหนัก

สัตว์ทดลอง

หนูขาว (Sprague-Dawley) เพศผู้ อายุ 7-8 สัปดาห์ น้ำหนัก 200-260 กรัม จำนวน 102 ตัว แบ่งเป็น 17 กลุ่ม กลุ่มละ 6 ตัว

วิธีทดลอง

ดัดแปลงจากแบบทดสอบการเคลื่อนที่ของทางเดินอาหาร (Gastrointestinal motility test) ของ Vankatesan *et al.* (2005)

1. อดอาหารหนูก่อนทดลอง 16-18 ชม.
2. หนูทุกตัวจะได้รับการทดสอบโดยการป้อนทางปากโดยใช้เข็มป้อน (feeding needle) โดยหนูทุกตัวจะได้รับสารแต่ละชนิดในปริมาตร 10 มิลลิลิตร/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม
3. แบ่งหนูเป็นกลุ่มต่างๆ ดังนี้
    a. หนูกลุ่มที่ 1 ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม จะได้รับน้ำกลั่น
    b. หนูกลุ่มที่ 2 จะได้รับน้ำลูกพรุน ขนาด 8.4 มิลลิลิตร/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ซึ่งเป็น 10 เท่าของขนาดที่คนน้ำหนัก 50 กก. รับประทาน (ปกติคนรับประทานน้ำลูกพรุน 1 ขวดในขนาด 42 มล.)
    c. หนูกลุ่มที่ 3, 5 และ 7 จะได้รับ tartaric acid, citric acid หรือ malic acid ในขนาด 10 มิลลิลิตร/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ตามลำดับ
    d. หนูกลุ่มที่ 4, 6 และ 8 จะได้รับ tartaric acid, citric acid หรือ malic acid ในขนาด 100 มิลลิลิตร/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ตามลำดับ
    e. หนูกลุ่มที่ 9-13 จะได้รับน้ำมะขามพันธุ์ต่างๆ ในขนาด 2 มิลลิลิตร/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (ความเข้มข้นเท่ากับน้ำมะขาม 20% w/v)
    f. หนูกลุ่มที่ 14 และ 15 จะได้รับน้ำมะขามเปรี้ยวยักษ์ ในขนาด 8 และ 10 มิลลิลิตร/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ตามลำดับ

g. หนูกลุ่มที่ 16 และ 17 จะได้รับน้ำมะขามขันตี ในขนาด 8 และ 10 มิลลิลิตร/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ตามลำดับ

4. หลังจากนั้น 30 นาที หนูทุกตัวจะได้รับ 3% suspension ของผงถ่านใน 0.5% carboxymethylcellulose โดยแต่ละตัวจะได้รับในปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยใช้เข็มป้อนทางปาก
5. หลังจากทิ้งไว้ 15 นาที หนูทุกตัวจะถูกทำการุณยฆาตโดยใช้ยาสลบอีเทอร์
6. ตัดลำไส้ตั้งแต่ pylorus จนถึง caecum แล้ววัดระยะการเคลื่อนที่ของผงถ่านจาก pylorus เพื่อเปรียบเทียบระยะทางที่ผงถ่านเคลื่อนที่ไปได้ของหนูแต่ละกลุ่ม

2.4.2 <u>การทดลองผลของมะขามต่อ isolated rat ileum ของหนูขาว (Madeira *et al.*, 2002)</u>

<u>สัตว์ทดลอง</u>

หนูขาว (Sprague-Dawley) เพศผู้ อายุ 7-8 สัปดาห์ น้ำหนัก 200-260 กรัม

<u>วิธีทดลอง</u>

1. อดอาหารหนูก่อนทดลอง 16-18 ชม.
2. ฆ่าหนูแล้วทำการแยก ileum ออกมาแช่ใน Tyrode's solution จากนั้นทำการแยก connective tissue ออกแล้วตัด ileum ออกเป็นชิ้นยาวประมาณ 1 ซม.
3. นำ tissue ที่ได้ไปแขวนไว้ใน chamber ที่บรรจุ Tyrode's solution โดยปลายข้างหนึ่งต่อเข้ากับ force transducer ซึ่งต่อกับเครื่อง polygraph โดยมี tension 0.5 กรัม
4. ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ให้ 95% ออกซิเจนตลอดเวลาที่ทำการศึกษา incubate tissue นาน 30 นาที
5. ทดสอบการตอบสนองของ tissue ด้วย acetylcholine ขนาด 20 ng/ml bath จากนั้นล้าง tissue ด้วย Tyrode's solution
6. หยดน้ำมะขามพันธุ์ที่ต้องการทดสอบในปริมาตรที่ทำให้เกิดการตอบสนองของ tissue
7. สังเกตผลของน้ำมะขามต่อการหดตัวของ tissue ที่เกิดขึ้น จากนั้นล้าง tissue ด้วย Tyrode's solution

8. หยดน้ำเกลือในปริมาตรที่เท่ากับปริมาตรของน้ำมะขามที่ทำให้เกิดการตอบสนองของ tissue สังเกตผลที่เกิดขึ้น

2.4.3 <u>การศึกษาผลของส่วนผสมของกรดอินทรีย์สามชนิดหลักที่พบในน้ำมะขามต่อการเคลื่อนที่ของผงถ่านในลำไส้หนูขาว</u>

<u>สัตว์ทดลอง</u>

หนูขาว (Sprague-Dawley) ตัวผู้ อายุ 7-8 สัปดาห์ น้ำหนัก 270-310 กรัม จำนวน 36 ตัว แบ่งเป็น 6 กลุ่ม กลุ่มละ 6 ตัว

<u>วิธีทดลอง</u>

ดัดแปลงจาก แบบทดสอบการเคลื่อนไหวของทางเดินอาหาร (Gastrointestinal motility test) ของ Vankatesan *et al* (2005)

1. อดอาหารหนูก่อนทดลอง 16-18 ชม.
2. หนูทุกตัวจะได้รับสารทดสอบทางปากโดยใช้เข็มป้อน (feeding needle) โดยหนูทุกตัวจะได้รับสารแต่ละชนิดในปริมาตร 10 มิลลิลิตร/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม
3. แบ่งหนูเป็นกลุ่มต่างๆดังนี้
   a. หนูกลุ่มที่ 1 ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม จะได้รับน้ำกลั่น
   b. หนูกลุ่มที่ 2 จะได้รับน้ำลูกพรุน ขนาด 8.4 มิลลิลิตร/น้ำหนักตัว1 กิโลกรัม ซึ่งเป็น10 เท่าของขนาดที่คนน้ำหนัก 50 กก. รับประทาน (ปกติคนรับประทานน้ำลูกพรุน 1 ขวด ในขนาด 42 มล.)
   c. หนูกลุ่มที่ 3-6 จะได้รับส่วนผสมของกรด 3 ชนิดที่พบในมะขามพันธุ์เปรี้ยวยักษ์และขันตี (ตามสัดส่วนที่ได้จากการวิเคราะห์ปริมาณในตัวอย่างมะขาม 2 ชุด)

- จากผลวิเคราะห์ ตัวอย่างชุดที่ 1 น้ำมะขาม 70 % w/v

Tamarind cultivar	Organic acid		
	Oxalic acid (mg/ml)	Tartaric acid (mg/ml)	Malic acid (mg/ml)
มะขามเปรี้ยวยักษ์ (TI-PY/P)	0.86	161.43	3.51
ขันตี (TI-K/P)	0.68	18.37	8.66

- จากผลวิเคราะห์ ตัวอย่างชุดที่ 2 น้ำมะขาม 30 % w/v

Tamarind cultivar	Organic acid		
	Oxalic acid (mg/ml)	Tartaric acid (mg/ml)	Malic acid (mg/ml)
มะขามเปรี้ยวยักษ์ (TI-PY/P)	0.352	63.382	0.563
ขันตี (TI-K/P)	0.367	10.124	3.536

โดยให้น้ำมะขามในขนาด 2 มิลลิลิตร/น้ำหนักตัว1 กิโลกรัม จะมีปริมาณกรดอินทรีย์ดังนี้

- เปรี้ยวยักษ์ตามผลการวิเคราะห์ตัวอย่างชุดที่ 1 ประกอบด้วย Oxalic acid + Tartaric acid + Malic acid = 1.72 + 322.86 + 7.02 mg
- เปรี้ยวยักษ์ตามผลการวิเคราะห์ตัวอย่างชุดที่ 2 ประกอบด้วย Oxalic acid + Tartaric acid + Malic acid = 0.704 + 126.764 + 1.126 mg
- ขันตีตามผลการวิเคราะห์ตัวอย่างชุดที่ 1 ประกอบด้วย Oxalic acid + Tartaric acid + Malic acid = 1.36 + 36.74 + 17.32 mg
- ขันตีตามผลการวิเคราะห์ตัวอย่างชุดที่ 2 ประกอบด้วย Oxalic acid + Tartaric acid + Malic acid = 0.734 + 20.248 + 7.072 mg

4. หลังจากนั้น 30 นาที หนูทุกตัวจะได้รับ 3% suspension ของผงถ่านใน 0.5% carboxymethylcellulose โดยแต่ละตัวจะได้รับในปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยใช้เข็มป้อน
5. หลังจากทิ้งไว้ 15 นาที หนูทุกตัวจะถูกทำการุณยฆาตโดยใช้ยาสลบอีเทอร์
6. ตัดลำไส้เล็กตั้งแต่ pylorus จนถึง caecum แล้ววัดระยะการเคลื่อนที่ของผงถ่านจาก pylorus เพื่อเปรียบเทียบระยะทางที่ผงถ่านเคลื่อนที่ไปได้ของหนูแต่ละกลุ่ม

2.4.4 <u>การศึกษาฤทธิ์ของน้ำมะขามพันธุ์ต่างๆ ในการเพิ่มการเคลื่อนที่ของลำไส้ของหนูขาว</u>

<u>ตัวอย่างน้ำมะขาม</u>

การเตรียมน้ำสกัดเนื้อมะขาม โดยใช้น้ำสกัดเนื้อมะขามความเข้มข้น 20% (w/v) ในน้ำกลั่น แยกกากโดยวิธี centrifuge ที่ 1700xg ที่ 4 °C นาน 20 นาที แยกส่วยน้ำใสมาทดสอบในหนูขาว ตัวอย่างมะขามที่ทดสอบได้แก่ มะขามเปรี้ยวยักษ์ มะขามหวานขันตี มะขามศรีชมพู มะขามสีทองหนักและสีทองเบา จากจังหวัดเพชรบูรณ์

<u>สัตว์ทดลอง</u>

หนูขาว (Sprague-Dawley) ตัวผู้ น้ำหนัก 230-400 กรัม จำนวน 36 ตัว แบ่งเป็น 7 กลุ่ม กลุ่มละ 6 ตัว

<u>วิธีทดลอง</u>

ดัดแปลงจาก แบบทดสอบการเคลื่อนไหวของทางเดินอาหาร (Gastrointestinal motility test) ของ Vankatesan *et al.* (2005)

1. อดอาหารหนูก่อนทดลอง 16-18 ชม.
2. หนูทุกตัวจะได้รับสารทดสอบทางปากโดยใช้เข็มป้อน (feeding needle) โดยหนูทุกตัวจะได้รับสารแต่ละชนิดในปริมาตร 10 มิลลิลิตร/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม
3. แบ่งหนูเป็นกลุ่มต่างๆดังนี้
    a. หนูกลุ่มที่ 1 ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม จะได้รับน้ำกลั่น
    b. หนูกลุ่มที่ 2 จะได้รับน้ำลูกพรุน ขนาด 8.4 มิลลิลิตร/น้ำหนักตัว1 กิโลกรัม ซึ่งเป็น10 เท่าของขนาดที่คนน้ำหนัก 50 กก. รับประทาน (ปกติคนรับประทานน้ำลูกพรุน 1 ขวด ในขนาด 42 มล.)

c. หนูกลุ่มที่ 3-7 จะได้รับน้ำมะขามพันธุ์ต่างๆ ในขนาด 2 มิลลิลิตร/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม

4. หลังจากนั้น 30 นาที หนูทุกตัวจะได้รับ 3% suspension ของผงถ่านใน 0.5% carboxymethylcellulose โดยแต่ละตัวจะได้รับในปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยใช้เข็มป้อนทางปาก
5. หลังจากทิ้งไว้ 15 นาที หนูทุกตัวจะถูกทำการุณยฆาตโดยใช้ยาสลบอีเทอร์
6. ตัดลำไส้เล็กตั้งแต่ pylorus จนถึง caecum แล้ววัดระยะการเคลื่อนที่ของผงถ่านจาก pylorus เพื่อเปรียบเทียบระยะทางที่ผงถ่านเคลื่อนที่ไปได้ของหนูแต่ละกลุ่ม

2.4.5 <u>การศึกษาฤทธิ์ของผลิตภัณฑ์ผงแห้งมะขามที่พัฒนาสำหรับใช้เป็นผลิตภัณฑ์มะขาม เพื่อเป็น laxative ในสัตว์ทดลองหนูขาว</u>

<u>สัตว์ทดลอง</u>

หนูขาว (Sprague-Dawley) ตัวผู้ น้ำหนัก 200-320 กรัม จำนวน 30 ตัว แบ่งเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มละ 6 ตัว

<u>ผลิตภัณฑ์ผงแห้งมะขาม</u>

ผลิตภัณฑ์ผงแห้งมะขาม เตรียมจากมะขามพันธุ์เปรี้ยวยักษ์ผสมกับมะขามหวานขันตี 1: 1 (มีประมาณรวมเนื้อมะขามคิดเป็น 50% ของผงแห้งมะขาม) โดยมี polysaccharide pectin และ maltodextrin เป็น carrier โดยวิธี spray dried ได้ผลิตภัณฑ์ No.13 ทำมาทดสอบฤทธิ์ยาระบายในหนูขาว

<u>วิธีทดลอง</u>

ดัดแปลงจาก แบบทดสอบการเคลื่อนไหวของทางเดินอาหาร (Gastrointestinal motility test) ของ Vankatesan *et al.* (2005)

1. อดอาหารหนูก่อนทดลอง 16-18 ชม.
2. หนูทุกตัวจะได้รับสารทดสอบทางปากโดยใช้เข็มป้อน (feeding needle) โดยหนูทุกตัวจะได้รับสารแต่ละชนิดในปริมาตร 10 มิลลิลิตร/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม
3. แบ่งหนูเป็นกลุ่มต่างๆดังนี้

a. หนูกลุ่มที่ 1 ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม จะได้รับน้ำกลั่น

b. หนูกลุ่มที่ 2 จะได้รับน้ำลูกพรุน ขนาด 8.4 มิลลิลิตร/น้ำหนักตัว1 กิโลกรัม ซึ่งเป็น10 เท่าของขนาดที่คนน้ำหนัก 50 กก. รับประทาน (ปกติคนรับประทานน้ำลูกพรุน 1 ขวด ในขนาด 42 มล.)

c. หนูกลุ่มที่ 3-5 จะได้รับผลิตภัณฑ์มะขาม (เทียบเท่าน้ำมะขาม 8, 4 และ 2 มล/กก ตามลำดับ) ในขนาด 4.9689, 2.4840 และ 1.2420 กรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ตามลำดับ

4. หลังจากนั้น 30 นาที หนูทุกตัวจะได้รับ 3% suspension ของผงถ่านใน 0.5% carboxymethylcellulose โดยแต่ละตัวจะได้รับในปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยใช้เข็มป้อน

5. หลังจากทิ้งไว้ 15 นาที หนูทุกตัวจะถูกทำการุณยฆาตโดยใช้ยาสลบอีเทอร์

6. ตัดลำไส้เล็กตั้งแต่ pylorus จนถึง caecum แล้ววัดระยะการเคลื่อนที่ของผงถ่านจาก pylorus เพื่อเปรียบเทียบระยะทางที่ผงถ่านเคลื่อนที่ไปได้ของหนูแต่ละกลุ่ม

2.5 การเตรียมผลิตภัณฑ์มะขามผงฟู่และเยลลี่จากมะขาม

2.5.1 การเตรียมน้ำมะขามเข้มข้นเพื่อนำไปทำแห้งแบบพ่น

ในการวิจัยนี้เลือกใช้มะขามเปรี้ยว จากจังหวัดนครราชสีมา (โคราช) *Tamarindus indica* L. , "Priao" (TI-P/K) เป็นวัตถุดิบในสกัดน้ำมะขาม

ขั้นตอนการเตรียมน้ำมะขามเข้มข้น

2.5.1.1 นำมะขามแกะเปลือก แยกรก เมล็ด และสิ่งแปลกปลอมต่างๆ ออก

2.5.1.2 สกัดมะขามด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิเริ่มต้น 80 องศาเซลเซียส ในอัตราส่วนน้ำหนักมะขามต่อน้ำที่ใช้สกัดทั้งหมด 1:5 โดยแบ่งน้ำเป็น 4 ส่วน แบ่งสกัด 4 รอบ ดังนี้

รอบที่ 1 ใช้น้ำส่วนที่ 1 แช่มะขามเปียกประมาณ 1 ชั่วโมง คนทุกๆ 10 นาที คั้นและกรองด้วยตะแกรงหยาบ

รอบที่ 2 ใช้น้ำส่วนที่ 2 แช่กากมะขามที่เหลือจากการสกัดรอบที่ 1 และสกัดเช่นเดียวกับรอบที่ 1

<u>รอบที่ 3</u> ใช้น้ำส่วนที่ 3 แช่กากมะขามที่เหลือจากการสกัดรอบที่ 2 และสกัดเช่นเดียวกับรอบที่ 1

<u>รอบที่ 4</u> นำน้ำมะขามที่สกัดได้จากการสกัดรอบที่1 2 และ 3 รวมกัน แล้วกรองผ่านถุงผ้าดิบ นำกากที่เหลือในถุงผ้าดิบ มาสกัดด้วยน้ำส่วนที่ 4 สกัดเช่นเดียวกับรอบที่ 1 แล้วกรองผ่านถุงผ้าดิบอีกครั้ง

2.5.1.3 รวมน้ำมะขามที่สกัดได้จากข้อ 2.5.1.2 นำน้ำมะขามไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำเฉพาะส่วนใสของน้ำมะขามมาทำให้เข้มข้นด้วยเครื่องระเหยแบบหมุนภายใต้ความดันต่ำ (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส หมุนด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาที จนเหลือน้ำหนักน้ำมะขามเข้มข้น 1/5 ของน้ำหนักน้ำที่ใช้สกัดเริ่มต้น

2.5.2 <u>ประเมินคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของน้ำมะขามเข้มข้น</u>

นำน้ำมะขามเข้มข้นจากข้อ 2.5.1.3 มาประเมินคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีดังนี้

2.5.2.1 ลักษณะทางกายภาพ

1. สังเกตสีด้วยตาเปล่าและดมกลิ่น
2. วัดค่าสีของน้ำมะขามเข้มข้นด้วยเครื่องวัดสี Minolta Chromameter โดย การวัดสีดังกล่าวใช้ระบบสีของฮันเตอร์ (Hunter Color System) ประกอบ ด้วย ตัวแปรของสี 3 ตัว คือ L*, a* และ b*ซึ่งมีความหมายดังนี้

L* คือค่าความสว่างของสี ซึ่งมีค่าจาก 0 คือสีดำ จนถึง 100 คือสีขาว

a* คือค่าที่บ่งบอกความเป็นสีเขียวและสีแดง ที่อยู่ในตัวอย่าง โดยค่า a+ แสดงถึงความเป็นสีแดง และค่า a- แสดงความเป็นสีเขียว

b* คือค่าที่บ่งบอกความเป็นสีเหลืองและสีน้ำเงิน ที่อยู่ในตัวอย่าง โดยค่า b+ แสดงถึงความเป็นสีเหลือง และค่า b- แสดงความเป็นสีน้ำเงิน

2.5.2.2 ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด(total soluble solid) โดยใช้เครื่องรีแฟคโตมิเตอร์ (hand refractometer)

2.5.2.3 ความเป็นกรดด่าง (pH) โดยใช้เครื่องพีเอชมิเตอร์ (pH meter)

2.5.2.4 ปริมาณกรดทาร์ทาริกโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography: HPLC) (Gomis, 1992; Zhanguo, 2002; ขวัญเรือน ยิ้มพิมพ์ใจ, 2548; คัทลียา ลีวงศ์พันธ์ และนลินา เล้าเรืองศิลป์ชัย, 2547; จันคนา บูรณะโอสถ, 2536; ดวงสมร ลิมปิติ, 2545;วิโรจน์ ชัยพรโภคิน, 2008) วิเคราะห์หาปริมาณกรด tartaric ในน้ำมะขาม โดยนำค่าสัดส่วนพื้นที่ใต้ยอดแหลมของกราฟ จาก HPLC chromatogram ของกรดทาร์ทาริกในน้ำมะขามเข้มข้นกับสารมาตรฐาน ภายใน (internal standard) มาคำนวณหาความเข้มข้นของกรดทาร์ทาริกที่มีอยู่ในน้ำมะขามเข้มข้น โดยเทียบกับเส้นกราฟมาตรฐาน โดยการวิเคราะห์ใช้ระบบดังนี้

- คอลัมน์ (column) : C18 (Hypersil gold, 5 micron,250 mm x 4.6 mm)
- เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) : 0.5 Ammoniumdihydrogenphosphate pH 2.6
- ความยาวคลื่นที่ใช้ตรวจสอบ(detector wavelength) : 210 นาโนเมตร (UV Detector)
- อัตราการไหล (flow rate) : 1 มิลลิลิตรต่อนาที
- อุณหภูมิในการฉีดสาร (temperature) : 25 องศาเซลเซียส
- สารมาตรฐานภายใน (internal standard) : กรดแกลลิก (gallic acid)

เจือจางน้ำมะขามที่สกัดได้ ด้วยเฟสเคลื่อนที่ในสัดส่วนที่เหมาะสม และเติมสารมาตรฐานภายใน (gallic acid) ความเข้มข้น 0.04 g/L กรองผ่าน nylon syring filter (0.45µm) และฉีดตัวอย่างปริมาตร 15 µl เข้า HPLC column ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

2.5.3 <u>การผลิตผงมะขาม โดยใช้เครื่องทำแห้งแบบพ่น (spray dryer)</u>

2.5.3.1 สภาวะในการทำแห้งแบบพ่นและการเตรียมตัวอย่าง (วีรวิทย์ ปองเปี่ยม, 2547; สุนทรี วราอุบล, 2537; สุเมธ ตันตระเธียร และคณะ, 2548)

นำน้ำมะขามเข้มข้นที่ได้จากข้อ 2.5.1 มาเติมมอลโตเด็กซ์ตรินปริมาณร้อยละ 10 20 30 และ 40 ของน้ำหนักน้ำมะขามเข้มข้นเริ่มต้น ทำให้แห้งเป็นผงมะขามด้วยเครื่องทำแห้งแบบพ่น (spray dryer) ที่อุณหภูมิลมเข้า 130 องศาเซลเซียส อุณหภูมิลมออก 90 องศา

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

เซลเซียส อัตราการป้อนสารเข้าเครื่อง 3 มิลลิลิตรต่อนาที ความดัน 6 บาร์ อุณหภูมิตัวอย่าง 80 องศาเซลเซียส

2.5.3.2 ประเมินคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของผงมะขามที่ได้จากการพ่นแห้ง

นำผงมะขามที่ได้จากข้อ 2.5.3.1 มาประเมินคุณสมบัติทางกายภาพ ดังนี้

1. ลักษณะทางกายภาพ (ขวัญตา ณัฐชยางกุล, 2546; เพียง อุดมเกียรติกุล, 2534; วีรวิทย์ ปองเปี่ยม, 2547)
   - สังเกตสีด้วยตาเปล่าและดมกลิ่น
   - วัดค่าสีของน้ำมะขามเข้มข้นด้วยเครื่องวัดสี Minolta Chromameter
2. ลักษณะผงมะขาม สังเกตขนาด การเกาะตัว ตำแหน่งของผงในเครื่องทำแห้งแบบพ่น
3. การละลายน้ำของผงมะขาม (สุนทรี วราอุบล, 2537; วีระวิทย์ ปองเปี่ยม, 2547)
   - เวลาในการละลายน้ำที่อุณหภูมิห้องและที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส โดยชั่งผงมะขาม น้ำหนัก 1 กรัม ละลายในน้ำอุณหภูมิห้องและอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสปริมาตร 10 มิลลิลิตร กวนให้ละลายโดยใช้เครื่อง magnetic stirrer สังเกตด้วยตาจนผงมะขามละลายหมด บันทึกเวลาที่ผงมะขาม ละลายหมด
   - ค่าการละลาย ทำการศึกษาโดยวัดในรูปของร้อยละของปริมาณของแข็งที่ไม่ละลาย (% insoluble solid) โดยชั่งผงมะขาม 1 กรัม ให้ทราบน้ำหนัก เติมลงในน้ำเดือด 10 มิลลิลิตร คนให้ทั่วเป็นเวลา 30 วินาที กรองขณะร้อนผ่านกระดาษกรองวัตแมนเบอร์ 41 ซึ่งอบที่อุณหภูมิ 100 ± 2 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่แล้ว ใช้เครื่องดูดสุญญากาศช่วยกรองล้างตะกอนที่ค้างอยู่บนกระดาษกรองด้วย น้ำร้อนอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จนกระทั่งไม่มีน้ำตาลเหลืออยู่ ซึ่งทดสอบโดยวิธีของโมลิช (Molisch) โดยนำน้ำล้างตะกอน 2 มิลลิลิตร เติมสารละลายแอลฟาแนฟทอล (α-naphthol) ในเอทานอลร้อยละ 5 จำนวน 2 หยด เขย่า แล้วค่อยๆ รินกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1 มิลลิลิตร ลงที่ข้างๆ ด้านในของหลอดทดลอง จะต้องไม่เกิดวงแหวนสีม่วงแล้วนำกระดาษกรองพร้อมส่วนที่ไม่ละลายไปอบให้แห้งในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 100 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็นในเดซิกเคเตอร์

จนถึงอุณหภูมิห้องแล้วนำไปชั่งคำนวนค่าการละลายในรูปของร้อยละของปริมาณของแข็งที่ไม่ละลาย โดย

$$\% \text{ insoluble solid} = \frac{(A_1-A_2)}{A_3} \times 100$$

A_1 = น้ำหนักของกระดาษกรองหลังอบ

A_2 = น้ำหนักของกระดาษกรองก่อนอบ

A_3 = น้ำหนักผงมะขาม

4. ร้อยละของน้ำหนักผงมะขามที่ผลิตได้ (% yield)

นำผงมะขามที่ได้จากการทำแห้งแบบพ่นมาคำนวณน้ำหนักโดยคิดเป็นร้อยละของน้ำหนักผงมะขามที่ผลิตได้ คำนวณโดย

$$\% \text{ yield} = \frac{\text{น้ำหนักผงมะขาม}}{(\text{น้ำหนักน้ำมะขามเข้มข้น} + \text{น้ำหนักมอลโตเด็กซ์ตริน})} \times 100$$

2.5.3.3 ประเมินคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของผงมะขามที่มีลักษณะทางกายภาพที่ดีที่สุด

คัดเลือกผงมะขามที่มีลักษณะทางกายภาพที่ดีที่สุดจากการประเมินในข้อ 2.5.3.2 มาวิเคราะห์เพิ่มเติมได้แก่

1. ปริมาณความชื้นโดยใช้เครื่องวิเคราะห์ความชื้น (moisture balance)
2. ความเป็นกรดด่าง (pH) โดยละลายผงมะขาม 1 กรัมในน้ำ 10 มิลลิลิตร วัดโดยใช้เครื่องพีเอชมิเตอร์ (pH meter)
3. ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (total soluble solid) โดยละลายผงมะขาม 1 กรัม ในน้ำ 10 มิลลิลิตร โดยใช้เครื่องรีแฟคโตมิเตอร์
4. ปริมาณกรดทาร์ทาริกโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography, HPLC)

2.5.3.4 การศึกษาความคงตัวของผงมะขาม

1. คัดเลือกผงมะขามที่มีคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีที่ดีที่สุดจากข้อ 2.5.3.2 มาศึกษาความคงตัวของผงมะขาม เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องและที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน
2. ประเมินคุณสมบัติทางกายภาพ เคมี ของผงมะขาม ในช่วงเวลา 0, 7, 15 และ 30 วัน เช่นเดียวกับในข้อ 2.5.3.2 และ 2.5.3.3
3. วิเคราะห์ด้านจุลชีววิทยาของผงมะขามผง ในช่วงเวลา 0, 7 15 และ 30 วัน ดังนี้ (รายละเอียดและวิธีวิเคราะห์อยู่ในภาคผนวก 8)
   - การวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (total plate count)
   - การวิเคราะห์จำนวนยีสต์และรา (yeast and mold count)
   - การวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมด (total coliform) และ *Escherichia coli*
   - การวิเคราะห์ *Staphylococcus aureus*

2.5.4 <u>การพัฒนาเครื่องดื่มมะขามผงฟู่จากผงมะขามที่ได้จากการพ่นแห้ง</u>

2.5.4.1 ศึกษาหาสัดส่วนที่เหมาะสมของสารก่อฟอง (พรศักดิ์ ศรีอมรศักดิ์, 2547; Macewan, 1953; The United States Pharmacopoeia, 2005)

นำผงมะขามที่มีลักษณะทางกายภาพที่ดีที่สุดจากข้อ 2.5.3.2 มาพัฒนาสูตรเครื่องดื่มมะขามผงฟู่ โดยปรับสัดส่วนของสารก่อฟองฟู่ ได้แก่ โซเดียมไบคาร์บอเนต และกรดซิตริก โดยแบ่งการทดลองเป็น 4 สูตร แต่ละสูตรประกอบด้วยส่วนประกอบดังตารางต่อไปนี้

ตารางแสดง ส่วนประกอบของสูตรเครื่องดื่มมะขามผงฟู่ที่ปรับสัดส่วนของสารก่อฟองฟู่

ส่วนประกอบ	สูตร 1 (กรัม)	สูตร 2 (กรัม)	สูตร 3 (กรัม)	สูตร 4 (กรัม)
ผงมะขาม	3.75	3.75	3.75	3.75
โซเดียมไบคาร์บอเนต	0.13	0.26	0.39	0.52
กรดซิตริก	0.10	0.20	0.30	0.40
น้ำตาลซูโครส	4.00	4.00	4.00	4.00
โซเดียมคลอไรด์ (เกลือ)	0.13	0.13	0.13	0.13

2.5.4.2 ขั้นตอนการเตรียมเครื่องดื่มมะขามผงฟู่

1. บดส่วนผสมต่างๆให้ละเอียด แล้วชั่งส่วนประกอบต่างๆ ได้แก่ ผงมะขาม โซเดียมไบคาร์บอเนต กรดซิตริก น้ำตาลซูโครส และเกลือ ตามสัดส่วนที่กำหนดในตารางส่วนประกอบ
2. ผสมผงมะขาม กรดซิตริก น้ำตาลซูโครส และเกลือ แบบ geometric dilution
3. เติมโซเดียมไบคาร์บอเนต ลงในส่วนผสมข้อ 2 ผสมให้เข้ากัน
4. บรรจุผงเครื่องดื่มลงในถุงลามิเนตและปิดผนึกแบบสูญญากาศ

2.5.4.3 ประเมินคุณสมบัติของเครื่องดื่มมะขามผงฟู่

ชั่งผงเครื่องดื่มที่ผลิตได้แต่ละสูตรแล้วนำมาละลายในน้ำอุณหภูมิห้องปริมาตร 30 มิลลิลิตร กวนให้ละลายโดยใช้เครื่อง magnetic stirrer กวนเป็นเวลา 5 นาที แล้วประเมินคุณสมบัติดังนี้

1. รสชาติ โดยการชิม
2. ลักษณะฟองที่เกิดขึ้น โดยสังเกตขนาดและสีของฟองที่เกิดขึ้นด้วยตาเปล่า

3. ปริมาณฟองที่เกิดขึ้นในช่วงแรกของการเกิดฟอง โดยการสังเกต
4. ระยะเวลาในการยุบตัวของฟอง โดยจับช่วงเวลาตั้งแต่เกิดจนกระทั่งฟองยุบ

2.5.4.4 พัฒนาสูตรเครื่องดื่มมะขามผงฟู่โดยปรับปรุงความหวานด้วยสารให้ความหวานชนิดต่างๆ

1. ปรับสัดส่วนของสารให้ความหวานแต่ละชนิดโดยเลือกสูตรเครื่องดื่มมะขามผงฟู่ที่ดีที่สุดจากข้อ 2.5.4.3 มาปรับปรุงความหวานด้วยสารให้ความหวานชนิดต่างๆ แทนน้ำตาลซูโครส ได้แก่ น้ำตาลฟรุกโตส และสารให้ความหวานตราสวิซซี่ ซึ่งเป็นวัตถุให้ความหวานแทนน้ำตาล ประกอบด้วย แลกโตส 96.1 % แอสปาร์แตม 1.7 % และ อะซีซัลเฟม เค 1.7 % โดยปรับสัดส่วนของสารให้ความหวานต่างๆ แทนการใช้น้ำตาลซูโครส ในสูตรเครื่องดื่มมะขามผงฟู่ที่เลือกจากข้อ 2.5.4.3 ดังนี้
   - น้ำตาลฟรุกโตส น้ำหนัก 2 3 และ 4 กรัม
   - สารให้ความหวานตราสวิซซี่ 0.15 0.25 และ 0.35
   - น้ำตาลซูโครสผสมกับสารให้ความหวานตราสวิซซี่ใน อัตราส่วน 1 : 0.15 2 : 0.15 และ 3 : 0.15 กรัม
2. ขั้นตอนการเตรียมเครื่องดื่มมะขามผงฟู่
   เตรียมเครื่องดื่มมะขามผงฟู่โดยใช้สารให้ความหวานชนิดต่างๆ ตามสัดส่วนที่กำหนดในข้อ 1 ขั้นตอนการเตรียมเช่นเดียวกับข้อ 2.5.4.2
3. ประเมินคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของเครื่องดื่มมะขามผงฟู่ที่มีการปรับปรุงความหวานด้วยสารให้ความหวานชนิดต่างๆ เช่นเดียวกับข้อ 2.5.4.3

2.5.4.5 คัดเลือกสูตรเครื่องดื่มมะขามผงฟู่ที่เป็นตัวแทนของสูตรเครื่องดื่มที่เตรียมจากสารให้ความหวานแต่ละชนิด

คัดเลือกสูตรเครื่องดื่มมะขามผงฟู่ 5 สูตร ที่เป็นตัวแทนของสูตรเครื่องดื่มที่เตรียมจากสารให้ความหวานแต่ละชนิด ซึ่งมีคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพที่ดีจากการประเมินในข้อ 2.5.4.3 และ 2.5.4.4 ข้อ 3 ดังนี้

1. ตัวแทนของสูตรเครื่องดื่มที่ใช้น้ำตาลซูโครส 2 สูตร เพื่อเป็นตัวแทนของสูตรที่มีความหวานมากและความหวานน้อยอย่างละ 1 สูตร
2. ตัวแทนของสูตรเครื่องดื่มที่ใช้น้ำตาลฟรุกโตส 1 สูตร
3. ตัวแทนของสูตรเครื่องดื่มที่ใช้สารให้ความหวานตราสวิซซี่ 1 สูตร
4. ตัวแทนของสูตรเครื่องดื่มที่ใช้น้ำตาลซูโครสผสมสารให้ความหวานตราสวิซซี่ 1 สูตร

2.5.4.6 ประเมินคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของสูตรเครื่องดื่มที่ถูกคัดเลือก 5 สูตร

1. สีของเครื่องดื่มมะขามผงฟู่เมื่อละลายน้ำแล้ว โดยการสังเกตด้วยตาเปล่าและการวัดโดยใช้เครื่องวัดสี Minolta Chromameter
2. สีของผงเครื่องดื่ม โดยการสังเกตด้วยตาเปล่าและการวัดโดยใช้เครื่องวัดสี Minolta Chromameter
3. ลักษณะของผงของเครื่องดื่ม
4. กลิ่น โดยการดม
5. ความเป็นกรด-ด่าง (pH) โดยใช้เครื่องพีเอชมิเตอร์ (pH meter)
6. ปริมาณความชื้น โดยใช้เครื่องวิเคราะห์ความชื้น (moisture balance)
7. ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (total soluble solid) โดยใช้เครื่องรีแฟคโตมิเตอร์ (hand refractometer)
8. การละลายน้ำที่อุณหภูมิห้องและที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส วิธีการวัดเช่นเดียวกับข้อ 2.5.3.2 ข้อ 3

2.5.4.7 ประเมินความพึงพอใจต่อผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มมะขามผงฟู่

นำเครื่องดื่มมะขามผงฟู่ทั้ง 5 สูตรจากข้อ 2.5.4.5 มาประเมินความพึงพอใจโดยใช้วิธีให้คะแนนการยอมรับของผลิตภัณฑ์ในด้านต่างๆโดยผู้ประเมินกึ่งฝึกฝน 10 ราย ให้คะแนนความชอบต่อผลิตภัณฑ์ ตั้งแต่ 1- 5 โดยคะแนน 1 = ไม่ชอบมากที่สุด และคะแนน 5 = ชอบมากที่สุด ดังนี้

1. สีและลักษณะที่ปรากฏให้เห็นภายนอกของผงเครื่องดื่ม
2. สีและลักษณะที่ปรากฏให้เห็นภายนอกของผงเครื่องดื่มเมื่อละลายน้ำ
3. กลิ่นของผงเครื่องดื่มเมื่อละลายน้ำ
4. รสชาติของเครื่องดื่ม
5. ลักษณะการเกิดฟอง
6. ความชอบโดยรวม

2.5.4.8 การศึกษาความคงตัวของเครื่องดื่มมะขามผงฟู่

1. คัดเลือกเครื่องดื่มมะขามผงฟู่ที่มีคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีที่ดีที่สุดจากข้อ 2.5.4.6 มาศึกษาความคงตัวของเครื่องดื่มมะขามผง เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องและที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน
2. ประเมินคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของเครื่องดื่มมะขามผงฟู่ ในช่วงเวลา 0, 7, 15 และ 30 วัน เช่นเดียวกับข้อ 4.6.2-4.6.7 และวิเคราะห์เพิ่มเติมในด้านปริมาณกรดทาร์ทาริกโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography, HPLC)
3. วิเคราะห์ด้านจุลชีววิทยาของเครื่องดื่มมะขามผงฟู่ ในช่วงเวลา 0, 7, 15 และ 30 วัน เช่นเดียวกับในข้อ 2.5.3.4 ข้อ 3

2.5.5 <u>การพัฒนาเยลลี่จากผงมะขามที่ได้จากการพ่นแห้ง</u>

2.5.5.1 ศึกษาหาสัดส่วนที่เหมาะสมของ น้ำตาลซูโครส ผงมะขาม และเพกติน

นำผงมะขามที่มีลักษณะทางกายภาพที่ดีที่สุดจากข้อ 2.5.3.2 มาพัฒนาสูตรเยลลี่มะขาม โดยปรับสัดส่วนของน้ำตาลซูโครส ผงมะขาม และเพกติน ที่ทำให้เกิดการแข็งตัวของเยลลี่ โดยวางแผนการทดลองแบบ symmetric factorial design ขนาด 3*3*3 จำนวนการทดลองทั้งหมด 27 สูตรทดลอง 2 ซ้ำ โดยปรับเปลี่ยนปริมาณน้ำตาลซูโครส ผงมะขาม และเพกติน ดังนี้

- น้ำตาลซูโครส ร้อยละ 35, 40 และ 45 โดยน้ำหนัก
- ผงมะขาม ร้อยละ 3, 6 และ 9 โดยน้ำหนัก
- เพกติน ร้อยละ 0.8, 1.0 และ 1.2 โดยน้ำหนัก

และเติมเกลือร้อยละ 0.1 และปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำ

2.5.5.2 ขั้นตอนการเตรียมเยลลี่

1. ชั่งส่วนประกอบต่างๆได้แก่ น้ำตาลซูโครส ผงมะขาม เพกติน เกลือ และน้ำ ตามสัดส่วน ที่กำหนด
2. ละลายเพกตินกับน้ำตาลซูโครสบางส่วนในน้ำโดยใช้ magnetic stirrer คนจนเพกตินพองตัวดี
3. เติมน้ำตาลส่วนที่เหลือลงในส่วนสารละลายเพกติน คนจนน้ำตาลละลายหมด
4. เติมผงมะขามลงในส่วนผสมข้อ 2 คนจนผงมะขามละลายหมด
5. ต้มเดือดนาน 10 นาที
6. บรรจุเยลลี่ขณะร้อนลงในภาชนะที่ทำความสะอาดแล้ว ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดเจล ที่อุณหภูมิห้อง 3 ชั่วโมง

2.5.5.3 ประเมินผลการเกิดเจลของเยลลี่

สังเกตจากการแข็งตัวของเยลลี่ที่เตรียมได้ เมื่อตั้งทิ้งไว้ให้เกิดเจลที่อุณหภูมิห้อง 3 ชั่วโมง โดยเอียงภาชนะ ถ้าแข็งตัวตามรูปภาชนะ แสดงว่าเกิดเจล ถ้ามีลักษณะเป็นสารละลายน้ำเชื่อมข้นหนืดไหลตามการเอียง แสดงว่าไม่เกิดเจล

2.6.5.4 ประเมินคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีเฉพาะสูตรเยลลี่ที่เกิดเจล

เลือกเฉพาะสูตรเยลลี่ที่เกิดเจลจากข้อ 2.5.5.3 มาประเมินดังนี้

1. ลักษณะที่ปรากฏโดยสังเกตด้วยตาเปล่า ได้แก่ สี ความใส
2. การไหวตัว ความคงตัว โดยการกดด้วยช้อน
3. รอยตัดด้วยช้อน ใช้ช้อนตัดเยลลี่ สังเกตความเรียบคมของรอยตัด ความคงรูปของรอยตัด การเหนียวติดช้อนของเนื้อเยลลี่
4. ความเป็นกรด-ด่าง (pH) โดยละลายเนื้อเยลลี่ 10 กรัม ในน้ำเดือด 20 มิลลิลิตร วัดโดยใช้เครื่องพีเอชมิเตอร์ (pH meter)
5. ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (total soluble solid) โดยใช้เครื่องรีแฟคโตมิเตอร์ (hand refractometer)
6. ความแข็ง (hardness) โดยใช้เครื่องวัดเนื้อสัมผัส (texture analyzer)

ใช้เครื่องวัดเนื้อสัมผัส (texture analyzer) วัดค่าความแข็งของเจล (hardness) ของเยลลี่ โดยใช้หัว P100 (100 mm. diameter cylinder stainless) วัดลักษณะเนื้อสัมผัสในระบบ TPA ทดลองซ้ำ 3 ครั้ง เตรียมตัวอย่างโดยตัดเยลลี่เป็นชิ้นลูกบาศก์ขนาด 1x1x1 นิ้ว เพื่อใช้ในการทดลอง โดยตั้งค่า parameter ของเครื่องดังนี้

Parameter

Pre test speed	2.0	mm/s
Test speed	2.0	mm/s
Post test speed	2.0	mm/s
Rupture test dish	1%	
Distance	30%	

Trigger

Type	Auto
Force	5 g
Stop plot at final	

2.5.5.5 พัฒนาสูตรเยลลี่โดยปรับปรุงความหวานด้วยน้ำตาลชนิดต่างๆ

1. ปรับสัดส่วนของสารให้ความหวานแต่ละชนิด

เลือกสูตรเยลลี่ที่ดีที่สุดจากข้อ 2.5.5.4 มาปรับปรุงความหวานโดยใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ ได้แก่ น้ำตาลซูโครส น้ำตาลฟรุกโตส โดยปรับสัดส่วนของน้ำตาล ดังนี้

- น้ำตาลฟรุกโตส ในสัดส่วนร้อยละ 50 60 และ 70 ของน้ำหนักน้ำตาลซูโครสที่ใช้ในสูตรที่เลือกจากข้อ 2.5.5.4
- น้ำตาลฟรุกโตสผสมกับน้ำตาลซูโครส ในสัดส่วนร้อยละ 25:37.5 โดยน้ำหนักของน้ำตาลซูโครสที่ใช้ในสูตรที่เลือกจากข้อ 2.5.5.4
- น้ำตาลฟรุกโตสผสมกับน้ำตาลซูโครส ในสัดส่วนร้อยละ 50 :-25 โดยน้ำหนักของน้ำตาลซูโครสที่ใช้ในสูตรที่เลือกจากข้อ 2.5.5.4

2. ขั้นตอนการเตรียมเยลลี่

เตรียมเยลลี่โดยใช้สารให้ความหวานชนิดต่างๆ ตามสัดส่วนจากข้อ 1 โดยขั้นตอนการเตรียมเป็นเช่นเดียวกับข้อ 2.5.5.2 จากนั้นเคี่ยวเยลลี่ให้เดือดจนกระทั่งวัดปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดเท่ากับสูตรเยลลี่ ที่เลือกจากข้อ 2.5.5.4 แล้วบรรจุเยลลี่ขณะร้อนลงในภาชนะตั้งทิ้งไว้ให้เกิดเจล ที่อุณหภูมิห้อง 3 ชั่วโมง

3. ประเมินผลการเกิดเจลของเยลลี่ เช่นเดียวกับข้อ 2.5.5.3

4. ประเมินคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีเช่นเดียวกับข้อ 2.5.5.4 เฉพาะสูตรที่เกิดเจล

2.5.5.6 เลือกสูตรเยลลี่ที่เป็นตัวแทนของสูตรเยลลี่ที่เตรียมจาก สารให้ความหวานแต่ละชนิด

คัดเลือกสูตรเยลลี่ 4 สูตร ที่เป็นตัวแทนของสูตรเยลลี่ที่เตรียมจากสารให้ความหวานแต่ละชนิด ซึ่งมีคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีที่ดีจากการประเมินในข้อ 2.5.5.4 และ 2.5.5.5 ข้อ 4 ดังนี้

1. ตัวแทนของเยลลี่ที่ใช้น้ำตาลซูโครส 2 สูตร เพื่อเป็นตัวแทนของสูตรเยลลี่ที่มีความหวานมากและความหวานน้อยอย่างละ 1 สูตร
2. ตัวแทนของเยลลี่ที่ใช้น้ำตาลฟรุกโตส 1 สูตร
3. ตัวแทนของเยลลี่ที่ใช้น้ำตาลซูโครสผสมน้ำตาลฟรุกโตส 1 สูตร

2.5.5.7 ประเมินคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของเยลลี่ที่ใช้น้ำตาลต่างๆ ดังนี้

1. รสชาติและกลิ่น โดยการชิมและดม
2. ค่าสี โดยใช้เครื่องวัดสี Minolta chromameter
3. ปริมาณกรดทาร์ทาริกโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography, HPLC)

นำเยลลี่ทั้ง 4 สูตรจากข้อ 2.5.5.6 มาประเมินความพึงพอใจโดยใช้วิธีให้คะแนน การยอมรับของผลิตภัณฑ์ในด้านต่างๆ โดยผู้ประเมินกึ่งฝึกฝน 10 ราย ให้คะแนนความชอบต่อผลิตภัณฑ์ ตั้งแต่ 1- 5 โดยคะแนน 1 = ไม่ชอบมากที่สุด และคะแนน 5 = ชอบมากที่สุด ดังนี้

1. สี ลักษณะที่ปรากฏให้เห็นภายนอก
2. กลิ่นของเยลลี่
3. รสชาติของเยลลี่
4. เนื้อสัมผัสขณะรับประทาน
5. รอยตัดเยลลี่ด้วยช้อน
6. ความชอบโดยรวม

2.5.6 <u>การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ</u>

ใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบจำแนกทางเดียว (One-Way Analysis of variance, ONE-WAY ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างคู่ด้วยวิธี Duncan 's Multiple Range Test ผลการวิเคราะห์แสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95