บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัตถุดิบ

เม็ดผักชีป่น (บริษัท ง่วนสูน (1974) เยาวราช จำกัด, ประเทศไทย)
อบเชยป่น (บริษัท ง่วนสูน (1974) เยาวราช จำกัด, ประเทศไทย)
ปาปรีก้าป่น (บริษัท ง่วนสูน (1974) เยาวราช จำกัด, ประเทศไทย)
พริกขี้หนูสวนป่น (บริษัท ง่วนสูน (1974) เยาวราช จำกัด, ประเทศไทย)
พริกไทยดำป่น (บริษัท ง่วนสูน (1974) เยาวราช จำกัด, ประเทศไทย)
พริกไทยขาวป่น (บริษัท ง่วนสูน (1974) เยาวราช จำกัด, ประเทศไทย)
กระเทียมป่น (บริษัท ง่วนสูน (1974) เยาวราช จำกัด, ประเทศไทย)
ยี่หร่าป่น (บริษัท ง่วนสูน (1974) เยาวราช จำกัด, ประเทศไทย)
ตะไคร้ป่น (บริษัท ง่วนสูน (1974) เยาวราช จำกัด, ประเทศไทย)
ข่าป่น (บริษัท ง่วนสูน (1974) เยาวราช จำกัด, ประเทศไทย)
ใบมะกรูดป่น (บริษัท ง่วนสูน (1974) เยาวราช จำกัด, ประเทศไทย)
โปรตีนสกัดจากถั่วเหลือง (บริษัท The Solae Company, USA)
ไข่ขาวผง (บริษัท Food EQ จำกัด, ประเทศไทย)
วอดก้า 40 เปอร์เซ็นต์ (บริษัท Absolut Spirits จำกัด, ประเทศไทย)
เนื้อหมูส่วนสะโพก จากตลาดสดหัวตะเข้ เขตลาดกระบัง 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 สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (บริษัท Shimadzu UV-1601, Japan)
water bath shaker (บริษัท Memmert-WNB 7-45, Germany)

3.3 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

2,2-Diphenyl-l-picryl-hydrazyl (DPPH)	(บริษัท Sigma, USA)
Torlox	(บริษัท Aldrich, Germany)
Sodium carbonate (Na_2CO_3)	(บริษัท Merck, Germany)
Gallic acid	(บริษัท Sigma, Germany)
Hydrochlolic acid (HCl)	(บริษัท Merck, Germany)
Sodium acetate (CH_3COONa)	(บริษัท Merck, Germany)
Iron(III)chloride hexahydrate ($FeCl_3$.6H2O)	(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	

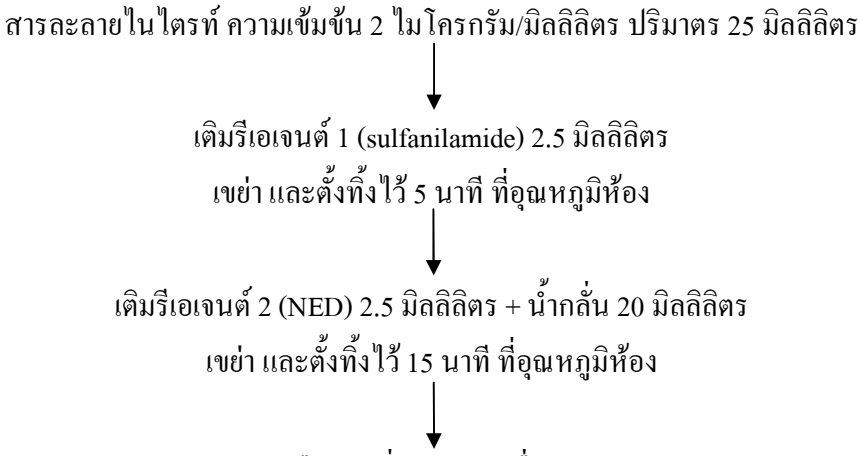
3.4 สถานที่ดำเนินการทดลอง

ห้องปฏิบัติการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.5 วิธีดำเนินงาน

3.5.1 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณไนไตรท์ตกค้าง

การวิเคราะห์ปริมาณไนไตรท์ตกค้างจะวิเคราะห์ด้วยวิธีทางแคลอรีเมตริก (AOAC Official Method 973.31, Nitrites in cured meat, Colorimetric method 2000) และวัดความเข้มสีที่เปลี่ยนแปลงไปของสารละลายหลังเติมรีเอเจนต์ (reagent) ด้วยวิธีทางสเปคโตรโฟโตเมตรี ดังภาพที่ 10 โดยศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณไนไตรท์ตกค้าง 2 ปัจจัย คือ อุณหภูมิและเวลา



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 25, 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 ทำ

การทดลอง 3 ซ้ำ นำค่าเฉลี่ยที่ได้ไปสร้างกราฟระหว่างเวลากับค่าการดูดกลืนแสง เพื่อดูแนวโน้มและเลือกเวลาที่เริ่มทำให้กราฟมีค่าความชันเท่ากับศูนย์ มาเป็นเวลาสำหรับช่วงที่สอง

ในช่วงที่สองนี้จะใช้เวลารอให้รีเอเจนต์ 2 (NED) เกิดปฏิกิริยาเป็น 5, 15, 30, 45 และ60 นาที ทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ นำค่าเฉลี่ยที่ได้ไปสร้างกราฟระหว่างเวลากับค่าการดูกลืนแสง เพื่อดูแนวโน้ม และเลือกเวลาที่เริ่มทำให้กราฟมีค่าความชันเท่ากับศูนย์ มาเป็นเวลาสำหรับการทดลองต่อๆไป

วิเคราะห์ทางสถิติหาความแตกต่างของปัจจัยที่มีผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณไนไตรท์ตกค้างด้วยวิธีทางแคลอรีเมตริก โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Complete Randomized Design, CRD) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธีของดันแคน (Duncan's New Multiple Range Test)

3.5.2 การศึกษาความสามารถด้านการลดปริมาณไนไตรท์ตกค้างของพืชสมุนไพรและส่วนผสมอื่นที่นิยมใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป

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 ดูดส่วนใสมาวิเคราะห์หาความเข้มข้นของโซเดียมไนไตรท์ที่เหลือด้วยวิธีตามข้อ 3.5.1 โดยทำการทดลอง 5 ซ้ำ

3.5.3 การศึกษาสมบัติของสารสกัดอบเชย

3.5.3.1 การเตรียมสารสกัดอบเชย

การเตรียมสารสกัดอบเชยดัดแปลงจากวิธีของ Mathew และ Abraham (2006) โดยนำผงเปลือกอบเชย 40 กรัม แช่ในเอธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 400 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ เขย่าที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายกรองผ่านกระดาษกรอง whatman เบอร์4 ระเหยตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่องระเหยแบบสุญญากาศ (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ความเร็ว 40 รอบ/นาที เป็นเวลา 25 นาที จะได้สารสกัดเริ่มต้น (CE) หนัก 10 กรัม (ลักษณะหนืดเคลือบติดภาชนะ) ซึ่งยากต่อการใช้วิเคราะห์จึงต้องชะสารสกัดเริ่มต้นและปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยเอธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ เป็น 100 มิลลิลิตร เก็บตัวอย่างสารสกัดหลังปรับปริมาตร (CEE) ในขวดสี

ชาที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส นำสารสกัดหลังปรับปริมาตรที่ได้มาทำการวิเคราะห์ตามข้อที่ 3.5.3.2 – 3.5.3.6

3.5.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมด (Total polyphenol contents)

วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดตามวิธีของ ประพันธ์และวันทนีย์ (2545) โดยสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดจะทำปฏิกิริยากับ Folin-Ciocalteu reagent เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงิน ซึ่งสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร และใช้กรดแกลลิคเป็นสารประกอบฟีนอลมาตรฐาน รายงานผลของปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมด ในหน่วยของ มิลลิกรัมกรดแกลลิก/กรัมตัวอย่างแห้ง รายละเอียดการวิเคราะห์แสดงในภาคผนวก ก.

3.5.3.3 การวิเคราะห์ความสามารถในการลดปริมาณไนไตรท์ตกค้างของสารสกัดอบเชย

นำสารสกัดหลังปรับปริมาตร 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายโซเดียม-ไนไตรท์ ความเข้มข้น 200 ppm ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ปิดปากหลอดทดลองด้วยพาราฟิล์ม วางไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน(24 ชั่วโมง) จากนั้นนำมาหมุนเหวี่ยงที่ 9000 รอบ/นาที นาน 15 นาที ดูดส่วนใส่มาวิเคราะห์หาความเข้มข้นของไนไตรท์ที่เหลือตามวิธีข้อ 3.5.1

3.5.3.4 การวิเคราะห์ความสามารถในการทำลายไนตริกออกไซด์ (nitric oxide scavenging)

การวิเคราะห์ความสามารถในการทำลายไนตริกออกไซด์ (nitric oxide scavenging) ตามวิธีของ Govindarajan และคณะ (2003) รายละเอียดการวิเคราะห์แสดงในภาคผนวก ก.

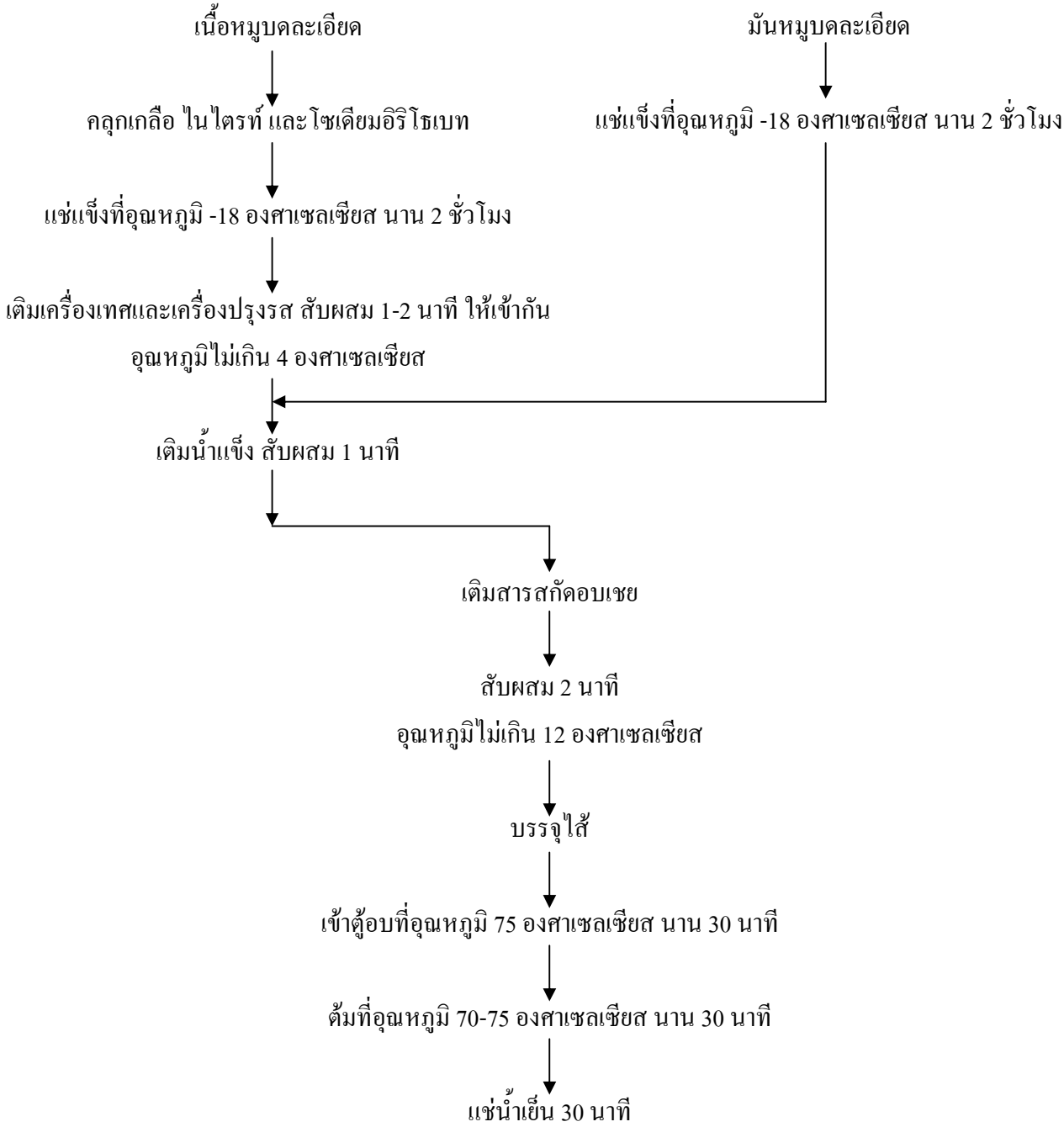
3.5.3.5 การวิเคราะห์ความสามารถในการทำลายเปอร์ออกซิไนไตรท์ (peroxynitrite scavenging)

การวิเคราะห์ความสามารถในการทำลายเปอร์ออกซิไนไตรท์ (peroxynitrite scavenging) ตามวิธีของ Hazra และ คณะ (2008) รายละเอียดการวิเคราะห์แสดงในภาคผนวก ก.

3.5.4 การวิเคราะห์ความสามารถในการลดปริมาณไนไตรท์ตกค้างของสารสกัดอบเชยในไส้กรอกหมูรมควัน

3.5.4.1 การเตรียมไส้กรอกหมูรมควัน

ทำการเตรียมไส้กรอกหมูรมควันดังภาพที่ 3.2 โดยใช้ส่วนผสมตามตารางที่ 3.1 และเติมสารสกัดอบเชยในปริมาณต่างๆ จากนั้นนำไส้กรอกหมูรมควันที่ผลิตได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปวิเคราะห์ตามข้อ 3.5.4.2



ภาพที่ 3.2 : ขั้นตอนการผลิตไส้กรอกหมูรมควัน

ที่มา : ดัดแปลงจากปรวัล (2552) และ เยาวลักษณ์ (2551)

ตารางที่ 3.1 สูตรในการผลิตไส้กรอกหมูรมควัน

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

ที่มา : ดัดแปลงจากปรวัล (2552)

3.5.4.2 การวิเคราะห์ความสามารถในการลดปริมาณไนไตรท์ตกค้างของสารสกัดอบเชยในไส้กรอกหมูรมควันและการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ระหว่างการเก็บรักษา

นำไส้กรอกหมูรมควันที่เก็บเป็นเวลา 0, 1, 3 และ 5 วัน มาเตรียมตัวอย่างซึ่งดัดแปลงวิธีการเตรียมตัวอย่างจาก AOAC (2000) โดยนำไส้กรอกหมูรมควันมาบดละเอียดและชั่งน้ำหนัก 5 กรัม เติมน้ำกลั่น ปริมาณ 50 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน 30 วินาที วัดค่า pH และวิเคราะห์ความเป็นกรด-ด่างตามวิธีของ Bloukas และคณะ (2000) โดยใช้เครื่อง pH meter ขั้วอิเล็คโทรดแก้ว จากนั้นจึงเติมน้ำกลั่นอีก 50 มิลลิลิตร ปิดภาชนะด้วยอะลูมิเนียมฟลอย นำมาแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 70 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง เขย่าขวดเป็นระยะ เมื่อครบเวลา ทำให้เย็นแล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 8000 รอบ/นาที นาน 10 นาที ดูดส่วนใส่ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาวิเคราะห์หาปริมาณไนไตรท์ตกค้างด้วยวิธีตามข้อ 3.5.1 ทำทั้งหมด 3 ซ้ำ

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 ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อคสมบูรณ์ (randomized complete block design) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธีของดันแคน (Duncan's New Multiple Range Test)