

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, 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

การแปลผลนั้นจะนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการวิเคราะห์ปริมาณไนไตรท์ตกค้างของตัวอย่าง มาคำนวณกับสมการกราฟมาตรฐานได้เป็นค่าปริมาณไนไตรท์ตกค้าง นอกจากนี้ยังสามารถนำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณเป็นความสามารถในการทำลายไนไตรท์ ของสารสกัด โดย เปอร์เซ็นต์ความสามารถในการทำลายไนไตรท์ (nitrite scavenging) เท่ากับ

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

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. เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณกรดแกลลิกในหน่วย ไมโครกรัม

2.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดในตัวอย่างสารสกัด

1. ปิเปตตัวอย่างสารสกัดอบเชย (CEE) 0.5 มิลลิลิตร เจือจางและปรับปริมาตรด้วยเอทานอล 95 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 น้ำกลั่นเป็น blank
5. คำนวณปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดในตัวอย่างสารสกัด

3. 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. เติมสารละลาย Sodium nitroprusside 2 มิลลิลิตร ในตัวอย่างสารสกัด 0.5 มิลลิลิตร
3. เติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 150 นาที
4. ปิเปตมา 1 มิลลิลิตร เติม Sulfanilamide reagent 2 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่ 5 นาที
5. เติม 0.1 % NED reagent 2 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่ 30 นาที
6. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร
7. คำนวณเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการทำลายไนตริกออกไซด์

จากเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการทำลายไนตริกออกไซด์

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

4. การวิเคราะห์ความสามารถในการทำลายเปอร์ออกซิไนไตรท์ (peroxynitrite scavenging)

การวิเคราะห์ความสามารถในการทำลายเปอร์ออกซิไนไตรท์ (peroxynitrite scavenging) ตามวิธีของ Hazra และ คณะ (2008)

4.1 สารเคมี

1. 20 mM ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.4
2. 0.1 mM Diethylene-triamine-pentaacetic acid (DTPA)
3. 90 mM Sodium chloride
4. 5 mM Potassium chloride
5. 12.5 μ M Evans Blue
6. 1 mM peroxynitrite (จากการสังเคราะห์)

4.2 การสังเคราะห์เปอร์ออกซิไนไตรท์ (การเกิดปฏิกิริยาทำในสถานะเย็นทั้งหมด)

1. เติม 1.85 M HNO_3 ลงใน 2.1 M H_2O_2 และผสมกับ 2 M NaNO_2
2. เทสารละลายผสมลงใน 4.2 M NaOH รอจนเปอร์ออกซิไนไตรท์อิ่มตัว
3. ทำการแยก MnO_2 เป็นคอลัมน์แล้วค่อยๆ เทสารละลายจากข้อ 2. ผ่านคอลัมน์ เพื่อให้ MnO_2 จับ H_2O_2 ที่ทำปฏิกิริยาไม่หมด
4. แخذสารละลายที่ผ่านคอลัมน์แล้ว ไว้ในที่เย็นอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน
5. ปิเปตเก็บส่วนใสสีเหลืองด้านบน
6. ทดสอบความเข้มข้นของเปอร์ออกซิไนไตรท์ด้วย 1.2 NaOH และทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 302 นาโนเมตร ซึ่งค่าความเข้มข้นที่ได้ควรเท่ากับ $\epsilon_{302 \text{ nm}}/1670 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

4.3 การวัดค่าความสามารถในการทำลายเปอร์ออกซิไนไตรท์ของตัวอย่าง

1. ทำการผสม DTPA 10 ไมโครลิตร, Sodium chloride 10 ไมโครลิตร, Potassium chloride 10 ไมโครลิตร, Evans Blue 500 ไมโครลิตร, peroxynitrite (จากการสังเคราะห์) 5 ไมโครลิตร, สารสกัดอบเชย (0-1000 ไมโครกรัม/0.5 มิลลิลิตร) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 435 ไมโครลิตร รวมทั้งหมดเป็น 1 มิลลิลิตรทิ้งให้เกิดปฏิกิริยา 30 นาที ที่ 25 องศาเซลเซียส

2. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 611 นาโนเมตร

3. คำนวณค่าความสามารถในการทำลายเปอร์ออกซิไนไตรท์ โดยเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการทำลายเปอร์ออกซิไนไตรท์ เท่ากับ $(A_{611 \text{ nm of control}} - A_{611 \text{ nm of sample}}) \times 100 / A_{611 \text{ nm of control}}$

Blank : ใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ แทนส่วนของ Evans Blue และสารสกัดอบเชย

Control : ใช้เอทานอล 95 % แทนส่วนของ สารสกัดอบเชย

ภาคผนวก ข.
การทดสอบทางประสาทสัมผัส

แบบทดสอบความชอบ (7-point hedonic scale)

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

ชื่อผลิตภัณฑ์ ไส้กรอกหมูรมควัน

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)

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวณัฐวดี ตันวิสุทธิ
วันเดือนปีเกิด	วันที่ 8 กรกฎาคม พ.ศ. 2530
ที่อยู่	523/1 ซอยมาตุลี 31 ถนนมาตุลี ตำบลนครสวรรค์ตก อำเภอเมือง จังหวัดนครสวรรค์ 60000 โทรศัพท์ : 089-5676677, e-mail : naannoom@hotmail.com
ประวัติการศึกษา	2552 จบการศึกษาระดับปริญญาตรี หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง 2552 เข้าศึกษาต่อระดับปริญญาโท หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง