ภาคผนวก

ภาคผนวก ก การวิเคราะห์ทางกายภาพ

ก1. การวัดค่าสีของเครื่องต้มข่า น้ำซุปต้มข่ากุ้ง และสารสกัดหยาบของข่า ตะไคร้ พริกขี้หนู ใบมะกรูดและเครื่องต้มข่า และกุ้งที่ไม่มาริเนท/มาริเนทด้วยเครื่องต้มข่า

อุปกรณ์

เครื่องวัดค่าสี ยี่ห้อ Hunter Lab รุ่น Color Flex ประเทศสหรัฐอเมริกา

วิธีการ

นำเครื่องต้มข่า น้ำซุปต้มข่ากุ้ง สารสกัดหยาบของข่า ตะไคร้ พริกขี้หนู ใบมะกรูดและเครื่องต้มข่า ด้วยน้ำ เอธานอลความเข้มข้นร้อยละ 50, 75 และ 95 และเนื้อกุ้งที่ไม่มาริเนทด้วยเครื่องต้มข่าและกุ้งที่มาริเนทด้วยเครื่องต้มข่าที่ผ่านการล้างเครื่องต้มข่าออกแล้ว โดยวัดบริเวณปล้องที่ 2 ของตัวกุ้ง ไปวัดค่าสี ด้วยเครื่องวัดค่าสี Hunter Lab รายงานค่าสีในระบบ CIE Lab scale คือ L*, a*, b* และคำนวณ Hue angle (H^{o}) และ C* (chroma) จากสูตร (Arias *et al*., 2000)

$H° = \tan^{-1} (b^*/a^*)$ เมื่อ $a^* > 0$ และ $b^* \geq 0$

$H° = 180 + \tan^{-1} (b^*/a^*)$ เมื่อ $a^* < 0$

$C^* = (a^{*2}+b^{*2})^{1/2}$

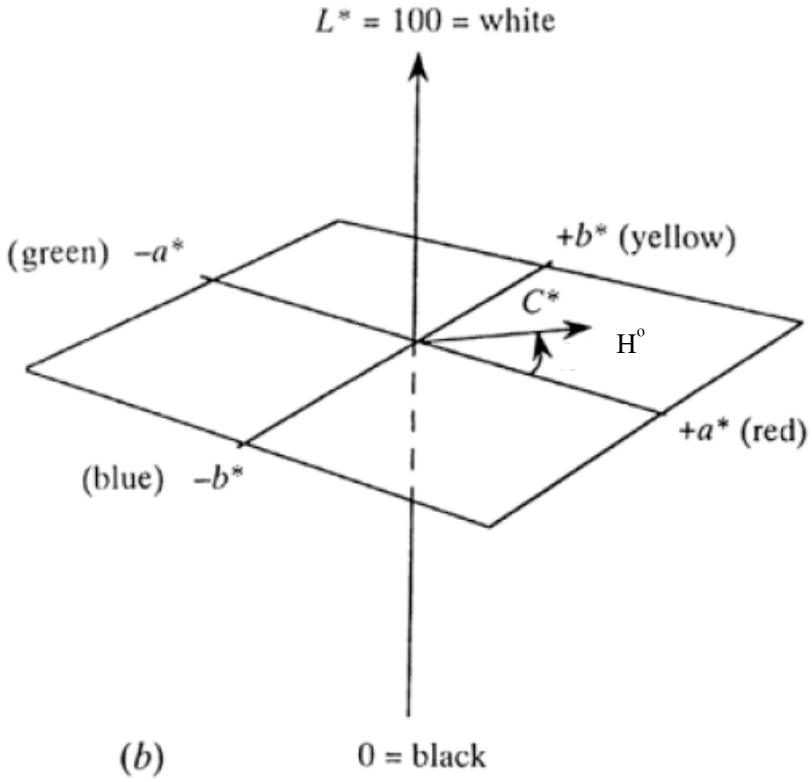
L* บ่งบอกถึงความสว่างของสี (lightness) โดยมีค่าตั้งแต่ 0 (สีดำ) ถึง 100 (สีขาว)

a* บ่งบอกถึงสีแดงและสีเขียว โดยค่าเป็นบวกก็จะมีความเป็นสีแดงมากขึ้น และถ้าค่าเป็นลบก็จะมีความเป็นสีเขียวมาก

b* บ่งบอกถึงสีเหลืองและสีน้ำเงิน โดยค่าเป็นบวกก็จะมีความเป็นสีเหลือง และถ้าค่าเป็นลบก็จะมีความเป็นสีน้ำเงินมากขึ้น

C* แสดงค่า chroma ซึ่งเป็นค่าที่แสดงถึงความบริสุทธิ์ของสี

H^{o} แสดงค่า hue angle เป็นค่ามุม โดยค่า 0^{o} เท่ากับ +a* (red) ค่า 90^{o} เท่ากับ +b* (yellow) ค่า 180^{o} เท่ากับ –a* (green) และค่า 270^{o} เท่ากับ –b* (blue)



Appendix figure 1. Color diagrams: CIE LAB uniform diagram showing relationship of red/green (*a**+/-) and yellow/blue (*b**+/-) opponent co-ordinates to lightness *L**, chroma *C** and hue angle (H^{o})

ที่มา: MacDougall (2002)

ก2. การวิเคราะห์ค่าพีเอช (Bartolome *et al*, 1995)

อุปกรณ์

1. เครื่องวัดพีเอช (Mettler 350)

วิธีการวิเคราะห์

1. นำเครื่องต้มข่า/ตัวอย่างเนื้อกุ้งที่ไม่มาริเนทด้วยเครื่องต้มข่า/กุ้งที่มาริเนทด้วยเครื่องต้มข่าที่เขี่ยเครื่องต้มข่าออก สับให้ละเอียดไปโฮโมจิไนซ์ด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1: 4 (น้ำหนักต่อปริมาตร)

2. นำไปวัดค่าพีเอชโดยใช้เครื่องวัดพีเอช (Mettler 350) ที่ผ่านการสอบเทียบโดยใช้บัฟเฟอร์ที่มีพีเอชเท่ากับ 4.00 และ 7.00

ก3. การวิเคราะห์ปริมาณความชื้นโดยวิธีของ A. O. A. C. (1999)

อุปกรณ์

1. ภาชนะอลูมิเนียมสำหรับหาความชื้น
2. ตู้อบไฟฟ้า (Electric oven)
3. โถดูดความชื้น (Desiccator)
4. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง

วิธีวิเคราะห์

1. ล้างภาชนะสำหรับหาความชื้นให้สะอาด อบในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105°ซ เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง ทำให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้องในโถดูดความชื้น แล้วนำมาชั่งน้ำหนัก

2. กระทำเช่นเดียวกับข้อ 1 ซ้ำ จนได้น้ำหนักคงที่ ซึ่งผลต่างของน้ำหนักที่ชั่ง 2 ครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

3. ชั่งตัวอย่างข่า ตะไคร้ พริกขี้หนู ใบมะกรูด เครื่องต้มข่า และกุ้งที่ต้องการวิเคราะห์ปริมาณความชื้นให้มีความละเอียดของน้ำหนักอยู่ในช่วง 1-2 กรัม ในภาชนะหาความชื้นที่ทราบน้ำหนักแล้ว

4. นำไปอบในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105°ซ เป็นเวลา 5-6 ชั่วโมง

5. นำออกจากตู้อบปล่อยให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้องในโถดูดความชื้น (ประมาณ 45 นาที) แล้วนำมาชั่งน้ำหนัก

6. อบซ้ำอีกครั้งประมาณ 30 นาที และกระทำเช่นเดิมจนได้น้ำหนักคงที่ ซึ่งผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งทั้ง 2 ครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

7. คำนวณหาปริมาณความชื้นของตัวอย่าง จากสูตร

$$\text{ปริมาณความชื้นคิดเป็นร้อยละโดยน้ำหนัก} = \frac{(\text{ผลต่างของน้ำหนักก่อนและหลังอบ}) \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ}}$$

ก4. การวิเคราะห์ปริมาณของแข็งทั้งหมด (ดัดแปลงจาก A. O. A. C., 1999)

อุปกรณ์

1. ภาชนะอลูมิเนียม

2. ตู้อบไฟฟ้า (Electric oven)
3. โถดูดความชื้น (Desiccator)
4. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง

วิธีวิเคราะห์

1. ล้างภาชนะอลูมิเนียมให้สะอาด อบให้แห้งในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105°ซ เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบเก็บในโถดูดความชื้น แล้วนำมาชั่งน้ำหนัก
2. กระทำเช่นเดียวกับข้อ 1 ซ้ำ จนได้น้ำหนักคงที่ ซึ่งผลต่างของน้ำหนักที่ชั่ง 2 ครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม
3. ชั่งตัวอย่างสารสกัดหยาบของข่า ตะไคร้ พริกขี้หนู ใบมะกรูดและเครื่องต้มข่า ด้วยน้ำเอธานอลความเข้มข้นร้อยละ 50, 75 และ 95 ที่ต้องการวิเคราะห์ให้มีความละเอียดของน้ำหนักอยู่ในช่วง 1-2 กรัม ในภาชนะอลูมิเนียมที่ทราบน้ำหนักแล้ว
4. นำไปอบในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105°ซ เป็นเวลา 5-6 ชั่วโมง
5. นำออกจากตู้อบเก็บในโถดูดความชื้น แล้วนำมาชั่งน้ำหนัก
6. อบซ้ำอีกครั้งประมาณ 30 นาที และกระทำเช่นเดิมจนได้น้ำหนักคงที่ ซึ่งผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งทั้ง 2 ครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม
7. คำนวณหาปริมาณของแข็งของตัวอย่างสารสกัดหยาบ จากสูตร

$$\text{ปริมาณของแข็งทั้งหมดคิดเป็นร้อยละโดยน้ำหนักต่อกรัมของตัวอย่างแห้ง} = \frac{\text{น้ำหนักของแข็ง} \times 100}{\text{น้ำหนักของสารสกัดหยาบก่อนอบ} \times \text{น้ำหนักแห้งของตัวอย่าง}}$$

ตัวอย่างการคำนวณปริมาณของแข็งของสารสกัดหยาบของข่าด้วยน้ำ

น้ำหนักของแข็งคือ 7.3667×10^{-3} กรัม
น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบคือ 1.0035 กรัม
น้ำหนักแห้งของข่าคำนวณจาก

ข่าสดมีความชื้นร้อยละ 91.6842 แสดงว่าข่าสดมีปริมาณของแข็งร้อยละ 8.3158
ข่าสด 100 กรัม มีปริมาณของแข็ง 8.3158 กรัม

ข่าสด 80.49 กรัม มีปริมาณของแข็ง $\frac{8.3158 \times 80.49}{100} = 6.6934$ กรัม

ดังนั้น ปริมาณของแข็งทั้งหมดคิดเป็นร้อยละโดยน้ำหนักต่อกรัมของข่าแห้ง

$$= \frac{7.3667 \times 10^{-3} \times 100}{1.0035 \times 6.6934}$$

$$= 0.1097$$

ปริมาณของแข็งทั้งหมดของสารสกัดข่าด้วยน้ำมีค่าเท่ากับร้อยละ 0.1097 ต่อกรัมของข่าแห้ง หมายถึง เมื่อนำข่าน้ำหนักแห้ง 1 กรัม มาสกัดด้วยน้ำ ได้สารละลายที่มีของแข็งร้อยละ 0.1097

ก5. การวิเคราะห์ค่าวอเตอร์แอคทิวิตี้ (water activety, a_w)

อุปกรณ์

1. เครื่องวัดค่าวอเตอร์แอคติวิตี้ ยี่ห้อ Novasina รุ่น Thermoconstanter
2. เครื่องคอมพิวเตอร์พร้อมโปรแกรมสำเร็จรูป

วิธีการวิเคราะห์

1. เปิดเครื่องวัดค่าวอเตอร์แอคติวิตี้และตั้งค่าอุณหภูมิของเครื่องวัดค่าวอเตอร์แอคติวิตี้ที่ 25°ซ รอให้อุณหภูมิของเครื่องอยู่ที่ 25°ซ แล้ว Calibrate เครื่องวัดค่าวอเตอร์แอคติวิตี้ด้วยสารละลายเกลือมาตรฐาน
2. เปิดคอมพิวเตอร์และเลือกโปรแกรมสำเร็จรูป
3. บรรจุตัวอย่างลงในตลับพลาสติกให้ได้ปริมาณ ¾ ของตลับพลาสติก แล้วนำตลับตัวอย่างใส่ใน measuring chamber
4. เริ่มวัดค่าวอเตอร์แอคติวิตี้ จนกระทั่งเครื่องเตือน บันทึกค่าวอเตอร์แอคติวิตี้

ก.6 ค่า Drip loss (ตามรายงานของอาสีนะ หมัดเจริญ, 2547)

อุปกรณ์

1. กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 เส้นผ่านศูนย์กลาง 11 เซนติเมตร
2. เครื่องชั่งไฟฟ้า ทศนิยม 4 ตำแหน่ง

วิธีการ

1. ชั่งน้ำหนักก่อนและหลังการเก็บรักษา

การคำนวณ

$$\text{Drip loss (ร้อยละ)} = \frac{\text{ผลต่างของน้ำหนักก่อนและหลังการเก็บรักษา} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนการเก็บรักษา}}$$

ก7. ค่า Cooking loss (ตามรายงานของอาสีนะ หมัดเจริญ, 2547)

อุปกรณ์

1. กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 เส้นผ่านศูนย์กลาง 11 เซนติเมตร
2. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง
3. อ่างควบคุมอุณหภูมิ
4. นาฬิกาจับเวลา

วิธีการ

1. ชั่งน้ำหนักกุ้งก่อนการเก็บรักษา
2. นำตัวอย่างให้ความร้อนที่ 80°ซ 2 นาที
3. นำตัวอย่างมาวางบนกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1
4. ปิดทับด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1
5. นำชิ้นตัวอย่างออกจากกระดาษกรอง แล้วนำมาชั่งน้ำหนัก

การคำนวณ

$$\text{Cooking loss (ร้อยละ)} = \frac{(A1-A2) \times 100}{A1}$$

A1 = น้ำหนักตัวกุ้งก่อนการเก็บรักษา

A2 = น้ำหนักชิ้นตัวอย่างที่ออกจากกระดาษกรอง

ก8. การวัดค่าเนื้อสัมผัส

อุปกรณ์

1. เครื่องวัดเนื้อสัมผัส ยี่ห้อ Texture Analyzer รุ่น TA-XT2i
2. หัววัด Warner-Bratzler (WB)

วิธีการ

นำตัวอย่างกุ้งมาวัดค่าเนื้อสัมผัส โดยใช้หัววัด Warner-Bratzler (WB) ความเร็ว 2 มิลลิเมตรต่อวินาที ตัดชิ้นตัวอย่างตรงปล้องที่ 2 ของลำตัวกุ้ง จากนั้นรายงานผลเป็นค่าความแน่นเนื้อ (Firmness) หน่วยเป็น kg Force1

ก9. วิธีการเตรียมตัวอย่างสำหรับการตรวจสอบโครงสร้างทางจุลภาคด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (ดัดแปลงจาก Palka and Daun, 1999)

สารเคมี

1. กลูทารอลดีไฮด์ (glutaraldehyde) เข้มข้นร้อยละ 2.5 ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ค่าความเป็นกรดด่าง 7.2 โดยปริมาตรต่อปริมาตร
2. สารละลายเอทธานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 70 80 90 และ 100 โดยปริมาตรต่อปริมาตร

วิธีการ

1. ตัดตัวอย่างตรงปล้องที่ 2 หลังจากนั้นตัดชิ้นตัวอย่างให้เป็น fragment บางๆ โดยตัดแบบขวาง (โดยใช้ liquid nitrogen)
2. แช่ชิ้นตัวอย่างในสารละลายกลูทารอลดีไฮด์ ให้สารละลายท่วมชิ้นตัวอย่าง นาน 1-2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 °ซ ล้างตัวอย่างด้วยน้ำกลั่นจนน้ำที่ล้างไม่มีสีเหลือง
3. ดึงน้ำออกจากตัวอย่างโดยการแช่ในสารละลายเอทธานอลที่ความเข้มข้นร้อยละ 50 70 80 90 และ 100 อย่างละ 2 ครั้ง ตามลำดับ โดยแช่เป็นเวลา 15-30 นาที ในแต่ละความเข้มข้น
4. ทำ critical point dry โดยใช้ liquid carbon dioxide
5. ทำการติด fragments ของตัวอย่างกับ holder stab และทำการเคลือบด้วย AuPd 20 nm จำนวน 2 ครั้ง
6. ทำการตรวจสอบตัวอย่างด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM JEOL

JSM-5800) ใช้กำลังขยาย × 300 เพื่อตรวจสอบตัวอย่างในแนวขวาง (transverse section) working distance 50 μm 20 kv

ภาคผนวก ข การวิเคราะห์ทางเคมี

ข1. การวิเคราะห์ปริมาณเยื่อใยโดยวิธีของ A. O. A. C. (1999)

วัสดุอุปกรณ์

1. อุปกรณ์ชุดหาปริมาณสารเยื่อใย ซึ่งประกอบด้วย บีกเกอร์ขนาด 600 มิลลิลิตร อุปกรณ์ควบแน่น และอุปกรณ์ให้ความร้อน
2. กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 54
3. ขวดกรองสุญญากาศ
4. กรวยกรอง
5. ถ้วยกระเบื้องเคลือบ
6. ตู้อบไฟฟ้า
7. เตาเผา
8. โถดูดความชื้น
9. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง

สารเคมี

1. กรดซัลฟูริก ความเข้มข้นร้อยละ1.25
2. โซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 1.25
3. เอทิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้นร้อยละ 95

วิธีการวิเคราะห์

1. นำกระดาษกรองวางบนกระจกนาฬิกา อบในตู้อบที่อุณหภูมิ 105°ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วเก็บในโถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนักเก็บไว้ใช้ในการกรอง ในขั้นตอนต่อไป
2. ชั่งตัวอย่างลงในบีกเกอร์ทรงสูงสำหรับวิเคราะห์สารเยื่อใยขนาด 600 มิลลิลิตร
3. เติมกรดซัลฟูริกความเข้มข้นร้อยละ 1.25 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร
4. วางบีกเกอร์บนอุปกรณ์ให้ความร้อนซึ่งต่อเข้ากับอุปกรณ์ควบแน่น แล้วเปิดน้ำหล่ออุปกรณ์ควบแน่น พร้อมเปิดสวิทซ์ไฟ
5. ต้มจนเดือดนาน 30 นาที

6. กรองขณะร้อนผ่านกระดาษกรองที่ชั่งน้ำหนักแล้ว

7. ล้างด้วยน้ำร้อนจนกระทั่งน้ำล้างหมดความเป็นกรด

8. ถ่ายกากที่ได้ลงในบีกเกอร์เดิม

9. เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 1.25 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร

10. วางบีกเกอร์บนอุปกรณ์ให้ความร้อนซึ่งต่อกับอุปกรณ์ควบแน่นเช่นเดิม และต้มต่ออีก 30 นาที

11. กรองขณะร้อนผ่านกระดาษกรองแผ่นเดิม

12. ล้างด้วยน้ำร้อนจนกระทั่งน้ำล้างหมดความเป็นด่าง

13. ล้างด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้นร้อยละ 95 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

14. นำกระดาษกรองพร้อมทั้งกากวางในถ้วยกระเบื้องเคลือบ นำไปเผาบน hot plate จนหมดควัน แล้วนำไปอบในตู้อบไฟฟ้า ที่อุณหภูมิ 105°ซ ประมาณ 3 ชั่วโมง แล้ววางพักไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น

15. ชั่งน้ำหนักแล้วอบซ้ำอีก ครั้งละ 30 นาที จนกระทั่งได้น้ำหนักคงที่ ซึ่งผลต่างของน้ำหนักที่ชั่ง 2 ครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

16. นำถ้วยกระเบื้องเคลือบพร้อมกากที่อบแห้งแล้วไปเผา เช่นเดียวกับวิธีการวิเคราะห์ปริมาณเถ้า

17. คำนวณปริมาณสารเยื่อใยของตัวอย่าง จากสูตร

$$\text{ปริมาณเยื่อใยคิดเป็นร้อยละโดยน้ำหนัก} = \frac{\text{ผลต่างของน้ำหนักตัวอย่างหลังอบและหลังเผา} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}}$$

ข2. วิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (Kahkonen *et al*., 1999)

หลักการ

เป็นการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด โดยอาศัยการทำปฏิกิริยาระหว่าง Folin-Ciocalteu (Phosphomolybdic-phosphotungstic acid) กับสารประกอบฟีนอลิก ในสภาวะที่เป็นด่าง เกิดเป็นสารประกอบสีน้ำเงิน ซึ่งสามารถดูดกลืนแสงได้ดีในช่วง 765 นาโนเมตร ข้อเสียของวิธีนี้คือ ถ้าตัวอย่างมีสารรีดิวซ์อื่นๆที่ไม่ใช่สารฟีนอลิก ได้แก่ อะดีนีน อะดีโนซีน อะลานีน อะนิลีน กรดอะมิโนเบนโซอิค กรดแอสคอร์บิค เบนซาลดีไฮด์ ครีเอทินีน ซีสเทอีน ไซทีดีน ไซโทซีน ไดเมทธิลอะนิลีน ไดฟีนิลเอมีน อีดีทีเอ ฟรักโทส กัวนีน กัวโนซีน ไกลซีน ฮีสทามีน ฮีสทิดีน อินโดล เมทธิลเอมีน กรดไนไทรโลอะซิติค กรดโอเลอิค โปรตีน

ไพริดอกซีน ซูโครส กรดซัลฟานิลิค ไธมีน ไธมีดีน ไตรเมทธิลเอมีน ทริปโตแฟน ยูราซิล กรดยูริค และแซนธิน เป็นต้น (Prior *et al*., 2005; Dordevic *et al*., 2010) จะรบกวนการวิเคราะห์ได้ โดยทำให้ค่าสูงกว่าที่เป็นจริง (Shahidi and Naczk, 1995)

วัสดุและอุปกรณ์

1. เครื่องวัดไมโครเพลท (microplate reader, PowerWaveX, Biotek, U.S.A.)
2. ไมโครเพลท (microplate)
3. ไมโครปิเปต (micropipette)

สารเคมี

1. กรดแกลลิก (gallic acid)
2. Folin-Ciocalteu's reagent
3. โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ร้อยละ 7.5

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Gallic acid

เตรียมสารมาตรฐานกรดแกลลิกให้มีความเข้มข้น 6 ระดับ คือ 0.017, 0.034, 0.069, 0.137, 0.274 และ 0.549 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 5 มิลลิลิตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย

การเตรียมสารละลาย Folin-Ciocalteu's reagent

ปิเปต Folin reagent มา 10 มิลลิลิตร ลงในขวดปรับปริมาตร ขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร แล้วปิดด้วยอลูมิเนียมฟอยล์

การเตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต

ชั่งโซเดียมคาร์บอเนตมา 7.5 กรัม ถ่ายลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร

การเตรียมตัวอย่าง

นำสารสกัดหยาบของข่า ตะไคร้ พริกขี้หนู ใบมะกรูดและเครื่องต้มข่ามาเจือจาง ให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมโดยใช้เอธานอลความเข้มข้นร้อยละ 75

การทดสอบ

ปิเปตตัวอย่างสารสกัดหยาบของข่า ตะไคร้ พริกขี้หนู ใบมะกรูดและเครื่องต้มข่า ความเข้มข้นที่เหมาะสมปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงใน 96-well microplate ปิเปตสารละลาย Folin-Ciocalteu's reagent ลงในสารตัวอย่าง หลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นปิเปตสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตลงในสารตัวอย่าง หลุมละ 80 ไมโครลิตร พักไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate Reader (PowerWaveX, Biotek, U.S.A.) โดยใช้น้ำกลั่น 180 ไมโครลิตรผสมกับสารสกัดหยาบจำนวน 20 ไมโครลิตร เป็น blank sample

วิธีแปลผล

คำนวณความเข้มข้นของปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในรูปของสมมูลกรดแกลลิก โดยใช้กราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก ดังสมการ

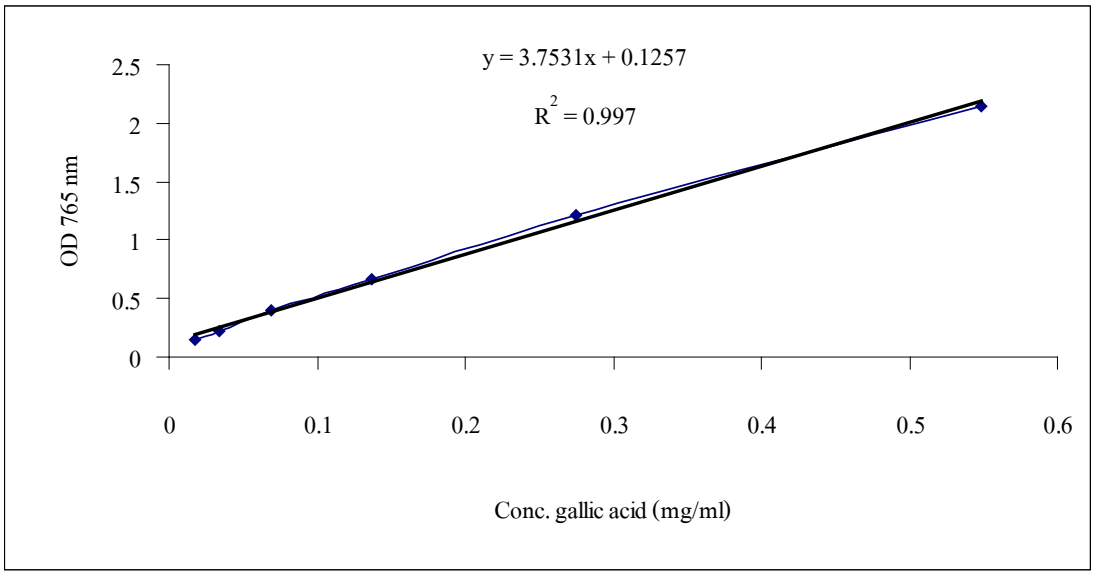
$$C = c \times V/m$$

โดยที่ C = ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด คิดเป็นกรัมสมมูลย์ของกรดแกลลิกต่อ 100 กรัมของน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง

c = ความเข้มข้นของกรดแกลลิกเปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) โดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร (OD765nm) ของตัวอย่างลบค่าการดูดกลืนแสงของ blank sample ออก แล้วแทนค่าเป็นค่า y ในสมการที่ได้จากกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก (Appendix figure 1) คำนวณหาค่า x

V = ปริมาตรของสารสกัด (มิลลิลิตร)

m = น้ำหนักแห้งของตัวอย่าง (กรัม)



Appendix figure 2. Standard phenolic content of gallic acid using Folin–Ciocalteau colorimetric Method

ตัวอย่างการคำนวณสารสกัดหยาบของพริกขี้หนูด้วยน้ำ

นำพริกขี้หนูสด 81.31 กรัม สกัดด้วยน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร นำไประเหยสารสกัดออกไปร้อยละ 75 ได้สารสกัดหยาบของพริกขี้หนูด้วยน้ำ 200 มิลลิลิตร

คำนวณค่า c

จากกราฟ $y = 3.7531x + 0.1257$ ดังนั้น $x = (y - 0.1257)/ 3.7531$

OD765nm ของสารสกัดหยาบของพริกขี้หนู - OD765nm ของ blank sample = 0.6657

$x = (0.6657 - 0.1257)/ 3.7531 = 0.1439$ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ปริมาตรของตัวอย่างพริกขี้หนู 200 มิลลิลิตร ทำให้เจือจาง 12 เท่า

คำนวณน้ำหนักแห้งของพริกขี้หนู

พริกขี้หนูสดมีของแข็งร้อยละ 22.1748

พริกขี้หนูสด 100 กรัม มีของแข็ง 22.1748 กรัม

พริกขี้หนูสด 81.31 กรัม มีของแข็ง $(22.1748 \times 81.31)/ 100 = 18.0303$ กรัม

จากสูตร C = c × V/m

= (0.1439 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร × 200 มิลลิลิตร × 12)/ 18.0303 กรัม

= 19.1544 มิลลิกรัมต่อกรัม

= 19.1544×10^{-1} กรัมต่อ 100 กรัม = 1.9154 กรัมต่อ 100 กรัม

ดังนั้น สารสกัดพริกขี้หนูด้วยน้ำ มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 1.9154 กรัม สมมูลย์ของกรดแกลลิกต่อ 100 กรัม ของน้ำหนักแห้งของพริกขี้หนู

ข3. วิเคราะห์คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ

การศึกษาคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของผลไม้ พืชผักและผลิตภัณฑ์จากพืช ไม่สามารถใช้วิธีในการทดสอบแค่เพียงวิธีเดียว เนื่องจากความซับซ้อนทางธรรมชาติของสารพฤษเคมี (Chu *et al*., 2000) ดังนั้น วิธีการทดสอบเพียงวิธีเดียวไม่สามารถสะท้อนค่าที่ถูกต้องของสารต้านอนุมูลอิสระในระบบผสมหรือระบบเชิงซ้อนของอาหารได้ (Du *et al*., 2009) เช่น การวิเคราะห์สมบัติการต้านออกซิเดชัน โดยวิธี β-carotene bleaching เป็นวิธีที่เหมาะสำหรับวิเคราะห์สารต้านออกซิเดชันที่ชอบไขมัน (Kulisic *et al*., 2004) ในขณะที่หากวิเคราะห์สารต้านออกซิชันที่มีขั้ว เช่น กรดแอสคอร์บิค กรดโรสมารินิคและกรดคาฟเฟอิค โดยวิธี β-carotene bleaching ทำให้พบกิจกรรมการต้านออกซิเดชันน้อย ทั้งๆที่สารดังกล่าวมีสมบัติการต้านออกซิเดชันสูงเมื่อใช้วิธีอื่นๆในการทดสอบ แสดงให้เห็นว่าคุณสมบัติในการเป็นสารต้านออกซิเดชันขึ้นอยู่กับวิธีการวิเคราะห์ ความเข้มข้น ธรรมชาติและคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ เช่น สมบัติการละลายของสารต้านอนุมูลอิสระที่ใช้ในการศึกษา (Koleva *et al*., 2002)

การศึกษาสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของเครื่องเทศที่เป็นองค์ประกอบในเครื่องต้มข่าและเครื่องต้มข่า ใช้วิธีในการวิเคราะห์ 3 วิธี ได้แก่ การศึกษาความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS และความสามารถในการให้อิเล็คตรอนในระบบ FRAP การศึกษาความสามารถของสารสกัดในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH เป็นวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระที่มีความสามารถในการให้ไฮโดรเจนอะตอม (Baumann *et al*., 1979 อ้างโดย Leong and Shui, 2002) ซึ่งมีหลักการคือ อนุมูลอิสระ DPPH ในสารละลายมีสีม่วงสามารถดูดกลืนแสงได้ดีในช่วง 517 นาโนเมตร เมื่ออนุมูลอิสระ DPPH ได้รับอิเล็คตรอนหรืออะตอมของไฮโดรเจน จากสารต้านอนุมูลอิสระที่ใช้ในการทดสอบ เกิดเป็น DPPH-H (Hogg *et al*., 1961) ซึ่งมีสีจางลงและเป็นสารที่เสถียรขึ้น

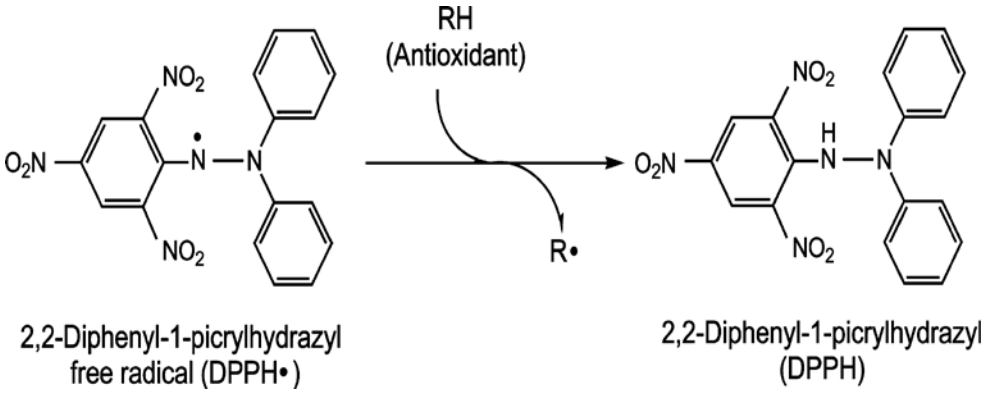
สำหรับการศึกษาความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS เป็นวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระที่มีความสามารถในการให้ไฮโดรเจนอะตอมและยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ (Rice-Evans *et al*., 1995; Rice-Evans *et al*., 1996; Robert *et al*., 1999) ซึ่งมีหลักการคล้ายคลึงกับ การศึกษาความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH แต่ข้อแตกต่างของความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS คือ ABTS เป็นสารที่สามารถละลายได้ในน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์ ดังนั้นจึงสามารถวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระได้ทั้งสารต้านอนุมูลอิสระที่มีคุณสมบัติชอบน้ำและไม่ชอบน้ำ ในขณะที่ DPPH สามารถละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์เพียงอย่างเดียว ดังนั้นจึงสามารถวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำได้มากกว่า (Wojdylo *et al*., 2007) และตำแหน่งในการทำปฏิกิริยาระหว่างอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS กับสารต้านอนุมูลอิสระก็แตกต่างกัน (Kondo *et al*., 2000; Osman *et al*., 2006)

นอกจากนี้พบว่าการทำปฏิกิริยาระหว่างสารต้านอนุมูลอิสระบางชนิดกับอนุมูลอิสระ ABTS เกิดได้ช้า (Lissi *et al*., 1999) ทำให้ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS ของสารต้านอนุมูลอิสระขึ้นอยู่กับระยะเวลาในการบ่มและอัตราส่วนระหว่างสารต้านอนุมูลอิสระและความเข้มข้นของอนุมูลอิสระ ABTS (Roginsky and Lissi, 2005) สำหรับ FRAP เป็นวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์สมบัติการรีดิวซ์เฟอร์ริคไอออน ซึ่งอยู่ในรูปของสารประกอบเชิงซ้อนของ Fe^{3+}-TPTZ (Ferric tripyridyl triazine) ไปเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กเฟอร์รัส Fe^{2+}-TPTZ (Ferrous tripyridyl triazine) ซึ่งมีสีฟ้า (Wojdylo *et al*., 2007)

ข3.1 DPPH radical scavenging assay (ดัดแปลงจาก Wu *et al*., 2003)

หลักการ

เป็นการทดสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของสารที่ใช้ทดสอบโดยอนุมูลอิสระต้นแบบที่ใช้ในการทดสอบคือ DPPH ซึ่งมีหลักการ คือ DPPH ในสารละลายเป็นอนุมูลอิสระที่มีความเสถียร สามารถดูดกลืนแสงได้ดีในช่วง 517 นาโนเมตร เมื่อทำปฏิกิริยากับสารทดสอบที่มีสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชัน ค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH จะลดลง เนื่องจากเกิดปฏิกิริยาระหว่างโมเลกุลของสารต้านออกซิเดชันและอนุมูลอิสระ โดยที่อนุมูลอิสระจะได้รับไฮโดรเจนอะตอม (hydrogen donation) (Appendix figure 3) สังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของปฏิกิริยาจากสีม่วงเป็นสีเหลือง ความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระรายงานค่าเทียบกับสารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์



Appendix figure 3. Reaction between DPPH• and antioxidant to form DPPH
ที่มา: Moon และ Shibamoto (2009)

วัสดุและอุปกรณ์

1. เครื่องวัดไมโครเพลท
2. ไมโครเพลท
3. ไมโครปิเปต

สารเคมี

1. DPPH ความเข้มข้น 0.15 มิลลิโมลต่อลิตร
2. absolute ethanol

การเตรียม DPPH stock solution ใน Absolute ethanol

เตรียมสารละลาย DPPH ให้มีความเข้มข้น 0.15 มิลลิโมลต่อลิตร โดยการชั่ง DPPH 0.0024 กรัม ละลายและปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตร ให้ครบ 100 มิลลิลิตร ด้วย absolute ethanol เก็บไว้ในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ $4 \pm 2^{\circ}$ซ (ควรเตรียมก่อนใช้ 2-3 ชั่วโมง)

การเตรียมสารมาตรฐาน

สารมาตรฐานที่ใช้คือโทรลอกซ์ ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของวิตามินอีที่ละลายน้ำได้ เตรียมให้มีความเข้มข้น 6 ระดับ คือ 10, 20, 30, 40, 50 และ 60 ไมโครโมลต่อลิตร ความเข้มข้นละ 5 มิลลิลิตร โดยใช้ absolute ethanol เป็นตัวทำละลาย

การเตรียมตัวอย่าง

นำสารสกัดหยาบของข่า ตะไคร้ พริกขี้หนู ใบมะกรูดและเครื่องต้มข่ามาเจือจาง ให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมโดยใช้เอธานอลความเข้มข้นร้อยละ 75

การทดสอบ

ปิเปตสารละลายตัวอย่างความเข้มข้นที่เหมาะสมปริมาตร 150 ไมโครลิตร ลงใน 96-well microplate แล้วเติมสารละลาย DPPH ที่มีความเข้มข้น 0.15 มิลลิโมลต่อลิตร ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ลงในสารตัวอย่างผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า พักไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate Reader (PowerWaveX, Biotek, U.S.A.)

หมายเหตุ

Blank sample คือ สารตัวอย่างปริมาตร 150 ไมโครลิตร + absolute ethanol ปริมาตร 150 ไมโครลิตร

Control คือ สารละลาย DPPH ปริมาตร 150 ไมโครลิตร + ethanol ความเข้มข้นร้อยละ 75 ปริมาตร 150 ไมโครลิตร

วิธีแปลผล

คำนวณความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ในรูปของสมมูลโทรลอกซ์ โดยใช้กราฟมาตรฐานของโทรลอกซ์ ดังสมการ

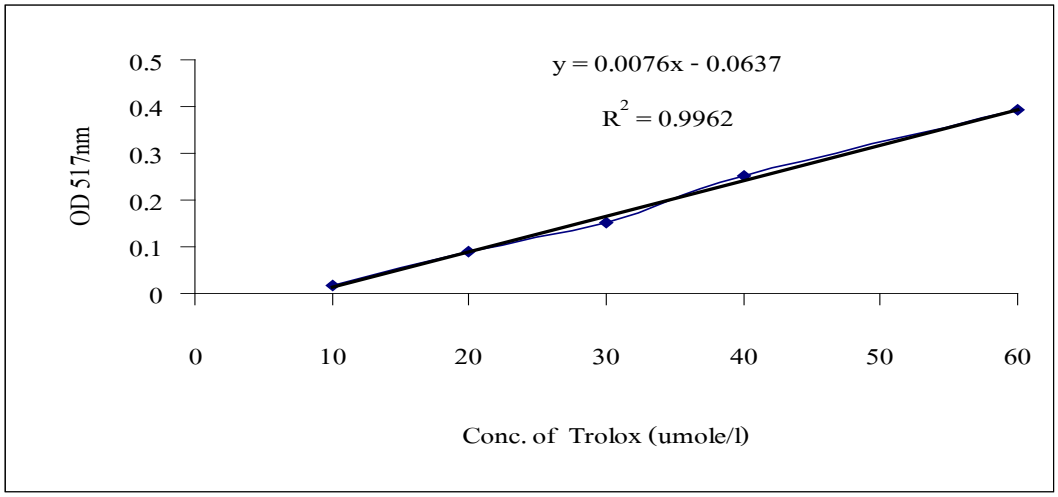
$$C = c \times V / m$$

โดยที่ C = ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH เทียบกับสารมาตรฐานโทรลอกซ์ (ไมโครโมลสมมูลย์ของโทรลอกซ์ต่อกรัมของน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง)

c = ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH เปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐานของโทรลอกซ์ (ไมโครโมลต่อลิตร) โดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร (OD517nm) ของ control ลบค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างและ blank sample ออก แล้วแทนค่าเป็นค่า y ในสมการที่ได้จากกราฟมาตรฐานของโทรลอกซ์ (Appendix figure 4) คำนวณหาค่า x

V = ปริมาตรของสารสกัด (ลิตร)

m = น้ำหนักแห้งของตัวอย่าง (กรัม)



Appendix figure 4. Standard antioxidants of trolox using DPPH radical scavenging method

ตัวอย่างการคำนวณสารสกัดหยาบของพริกขี้หนูด้วยน้ำ

นำพริกขี้หนูสด 81.31 กรัม สกัดด้วยน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร นำไประเหยสารสกัดออกไปร้อยละ 75 ได้สารสกัดหยาบของพริกขี้หนูด้วยน้ำ 200 มิลลิลิตร

คำนวณค่า c

จากกราฟ y = 0.0076x - 0.0637 ดังนั้น x = (y + 0.0637)/ 0.0076

OD517nm ของ control - ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง - blank sample = 0.2058

x = (0.2058 + 0.0637)/ 0.0076 = 35.4605 ไมโครโมลต่อลิตร

ปริมาตรของตัวอย่างพริกขี้หนู 200 มิลลิลิตร ทำให้เจือจาง 96 เท่า

คำนวณน้ำหนักแห้งของพริกขี้หนู

พริกขี้หนูสดมีของแข็งร้อยละ 22.7482

พริกขี้หนูสด 100 กรัม มีของแข็ง 22.7482 กรัม

พริกขี้หนูสด 81.31 กรัม มีของแข็ง (22.7482x81.31)/ 100 = 18.4966 กรัม

จากสูตร C = c × V/m

= (35.4605 ไมโครโมลต่อลิตร × 0.2 ลิตร × 96)/ 18.4966 กรัม

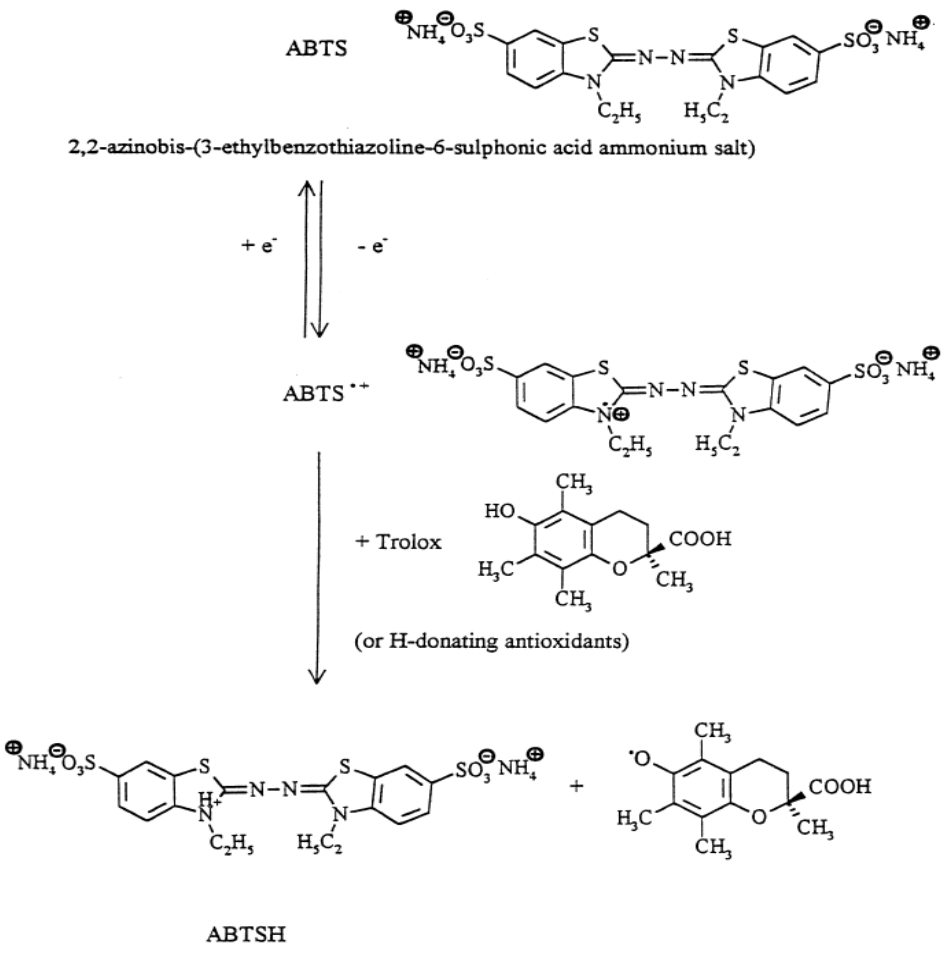
= 36.8090 ไมโครโมลต่อกรัม

ดังนั้น สารสกัดพริกขี้หนูด้วยน้ำ มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH เท่ากับ 36.8090 ไมโครโมลสมมูลย์ของโทรลอกซ์ต่อกรัมของน้ำหนักแห้งของพริกขี้หนู

ข3.2 ABTS radical cation scavenging assay (ดัดแปลงจาก Arnao *et al*., 2001)

หลักการ

เป็นการทดสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของสารที่ใช้ทดสอบ โดยอนุมูลอิสระต้นแบบที่ใช้ในการทดสอบคือ ABTS อนุมูลอิสระ ABTS เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของ ABTS กับโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต หลักการของวิธีนี้คืออนุมูลอิสระ ABTS มีสีเขียวแกมน้ำเงินสามารถดูดกลืนแสงได้ดีในช่วง 734 นาโนเมตร ในระบบที่มีสารต้านออกซิเดชัน สารดังกล่าวจะเป็นตัวรีดิวซ์อนุมูลอิสระ ABTS เกิดเป็นอนุมูลอิสระ ABTS ที่มีความเสถียรทำให้การดูดกลืนแสงในช่วง 734 นาโนเมตรลดลง (Appendix figure 5) รายงานความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS ในรูปของสมมูลโทรลอกซ์ (Re *et al*., 1999)



Appendix figure 5. ABTS radical cation scavenging

ที่มา: Lien และคณะ (1999)

วัสดุและอุปกรณ์

1. เครื่องวัดไมโครเพลท (microplate reader, PowerWaveX, Biotek, U.S.A.)
2. ไมโครเพลท (microplate)
3. ไมโครปิเปต (micropipette)

สารเคมี

1. ABTS ความเข้มข้น 7.4 มิลลิโมล/ลิตร
2. potassium persulfate ($K_2S_2O_8$) ความเข้มข้น 2.6 มิลลิโมล/ลิตร
3. absolute ethanol

การเตรียมสารละลายอนุมูลอิสระ **ABTS**

เตรียม ABTS ความเข้มข้น 0.014 โมลต่อลิตร โดยชั่ง ABTS มา 0.7682 กรัม ละลายและปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตร ให้ครบ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นเก็บไว้ในขวดแก้วสีชา ที่อุณหภูมิห้อง

เตรียมโพแทสเซียมเพอร์ซัลเฟต ($K_2S_2O_8$) ความเข้มข้น 4.8 มิลลิโมลต่อลิตร โดยชั่ง $K_2S_2O_8$ มา 0.1324 กรัม ละลายและปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตร ให้ครบ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น เก็บไว้ในขวดสีชา ที่อุณหภูมิห้อง

เตรียมสารละลายอนุมูลอิสระ ABTS โดยนำ ABTS ความเข้มข้น 0.014 โมลต่อลิตร ทำปฏิกิริยากับโพแทสเซียมเพอร์ซัลเฟต ความเข้มข้น 4.8 มิลลิโมลต่อลิตร ในอัตราส่วน 1:1 (ความเข้มข้นสุดท้ายของ ABTS และโพแทสเซียมเพอซัลเฟต คือ 7.0 และ 2.4 มิลลิโมลาร์) เก็บในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายที่ได้มาเจือจางด้วย absolute ethanol เพื่อให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1.1 ± 0.02 ที่ 734 นาโนเมตร ควรเตรียมทันทีก่อนใช้

การเตรียมสารมาตรฐาน

สารมาตรฐานที่ใช้คือโทรลอกซ์ เตรียมให้มีความเข้มข้น 8 ระดับ คือ 50, 60, 100, 300, 400 และ 500 ไมโครโมลต่อลิตร ความเข้มข้นละ 5 มิลลิลิตร โดยใช้ absolute ethanol เป็นตัวทำละลาย

การเตรียมตัวอย่าง

นำสารสกัดหยาบของข่า ตะไคร้ พริกขี้หนู ใบมะกรูดและเครื่องต้มข่ามาเจือจาง ให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วยเอธานอลความเข้มข้นร้อยละ 75

การทดสอบ

ปิเปตสารละลายตัวอย่างความเข้มข้นที่เหมาะสมปริมาตร 15 ไมโครลิตร ลงใน 96-well microplate ปิเปตสารละลายอนุมูลอิสระ ABTS ลงในสารตัวอย่างหลุมละ 285 ไมโครลิตร พักไว้ในที่มืดเป็นเวลา 120 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate Reader (PowerWaveX, Biotek, U.S.A.)

หมายเหตุ

Blank sample คือ สารตัวอย่างปริมาตร 15 ไมโครลิตร + absolute ethanol ปริมาตร 285 ไมโครลิตร

Control คือ ethanol ความเข้มข้นร้อยละ 75 ปริมาตร 15 ไมโครลิตร + สารละลายอนุมูลอิสระ ABTS ปริมาตร 285 ไมโครลิตร

วิธีแปลผล

คำนวณความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS ในรูปของสมมูลย์โทรลอกซ์ (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity; TEAC) โดยใช้กราฟมาตรฐานของโทรลอกซ์ ดังสมการ

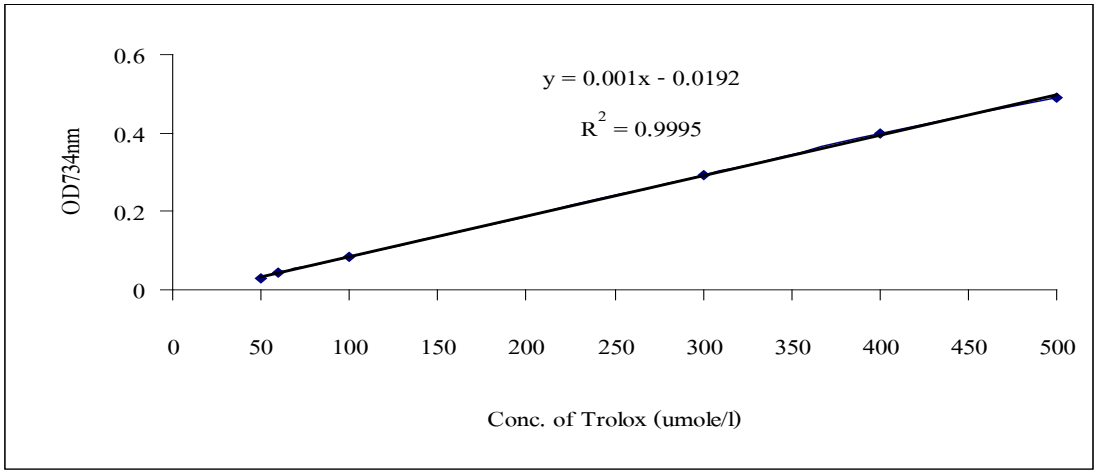
$$C = c \times V/m$$

โดยที่ C = ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS เทียบกับสารมาตรฐานโทรลอกซ์ (ไมโครโมลสมมูลย์ของโทรลอกซ์ต่อกรัมของน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง)

c = ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS เปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐานของโทรลอกซ์ (ไมโครโมลต่อลิตร) โดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร (OD734nm) ของ control ลบค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างและ blank sample ออก แล้วแทนค่าเป็นค่า y ในสมการที่ได้จากกราฟมาตรฐานของโทรลอกซ์ (Appendix figure 6) คำนวณหาค่า x

V = ปริมาตรของสารสกัด (ลิตร)

m = น้ำหนักแห้งของตัวอย่าง (กรัม)



Appendix figure 6. Standard antioxidants of Trolox using ABTS radical cation scavenging method

ตัวอย่างการคำนวณสารสกัดหยาบของพริกขี้หนูด้วยน้ำ

นำพริกขี้หนูสด 81.31 กรัม สกัดด้วยน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร นำไประเหยสารสกัดออกไปร้อยละ 75 ได้สารสกัดหยาบของพริกขี้หนูด้วยน้ำ 200 มิลลิลิตร

คำนวณค่า c

จากกราฟ y = 0.001x-0.0192 ดังนั้น x = (y + 0.0192)/ 0.001

OD734nm ของ control - ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง - blank sample = 0.475

x = (0.475 + 0.0192)/ 0.001 = 494.2 ไมโครโมลต่อลิตร

ปริมาตรของตัวอย่างพริกขี้หนู 200 มิลลิลิตร ทำให้เจือจาง 48 เท่า

คำนวณน้ำหนักของพริกขี้หนูแห้ง

พริกขี้หนูสดมีของแข็งร้อยละ 22.7482

พริกขี้หนูสด 100 กรัม มีของแข็ง 22.7482 กรัม

พริกขี้หนูสด 81.31 กรัม มีของแข็ง (22.7482 × 81.31)/ 100 = 18.4966 กรัม

จากสูตร C = c × V/m

= (494.2 ไมโครโมลต่อลิตร × 0.2 ลิตร × 48)/ 18.4966 กรัม

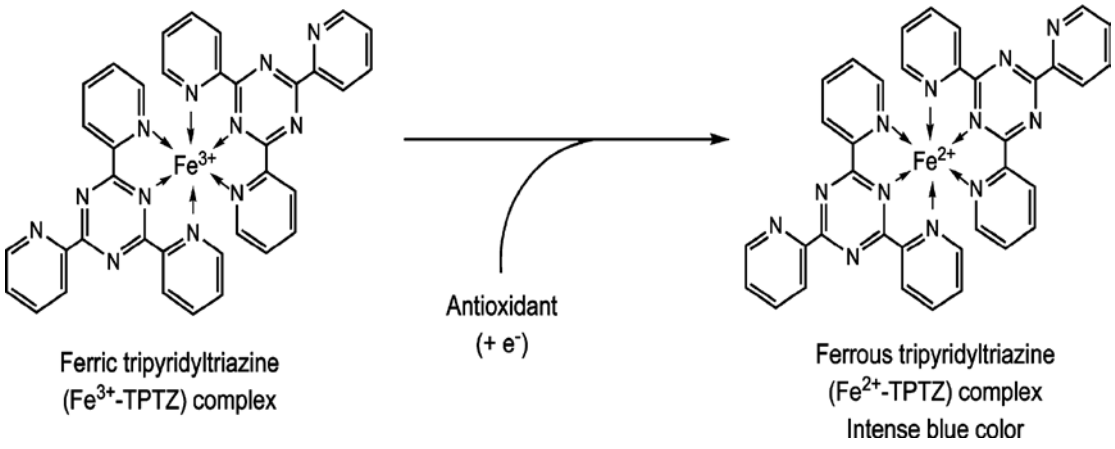
= 256.4969 ไมโครโมลต่อกรัม

ดังนั้น สารสกัดพริกขี้หนูด้วยน้ำ มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS เท่ากับ 256.4969 ไมโครโมลสมมูลย์ของโทรลอกซ์ต่อกรัมของพริกขี้หนูแห้ง

ข3.3 Ferric reducing antioxidant power assay (ดัดแปลงจาก **Benzie and Strain, 1996)**

หลักการ

เป็นการวัดความสามารถในการรีดิวซ์ของสารที่มีสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชัน โดยการรีดิวซ์เฟอร์ริคไอออน (Fe^{3+}) ซึ่งอยู่ในรูปสารประกอบเชิงซ้อนของ Fe^{3+}-TPTZ (ferric tripyridyl triazine) ไปเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กเฟอร์รัส Fe^{2+}-TPTZ (ferrous tripyridyl triazine) ซึ่งเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีน้ำเงิน (Appendix figure 7) และสามารถดูดกลืนแสงได้ดีในช่วง 593 นาโนเมตร ภายใต้สภาวะที่มีพีเอชต่ำ (pH~3.6)



Appendix figure 7. Formation of (Fe^{2+}-TPTZ) complex from ($Fe3^{+}$-TPTZ) complex by antioxidant

ที่มา: Moon และ Shibamoto (2009)

วัสดุและอุปกรณ์

1. เครื่องวัดไมโครเพลท (microplate reader, PowerWaveX, Biotek, U.S.A.)
2. ไมโครเพลท (microplate)
3. ไมโครปิเปต (micropipette)

สารเคมี

1. โซเดียมอะซีเตตไตรไฮเดรต ($CH_3COONa.3H_2O$) 300 มิลลิโมลต่อลิตร
2. กรดอะซิติก ($C_2H_4O_2$)
3. TPTZ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลต่อลิตร
4. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลต่อลิตร
5. เฟอร์ริคคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($FeCl_3.6H_2O$) 20 มิลลิโมลต่อลิตร

การเตรียมสารละลาย FRAP

เตรียมสารละลาย FRAP โดยการนำอะซีเตตบัฟเฟอร์ 300 มิลลิโมลต่อลิตรผสมกับ TPTZ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลต่อลิตร ในกรดไฮโดรคลอริก และเฟอร์ริคคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต 20 มิลลิโมลต่อลิตร มาทำปฏิกิริยากันในอัตราส่วน 10:1:1 จากนั้นบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 30 นาที

การเตรียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ 300 มิลลิโมลต่อลิตร (พีเอช 3.6)

ชั่งโซเดียมอะซีเตตไตรไฮเดรตมา 3.1 กรัม ละลายในกรดอะซิติก ปริมาตร 16 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตร ให้ครบ 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

การเตรียม TPTZ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลต่อลิตร ในกรดไฮโดรคลอริก 40 มิลลิโมลต่อลิตร

เตรียมกรดไฮโดรคลอริก 40 มิลลิโมลต่อลิตร โดยการปิเปตกรดไฮโดรคลอริกมา 0.3312 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตร ให้ครบ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น ชั่ง TPTZ มา 0.3123 กรัม ละลายในไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 40 มิลลิโมลต่อลิตร และปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตร ให้ครบ 100 มิลลิลิตร ด้วยไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 40 มิลลิโมลต่อลิตร

การเตรียมเฟอร์ริคคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต 20 มิลลิโมลต่อลิตร

ชั่งเฟอร์ริคคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต มา 0.5406 กรัม ละลายและปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตร ให้ครบ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

การเตรียมสารมาตรฐานโทรลอกซ์

สารมาตรฐานที่ใช้คือโทรลอกซ์ เตรียมให้มีความเข้มข้น 7 ระดับ คือ 50, 60, 100, 200, 300, 400 และ 600 ไมโครโมลต่อลิตร ความเข้มข้นละ 5 มิลลิลิตร โดยใช้ absolute ethanol เป็นตัวทำละลาย

การเตรียมตัวอย่าง

นำสารสกัดหยาบของข่า ตะไคร้ พริกขี้หนู ใบมะกรูดและเครื่องต้มข่ามาเจือจาง ให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม ด้วยเอธานอลความเข้มข้นร้อยละ 75

การทดสอบ

ปิเปตสารละลายตัวอย่างความเข้มข้นที่เหมาะสมปริมาตร 15 ไมโครลิตร ลงใน 96-well microplate ปิเปตสารละลาย FRAP ลงในสารตัวอย่างทุกหลุม หลุมละ 285 ไมโครลิตร พักไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate Reader (PowerWaveX, Biotek, U.S.A.)

หมายเหตุ

Blank sample คือ สารตัวอย่าง 15 ไมโครลิตร + น้ำกลั่น 285 ไมโครลิตร

วิธีแปลผล

คำนวณความสามารถในการให้อิเล็คตรอนในระบบ FRAP ในรูปของสมมูลโทรลอกซ์ โดยใช้กราฟมาตรฐานของโทรลอกซ์ ดังสมการ

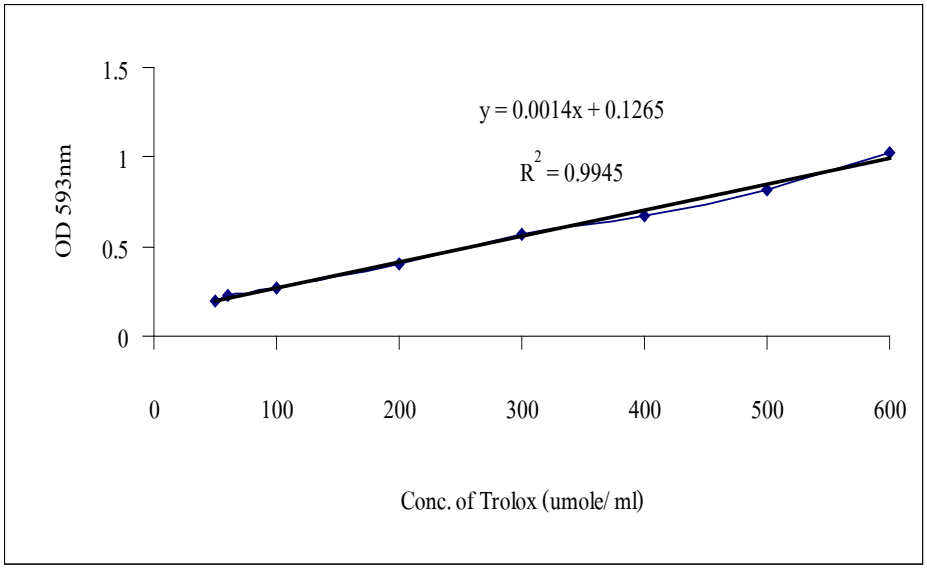
$$C = c \times V/m$$

โดยที่ C = ความสามารถในการให้อิเล็คตรอนในระบบ FRAP เทียบกับสารมาตรฐานโทรลอกซ์ (ไมโครโมลสมมูลย์ของโทรลอกซ์ต่อกรัมของน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง)

c = ความสามารถในการให้อิเล็คตรอนในระบบ FRAP เปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐานของโทรลอกซ์ (ไมโครโมลต่อลิตร) โดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร (OD593nm) ของตัวอย่างลบค่าการดูดกลืนแสงของ blank sample ออก แล้วแทนค่าเป็นค่า y ในสมการที่ได้จากกราฟมาตรฐานของโทรลอกซ์ (Appendix figure 8) คำนวณหาค่า x

V = ปริมาตรของสารสกัด (ลิตร)

m = น้ำหนักแห้งของตัวอย่าง (กรัม)



Appendix figure 8. Standard antioxidants of Trolox using Ferric reducing antioxidant power method

ตัวอย่างการคำนวณสารสกัดหยาบของพริกขี้หนูด้วยน้ำ

นำพริกขี้หนูสด 81.31 กรัม สกัดด้วยน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร นำไประเหยสารสกัดออกไปร้อยละ 75 ได้สารสกัดหยาบของพริกขี้หนูด้วยน้ำ 200 มิลลิลิตร

คำนวณค่า c

จากกราฟ y = 0.0014x + 0.1265 ดังนั้น x = (y - 0.1265)/ 0.0014

OD593nm ของตัวอย่าง – blank sample = 0.279

x = (0.279 - 0.1265)/ 0.0014 = 108.9285 ไมโครโมลต่อลิตร

ปริมาตรของตัวอย่างพริกขี้หนู 200 มิลลิลิตร ทำให้เจือจาง 32 เท่า

คำนวณน้ำหนักแห้งของพริกขี้หนู

พริกขี้หนูสดมีของแข็งร้อยละ 22.7482

พริกขี้หนูสด 100 กรัม มีของแข็ง 22.7482 กรัม

พริกขี้หนูสด 81.31 กรัม มีของแข็ง (22.7482 × 81.31)/ 100 = 18.4966 กรัม

จากสูตร C = c × V/m

= (108.929 ไมโครโมลต่อลิตร × 0.2 ลิตร × 32)/ 18.4966 กรัม

= 37.690 ไมโครโมลต่อกรัม

ดังนั้น สารสกัดพริกขี้หนูด้วยน้ำ มีความสามารถในการให้อิเล็คตรอนในระบบ FRAP เท่ากับ 37.690 ไมโครโมลสมมูลย์ของโทรลอกซ์ต่อกรัมของน้ำหนักแห้งของพริกขี้หนู

ข4. การวิเคราะห์ค่า TVB และค่า TMA (Conway and Byrne, 1936)

อุปกรณ์

1. จาน Conway unit
2. Volumetric pipette
3. Micro burette
4. ถ้วยบด
5. กระดาษกรอง
6. กรวย

สารเคมี

1. Mixed indicator: ละลาย 0.01 กรัม ของ Bromocresol green และ 0.02 กรัม methyl red ด้วย ethanol แล้วปรับจนได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร
2. Inner ring solution L: ละลาย 10 กรัม ของ Boric acid ใน 200 มิลลิลิตร ethanol แล้วเติม 10 มิลลิลิตร Mix indicator (จากข้อ 1) ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่นที่กำจัดอิออนแล้ว ซึ่งจะได้สารละลายสีชมพู
3. HCl 0.02 นอร์มอล
4. Saturated K_2CO_3 solution: ละลาย 60 กรัม K_2CO_3 ด้วย 50 มิลลิลิตร น้ำกลั่น ต้มประมาณ 10 นาที ทำให้เย็นแล้วกรองผ่านกระดาษกรอง
5. TCA เข้มข้นร้อยละ 4: ละลาย 40 กรัม trichloro acetic acid (CCl_3COOH) ใน 960 มิลลิลิตร น้ำกลั่น
6. 10% formaldehyde solution: โดยเติม 10 กรัม $MgCO_3$ ลงใน 100 มิลลิลิตร Formalin

(formaldehyde solution เข้มข้นร้อยละ 35) เขย่าให้เข้ากัน กรองผ่านกระดาษกรอง แล้วทำให้เจือจาง 3 เท่า ด้วยน้ำกลั่น

การสกัด

ชั่งตัวอย่าง 2 กรัม บดผสมกับ TCA เข้มข้นร้อยละ 4 ปริมาตร 8 มิลลิลิตร ในถ้วยบด บดให้ทั่วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 41 (หรือเข้าเครื่องแยกเหวี่ยงที่ 3000 rpm เวลา 10 นาที) ปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาค่า TVB-N และค่า TMA-N หรือเก็บในตู้เย็นเพื่อรอวิเคราะห์ (ควรปิดให้แน่น) ถ้าจำเป็นอาจเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

วิธีการวิเคราะห์ค่า TVB

1. ดูดสารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่ชั้นนอกของ Conway unit
2. ดูด inner ring solution 1 มิลลิลิตร ลงที่วงกลมชั้นในของจาน Conway unit
3. เอียงจาน Conway unit
4. ดูด Saturated K_2CO_3 1 มิลลิลิตร ใส่ชั้นนอก แต่ให้อยู่คนละด้านกับสารละลายตัวอย่างตามข้อ 1
5. ปิดฝาจาน Conway unit เขย่าเบาๆ ให้ Potassium carbonate ผสมกับสารละลายตัวอย่าง ระวังอย่าให้เกิดการผสมกับ indicator ที่วงกลมชั้นในเป็นอันขาด
6. บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 45-60 นาที หรือทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3 ชั่วโมง
7. เปิดฝา Conway unit แล้วไตรเตรทวงกลมชั้นในด้วย HCl 0.02 นอร์มอล จนกระทั่งสีเขียวจางหายไป จดปริมาณการใช้ HCl ไว้คำนวณ
8. ทำ blank โดยใช้ TCA เข้มข้นร้อยละ 4 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แทนสารสกัดตัวอย่าง แล้วดำเนินตามวิธีการตั้งแต่ข้อ 1-8

การคำนวณ

$$\text{TVB (มก.ไนโตรเจน/100 กรัมตัวอย่าง)} = \frac{N \times 14 \times (A-B) \times V \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}}$$

N = นอร์มัลลิตีของ HCl ที่ใช้ไตรไตรท

A = มิลลิลิตร HCl ที่ใช้ไตรเตรทตัวอย่าง

B = มิลลิลิตร HCl ที่ใช้ไตรเตรท blank

V = ปริมาตรรวมของตัวอย่างและ TCA ที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่าง

วิธีการวิเคราะห์ค่า TMA

1. ทำเช่นเดียวกับการวิเคราะห์ TVB ตั้งแต่ 1-2
2. เติม formaldehyde solution เข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับตัวอย่าง
3. ดูด saturated K_2CO_3 1 มิลลิลิตร ใส่ชั้นนอก ปิดฝาแล้วค่อยๆ หมุนสารละลายผสมกัน
4. ทิ้งไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1-2 ชั่วโมง
5. ไตรเตรทส่วนที่อยู่ในวงแหวนในด้วย HCl 0.02 นอร์มอล จนกระทั่งสีเขียวเปลี่ยนเป็นสีชมพู
6. ทำ blank โดยใช้ TCA เข้มข้นร้อยละ 4 จำนวน 1 มิลลิลิตร ดำเนินการเช่นเดียวกับตัวอย่าง

การคำนวณ

$$\text{TMA (มก.ไนโตรเจน/100 กรัมตัวอย่าง)} = \frac{N \times 14 \times (C-B) \times V \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}}$$

N = นอร์มัลลิตีของ HCl ที่ใช้ไตรไตรท

C = มิลลิลิตร HCl ที่ใช้ไตรเตรทตัวอย่าง

B = มิลลิลิตร HCl ที่ใช้ไตรเตรท blank

V = ปริมาตรรวมของตัวอย่างและ TCA ที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่าง

ข5. การวิเคราะห์ค่า TBARS (Egan *et al.*, 1981)

อุปกรณ์

1. ชุดกลั่น (flask, condenser, receiver)
2. ลูกแก้ว
3. เตาไฟฟ้า
4. ปิเปต
5. หลอดทดสอบชนิดมีจุก
6. Spectrophotometer

สารเคมี

1. 4 N Hydrochloric acid

2. Antifoam liquid
3. Thiobarbituric acid reagent – ละลาย 0.2883 กรัม ใน 100 มล. ของ 90% glacial acetic acid

วิธีการ

1. ปั่นตัวอย่าง 10 กรัม กับน้ำกลั่น 50 มล. เป็นเวลา 2 นาที แล้วถ่ายลงในขวดกลั่น ใช้น้ำ 47.5 มล. ล้างภาชนะที่ใส่ตัวอย่างแล้วเทลงขวด
2. เติม 2.5 มล. 4 N HCl (pH ควรจะเป็น 1.5) และเติมลูกแก้วและ antifoam
3. กลั่นให้ได้ของเหลว 50 มล. ภายใน 10 นาที
4. ดูดสารที่กลั่นได้ 5 มล. ลงในหลอดทดสอบที่มีจุกปิด
5. เติม 5 มล. TBA reagent เขย่าและให้ความร้อนด้วยน้ำเดือดเป็นเวลา 35 นาที
6. ทำ blank โดยวิธีเดียวกัน โดยใช้ 5 มล. ของน้ำให้ความร้อน 35 นาที
7. ทำตัวอย่างและ blank ให้เย็นแล้ววัดค่า OD ที่ 532 nm

การคำนวณ

TBA value (mg malonaldehyde/kg sample) = 7.8 × A

(A = absorbance of sample ที่หักค่า blank แล้ว)

<u>หมายเหตุ</u> ต้องปฏิบัติตามโดยเคร่งครัดจึงจะใช้ค่า 7.8 เป็น factor ได้

ภาคผนวก ค การวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์

ค1. การวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total Viable Count) ได้แก่ จุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิต่ำ จุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง และจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการอากาศในการเจริญด้วยเทคนิค pour plate (BAM, 2001)

สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Plate count agar (PCA)
2. peptone water ร้อยละ 0.1

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่างเครื่องต้มข่า 25 กรัม ลงในถุงที่มี peptone water ร้อยละ 0.1 ที่ปลอดเชื้อจำนวน 225 มิลลิลิตร แล้วทำให้เข้ากันโดยการเขย่าเป็นเวลา 1 นาที
2. ทำการเจือจางให้ 10^{-1}-10^{-6} โดยใช้ peptone water ร้อยละ 0.1
3. ดูดตัวอย่างความเจือจางที่เหมาะสมจากข้อ 1.2 อย่างละ 1.0 มิลลิลิตร (ทำ 3 ซ้ำ) ลงในจานเพาะเชื้อ ที่ฆ่าเชื้อแล้ว
4. เทอาหาร PCA ซึ่งกำลังหลอมเหลวและมีอุณหภูมิประมาณ 45 °ซ ลงในจานเพาะเชื้อจานละประมาณ 15-20 มิลลิลิตร
5. เขย่าจานเพาะเชื้อให้อาหารเลี้ยงเชื้อผสมกับตัวอย่างเครื่องต้มข่าที่เจือจาง โดยการหมุนจานเพาะเชื้อในทิศตามเข็มนาฬิกา 5 ครั้ง ทวนเข็มนาฬิกา 5 ครั้ง ทำอย่างระมัดระวังและรวดเร็วเพื่อไม่ให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัวก่อน
6. ตั้งทิ้งไว้ให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว
7. สำหรับจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการอากาศในการเจริญ นำไปใส่ใน anaerobic jar แล้วกำจัดอากาศออก
8. บ่มเพาะเชื้อที่ 4 °ซ (จุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิต่ำ) และ 35-37 °ซ (จุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง และจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการอากาศในการเจริญ) ในลักษณะคว่ำจานเพาะเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง
9. ตรวจนับจำนวนโคโลนีจากจานเพาะเชื้อประมาณ 30- 300 โคโลนี รายงานผลเป็นจำนวนโคโลนีต่อกรัมของตัวอย่าง

โคโลนีต่อกรัมของตัวอย่าง = ค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนี × ระดับความเจือจาง

ค2. การวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียแลคติก (BAM, 2001)

สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Lactobacilli MRS agar
2. แคลเซียมคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 1
3. peptone water ร้อยละ 0.1

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่างเครื่องต้มข่า 25 กรัม ลงในถุงที่มี peptone water ร้อยละ 0.1 ที่ปลอดเชื้อจำนวน 225 มิลลิลิตร แล้วทำให้เข้ากันโดยการเขย่าเป็นเวลา 1 นาที
2. ทำการเจือจางให้เป็น 10^{-1}-10^{-6} โดยใช้ peptone water ร้อยละ 0.1
3. ดูดตัวอย่างความเจือจางที่เหมาะสมจากข้อ 1.2 อย่างละ 0.1 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร MRS agar ที่ฆ่าเชื้อแล้ว จำนวน 3 ซ้ำ
4. ใช้แท่งแก้งปราศจากเชื้อเกลี่ยตัวอย่างให้กระจายทั่วจาน
5. บ่มเพาะเชื้อที่ 35-37°ซ ในลักษณะคว่ำจานเพาะเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในขวดโหลแก้วที่ปราศจากอากาศ
6. ตรวจนับจำนวนโคโลนีจากจานเพาะเชื้อประมาณ 30-300 โคโลนี รายงานผลเป็นจำนวนโคโลนีต่อกรัมของตัวอย่าง

โคโลนีต่อกรัมของตัวอย่าง = ค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนี × ระดับความเจือจาง

ค3. การวิเคราะห์ยีสต์และรา (BAM, 2001)

สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Potato dextrose agar (PDA)
2. peptone water ร้อยละ 0.1
3. tartaric acid ร้อยละ 10

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่างเครื่องต้มข่า 25 กรัม ลงในถุงที่มี peptone water ร้อยละ 0.1 ที่ปลอดเชื้อจำนวน 225 มิลลิลิตร แล้วทำให้เข้ากันโดยการเขย่าเป็นเวลา 1 นาที
2. ทำการเจือจางให้เป็น 10^{-1}-10^{-6} โดยใช้ peptone water ร้อยละ 0.1
3. ดูดตัวอย่างความเจือจางที่เหมาะสมจากข้อ 1.2 อย่างละ 0.1 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร PDA ที่ฆ่าเชื้อแล้ว จำนวน 3 ซ้ำ
4. ใช้แท่งแก้งปราศจากเชื้อเกลี่ยตัวอย่างให้กระจายทั่วจาน
5. บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ในลักษณะหงายจานเพาะเชื้อเป็นเวลา 5-7 วัน
6. ตรวจนับจำนวนโคโลนีจากจานเพาะเชื้อประมาณ 30-300 โคโลนี รายงานผลเป็นจำนวนโคโลนีต่อกรัมของตัวอย่าง

โคโลนีต่อกรัมของตัวอย่าง = ค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนี × ระดับความเจือจาง

ค4. การวิเคราะห์ปริมาณ Coliforms และ *E. coli* (BAM, 2001)

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. EC broth (พร้อม Durham)
2. Lauryl sulphate tryptose broth (LST)
3. peptone water ร้อยละ 0.1

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่างเครื่องต้มข่า 25 กรัม ลงในถุงที่มี peptone water ร้อยละ 0.1 ที่ปลอดเชื้อจำนวน 225 มิลลิลิตร แล้วทำให้เข้ากันโดยการเขย่าเป็นเวลา 1 นาที
2. ทำการเจือจางให้เป็น 10^{-1}-10^{-3} โดยใช้ 0.1% peptone water
3. ดูดตัวอย่างที่มีความเจือจาง 10^{-1}-10^{-3} อย่างละ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดสอบที่มี durham tube และ LST 10 มิลลิลิตร ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ความเจือจางละ 3 หลอด
4. บ่มเพาะเชื้อที่ 35 ^{0}ซ เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง
5. ตรวจผลครั้งแรกเมื่อครบ 24 ชั่วโมง โดยสังเกตฟองอากาศใน durham tube สำหรับหลอดที่ยังไม่ให้ผล ทำการบ่มเพาะเชื้อต่อไปจนครบ 48 ชั่วโมง รายงานผลเป็น MPN โคลิฟอร์มแบคทีเรียขั้นแรก (presumptive)
6. เลือกหลอดที่เกิดแก๊สมาทำ Confirmed test โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้วจุ่มลงในหลอดที่เลือกไว้ แล้วเขี่ยลงในหลอดเลี้ยงเชื้อที่มี EC broth พร้อม Durham tube
7. บ่มเพาะเชื้อ EC broth ที่ 44.5 ± 0.2 เป็นเวลา 48 ± 2 ชั่วโมง
8. คำนวณหา MPN ของ *E. coli* ต่อกรัมอาหาร โดยดูจากจำนวนหลอด LST ที่ผลิตแก๊ส

ค5. การวิเคราะห์ *S. aureus* (Speck, 1976)

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Baird parker medium (BP)
2. potassium tellurite ร้อยละ 0.1
3. peptone water ร้อยละ 0.1

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่าง 25 กรัม ลงในถุงที่มี peptone water ร้อยละ 0.1 ที่ปลอดเชื้อจำนวน 225 มิลลิลิตร แล้วทำให้เข้ากันโดยการเขย่าเป็นเวลา 1 นาที
2. ทำการเจือจางให้เป็น 10^{-1}-10^{-3} โดยใช้ peptone water ร้อยละ 0.1
3. ดูดตัวอย่างที่มีระดับความเจือจางที่เหมาะสมจำนวน 0.1 มิลลิลิตร ลงบน BP agar plate จำนวน 3 ซ้ำ
4. ใช้แท่งแก้งปราศจากเชื้อเกลี่ยตัวอย่างให้กระจายทั่วจาน
5. บ่มเพาะเชื้อที่ 35 ^{0}ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
6. ตรวจสอบลักษณะโคโลนี เลือกนับโคโลนีที่มีสีดำ ขอบขาว และแวววาว รอบโคโลนีมีบริเวณใส (clear zone) รายงานผลเป็นจำนวนโคโลนีต่อกรัมของตัวอย่าง

โคโลนีต่อกรัมของตัวอย่าง = ค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนี × ระดับความเจือจาง

ค6. การวิเคราะห์ปริมาณ *S. aureus* (BAM, 2001)

ในวิธีนี้จะเหมาะสมต่อการวิเคราะห์เชื้อ S. aureus ในอาหารที่มีเชื้อไม่เกิน 100 เซลล์/กรัม โดยมีขั้นตอนการวิเคราะห์ ดังนี้ (Bennett and Lancette; 2001)

อุปกรณ์

1. Loop และ needle
2. หลอดทดสอบ
3. ตู้ larminar flow สำหรับทำให้ผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง
4. แท่งแก้วงอปลอดเชื้อมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4 มิลลิเมตร ยาว 15-20 เซนติเมตร
5. ปิเปตขนาด 0.1 และ 1.0 มิลลิลิตร

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. Baird-Parker medium (BPA)
2. Trypticase (tryptic) soy agar (TSA)
3. Brain heart infusion (BHI) broth
4. Coagulase plasma (rabbit) ใน EDTA
5. Toluidine blue-DNA agar

6. Lysostaphin
7. Tryptone yeast extract agar
8. Paraffin oil ปลอดเชื้อ
9. 0.02 M phosphate-saline buffer ที่เติม 1 เปอร์เซ็นต์ NaCl
10. Catalase test

การเตรียมตัวอย่าง

ทำการเจือจางตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารที่จะทดสอบให้ได้จำนวนโคโลนีอยู่ในช่วงระหว่าง 20-200 โคโลนี

การแยกเชื้อและการตรวจนับเชื้อ *S. aureus*

1. ปิเปตสารละลายที่จะทดสอบมาความเข้มข้นละ 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Baird Parker agar โดยแบ่งปริมาตรของสารละลาย 1 มิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 จาน (0.3 0.3 และ 0.4 มิลลิลิตร) จากนั้นเกลี่ยสารละลายให้ทั่วบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้แท่งแก้วงอ วางจานอาหารหงายไว้จนกว่าผิวหน้าจะแห้ง (ประมาณ 10 นาที) ถ้าผิวหน้ายังไม่แห้งให้นำไปบ่มในตู้ larminar flow เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อผิวหน้าแห้งให้คว่ำจานอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปบ่ม 45-48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เลือกจานอาหารที่มีปริมาณโคโลนี 20-200 โคโลนี นำไปนับโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะที่น่าจะเป็น S. aureus ซึ่งเมื่อเจริญบนอาหาร Baird Parker agar จะมีโคโลนีกลมนูน ขอบเรียบ ผิวมันเป็นวาว มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2-3 มิลลิเมตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีโคโลนีหนาแน่นเกินไป มีโคโลนีสีดำ ขอบโคโลนีเป็นสีขาว รอบโคโลนีจะมีโซนใส และโคโลนีจะเหนียวเมื่อนำเข็มเขี่ยเชื้อไปแตะ
2. นับและเก็บโคโลนี S. aureus ถ้าพบว่าโคโลนีที่สังเกตมีลักษณะเป็นโคโลนี S. aureus นับจำนวนโคโลนีของแต่ละชนิดและจดบันทึก ถ้ามีโคโลนีน้อยกว่า 20 โคโลนี ยังสามารถใช้นับได้ แต่หากจำนวนโคโลนีมีมากว่า 200 โคโลนี ให้นับในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเจือจางสูงขึ้น แต่ไม่ต้องนับลักษณะโคโลนีที่ไม่ใช่ S. aureus เลือกมากกว่า 1 โคโลนี ในแต่ละชนิดที่นัยแล้ว และนำไปทดสอบการเกิด coagulase เมื่อพบผลเป็นบวกแสดงว่าเป็น S. aureus นำไปคำนวณค่า S. sureus ทั้งหมดต่อกรัมของอาหารเริ่มต้น

การทดสอบ Coagulase

นำโคโลนีที่สงสัยว่าเป็น S. aureus มาถ่ายลงในหลอด BHI broth ที่มี 0.2-0.3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน และถ่ายเชื้อจาก BHI broth ลงใน TSA slant เพื่อเก็บเชื้อไว้ หรืออาจต้องทดสอบอีก

ครั้ง นำ BHI และ TSA ไปบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เติม coagulase plasma ที่มี EDTA 0.5 มิลลิลิตร ลงใน BHI broth และผสมให้เข้ากันนำไปบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส อ่านผลการแข็งตัวของ plasma ภายใน 6 ชั่วโมง จะยืนยันได้ว่าเป็น S. aureus เมื่อเกิดการแข็งตัวอย่างสมบูรณ์ (+4) หากผลเป็น +2 และ +3 จะต้องทำการทดสอบยืนยันในขั้นต้นต่อไปอีก ย้อมแกรมโคโลนีทั้งหมดที่สงสัยว่าเป็น S. aureus และการทดสอบ agglutination เป็นอีกขั้นตอนหนึ่งในการทดสอบแทนการทดสอบ coagulase ถ้าต้องการผลรวดเร็ว

การทดสอบอื่นๆ เพื่อเป็นการตรวจสอบยืนยันให้แน่ใจว่าเป็น S. aureus

1. ทดสอบเอนไซม์ catalase ใช้เชื้อจาก TSA slant มาทดสอบเอนไซม์ catalase โดยใช้ loop แตะเชื้อแล้วป้ายบนกระจกสไลด์ หรือ ในจานเลี้ยงเชื้อ จากนั้นหยด H_2O_2 ลงไปแล้วสังเกตแก๊สที่เกิดขึ้นอ่านผลเป็นบวก

2. ทดสอบการใช้กลูโคสในสภาวะไร้อากาศ (Anaerobic utilization of glucose) โดยถ่ายเชื้อลงในหลอดทดลองที่มี carbohydrate fermentation medium + glucose (0.5 เปอร์เซ็นต์) ปิดทับผิวหน้าของอาหารด้วย agar หรือพาราฟินปลอดเชื้อหนา 25 มิลลิลิตร บ่มเป็นเวลา 5 วัน ที่ 37 องศาเซลเซียส จะเกิดการสร้างกรด หากมีการเปลี่ยนสีของสารบ่งชี้เป็นสีเหลืองทั้งหลอดแสดงว่าเป็น S. aureus

3. ทดสอบการใช้แมนนิทอลในสภาพไร้อากาศ (Anaerobic utilization of mannitol) เหมือนการทดสอบในข้อ 2 ข้างต้น แต่ใช้แมนนิทอลแทนกลูโคส

4. ทดสอบความไวต่อ Lysostaphin โดยถ่ายเชื้อที่เป็นโคโลนีเดี่ยวจากจานอาหารเลี้ยงเชื้อลงใน 0.2 มิลลิลิตร phosphate-saline buffer ผสมให้เข้ากัน และถ่ายสารละลายทั้งหมดครึ่งหนึ่งลงไปในหลอดทดลองอีกหลอด เติม phosphate-saline buffer 0.1 มิลลิลิตร เพื่อใช้เป็น control เติม 0.1 มิลลิลิตร lysostaphin (ละลายใน 0.02 M phosphate-saline buffer ที่มี 1 เปอร์เซ็นต์ NaCl) ลงในหลอดเดิมเพื่อให้ได้ความเข้มข้นของ lysostaphin 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร บ่มหลอดทั้ง 2 ที่ 35 องศาเซลเซียส ไม่เกิน 2 ชั่วโมง ถ้าสารละลายผสมนี้ไม่ขุ่นจะให้ผลเป็นบวก ถ้าหากขุ่นภายใน 2 ชั่วโมงให้ผลเป็นลบ แสดงว่าไม่ใช่ S. aureus

5. การสร้างเอนไซม์ nuclease ซึ่งทนอุณหภูมิสูง (Thermostable nuclease production) การทดลองนี้เป็นการยืนยันโดยมีความจำเพาะเช่นเดียวกับการทดสอบ coagulase เพราะเป็นผลทำให้เกิดการเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีชมพูอ่อน การทดสอบนี้ไม่สามารถใช้แทนการทดสอบ coagulase แต่จะใช้เพื่อเป็นการยืนยันมากกว่า โดยเฉพาะอย่างยิ่ง coagulase ที่ให้ผลปฏิกิริยา +2

วิธีการทดสอบเอนไซม์นี้ ต้องเตรียมสไลด์ที่เคลือบด้วย toluidine blue-deoxyribo nucleic acid agar ปริมาตร 3 มิลลิลิตร บนผิวขิง micro slide เมื่ออาหารแข็งแล้วตัดให้เป็นหลุมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร 10-12 ช่อง ต่อ 1 สไลด์ และดูดวุ้นออก เติม 0.01 มิลลิลิตรของสารแขวนลอย (suspension) ที่ใช้ทดสอบ coagulase ที่ต้มจนเดือด 15 นาที ใน water bath เติมลงในหลุมของสไลด์ที่เตรียมไว้ บ่มสไลด์ใน moist chamber นาน 4 ชั่วโมง ที่ 35 องศาเซลเซียส สังเกตโซนสีชมพูขนาดไม่น้อยกว่า 1 มิลลิเมตร จากขอบของหลุมให้ผลของปฏิกิริยาเป็นบวก (Bennett และ Lancette, 1998)

ค7. การวิเคราะห์ *B. cereus* (BAM, 2001)

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Manitol-Egg Yolk Polymyxin agar (MYP)
2. peptone water ความเข้มข้นร้อยละ 0.1
3. ไข่แดง (egg yolk)
4. NaCl ความเข้มข้นร้อยละ 0.85
5. เอธานอลความเข้มข้นร้อยละ 70
6. Polymyxin B sulphate ความเข้มข้นร้อยละ 0.1

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่าง 25 กรัม ลงในถุงที่มี peptone water ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ที่ปลอดเชื้อจำนวน 225 มิลลิลิตร แล้วทำให้เข้ากันโดยการเขย่าเป็นเวลา 1 นาที
2. ทำการเจือจางให้เป็น10^{-1}-10^{-3} โดยใช้ peptone water ความเข้มข้นร้อยละ 0.1
3. ดูดตัวอย่างที่มีระดับความเจือจางที่เหมาะสม จำนวน 0.1 มิลลิลิตร ลงบน MYP จำนวน 3 ซ้ำ
4. ใช้แท่งแก้งปราศจากเชื้อเกลี่ยตัวอย่างให้กระจายทั่วจาน
5. บ่มเพาะเชื้อที่ 30 ^{0}ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
6. ตรวจนับโคโลนี *B.cereus* ที่มีวงใส รอบๆโคโลนีสีชมพู และจะขุ่นมากขึ้นเมื่อบ่มนานขึ้น รายงานผลเป็นจำนวนโคโลนีต่อกรัมของตัวอย่าง

โคโลนีต่อกรัมของตัวอย่าง = ค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนี × ระดับความเจือจาง

ค8. การวิเคราะห์ *C. perfringens* (ดัดแปลงจาก BAM, 2001)

สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Tryptose Sulfite Cycloserine Agar (TSC)
2. peptone water ความเข้มข้นร้อยละ 0.1
3. ไข่แดง (egg yolk)
4. NaCl ความเข้มข้นร้อยละ 0.85
5. เอธานอลความเข้มข้นร้อยละ 70
6. D-cycloserine ความเข้มข้นร้อยละ 0.5

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่าง 25 กรัม ลงในถุงที่มี peptone water ร้อยละ 0.1 ที่ปลอดเชื้อจำนวน 225 มิลลิลิตร แล้วทำให้เข้ากัน โดยการเขย่าเป็นเวลา 1 นาที
2. ทำการเจือจางให้เป็น 10^{-1}-10^{-3} โดยใช้ peptone water ร้อยละ 0.1
3. ดูดตัวอย่างที่มีระดับความเจือจางที่เหมาะสม จำนวน 0.1 มิลลิลิตร ลงบน TSC agar จำนวน 3 ซ้ำ
4. ใช้แท่งแก้วปราศจากเชื้อเกลี่ยตัวอย่างให้กระจายทั่วจาน
5. เทอาหาร TSC agar ลงไปอีก 5 มิลลิลิตร แล้วหมุนจานให้อาหารกระจายปิดอาหารชั้นแรก
6. นำไปใส่ใน anaerobic jar แล้วกำจัดอากาศออก นำไปบ่มเพาะเชื้อที่ 35 ^{0}ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
7. ตรวจนับจำนวนโคโลนีที่มีสีดำ แล้วนำไปคำนวณหาจำนวน *C. perfringens* โดยรายงานเป็นโคโลนีต่อ 0.001 กรัมของตัวอย่าง ค่านี้เป็น presumptive count ของ *C. perfringens*

โคโลนีต่อ 0.001 กรัมของตัวอย่าง = ค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนี × ระดับความเจือจาง×0.001

ภาคผนวก ง เกณฑ์มาตรฐานคุณภาพทางจุลชีววิทยา

เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร ประเภทอาหารดิบ ซึ่งหมายถึง อาหารที่ยังบริโภคไม่ได้ ต้องผ่านการทำสุกหรือการเตรียมด้วยกรรมวิธีใดๆก่อนบริโภค ได้แก่ เนื้อสด ปลาสด ไส้กรอกอีกสานดิบ ปลาแห้ง และเนื้อเค็มดิบ ไข่ เครื่องแกง เป็นต้น

Appendix table 1. Standard of microorganism content of raw food

Microoragnism	Content
Escherichia coli (MPN/g)	< 50
Staphylococcus aureus/g	< 200
Bacillus cereus/ g	< 200
Vibrio parahaemolyticus/g	< 200
Clostridium perfringens/0.001 g	Negative
Salmonellae/25 g	Negative
Vibrio cholerae/25 g	Negative

ที่มา: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (2536)

ภาคผนวก จ การทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัส

จ1. แบบทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัส ด้วยวิธี 9-point hedonic scale

เรื่อง การให้คะแนนความชอบ

ผลิตภัณฑ์ ต้มข่ากุ้ง

ชื่อผู้ตัดสิน…….. วันที่……..เวลา……

ข้อแนะนำ กรุณาทดสอบตัวอย่างที่เสนอให้จากซ้ายไปขวา แล้วให้คะแนนความชอบตัวอย่างในแต่ละปัจจัยที่ตรงกับความรู้สึกของท่านมากที่สุด โดยกำหนดให้

9 = ชอบมากที่สุด	6 = ชอบน้อยที่สุด	3 = ไม่ชอบปานกลาง
8 = ชอบมาก	5 = บอกไม่ได้ว่าชอบหรือไม่ชอบ	2 = ไม่ชอบมาก
7 = ชอบปานกลาง	4 = ไม่ชอบเล็กน้อย	1 = ไม่ชอบมากที่สุด

คุณลักษณะทางประสาทสัมผัส	คะแนนความชอบ			
	รหัส.....	รหัส.....	รหัส.....	รหัส.....
ลักษณะปรากฏ				
สี				
ความข้นหนืด				
กลิ่นเครื่องเทศ/สมุนไพร				
รสชาติ				
ความชอบรวม				

ข้อเสนอแนะ……
……
……
……

ขอบคุณค่ะ

จ2. แบบทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัส ด้วยวิธี just about right

ใบรายงานผลการทดสอบ

เรื่อง just about right

ผลิตภัณฑ์ ต้มข่ากุ้ง

ชื่อ.....วันที่.....เวลา.....

คำแนะนำ กรุณาทดสอบตัวอย่างที่เสนอให้ทีละตัวอย่าง แล้วให้คะแนนความชอบตัวอย่างในแต่ละปัจจัยที่ตรงกับความรู้สึกของท่านมากที่สุด โดยทำเครื่องหมาย / ในช่องสี่เหลี่ยม แล้วบอกเหตุผลของความชอบโดยขีดเส้นตั้งฉากกับเส้นคะแนน

กลิ่นเครื่องเทศ รหัส.....

☐ชอบมากที่สุด ☐ชอบมาก ☐ชอบปานกลาง ☐ชอบน้อยที่สุด ☐บอกไม่ได้ว่าชอบหรือไม่

☐ไม่ชอบเล็กน้อย ☐ไม่ชอบปานกลาง ☐ไม่ชอบมาก ☐ไม่ชอบมากที่สุด

ความหวาน รหัส.....

☐ชอบมากที่สุด ☐ชอบมาก ☐ชอบปานกลาง ☐ชอบน้อยที่สุด ☐บอกไม่ได้ว่าชอบหรือไม่

☐ไม่ชอบเล็กน้อย ☐ไม่ชอบปานกลาง ☐ไม่ชอบมาก ☐ไม่ชอบมากที่สุด

ความเปรี้ยว รหัส.....

☐ชอบมากที่สุด ☐ชอบมาก ☐ชอบปานกลาง ☐ชอบน้อยที่สุด ☐บอกไม่ได้ว่าชอบหรือไม่

☐ไม่ชอบเล็กน้อย ☐ไม่ชอบปานกลาง ☐ไม่ชอบมาก ☐ไม่ชอบมากที่สุด

ความเค็ม รหัส.....

☐ชอบมากที่สุด ☐ชอบมาก ☐ชอบปานกลาง ☐ชอบน้อยที่สุด ☐บอกไม่ได้ว่าชอบหรือไม่

☐ไม่ชอบเล็กน้อย ☐ไม่ชอบปานกลาง ☐ไม่ชอบมาก ☐ไม่ชอบมากที่สุด

ภาคผนวก ฉ ผลของอุณหภูมิและเวลาต่อความคงตัวของสมบัติการต้านออกซิเดชันในเครื่องเทศที่เป็นองค์ประกอบในเครื่องต้มข่าและเครื่องต้มข่า

Appendix table 2. Effect of temperatures and heating times on the total phenolic contents and antioxidant properties of crude galangal extracts

Temp (^{0}C)	Heating time	Total phenolic (g/100 g dw.)	DPPH value (μmole TE/g dw.)	ABTS value (μmole TE/g dw.)	FRAP value (μmole TE/g dw.)	Relative activity (%)			
						Total phenolic	DPPH	ABTS	FRAP
ambient	0	1.80 ± 0.05^{de}	60.66 ± 2.76^{abc}	167.48 ± 6.32^{a}	104.38 ± 6.62^{cd}	100.00	100.00	100.00	100.00
70	10	2.46 ± 0.05^{a}	58.19 ± 8.10^{bc}	149.58 ± 5.81^{cd}	151.49 ± 8.95^{a}	136.32	95.92	89.31	145.14
	20	2.38 ± 0.07^{a}	59.93 ± 6.72^{bc}	152.21 ± 6.26^{bc}	153.48 ± 5.38^{a}	131.81	98.79	90.88	147.05
	30	1.78 ± 0.27^{e}	56.70 ± 8.27^{cd}	163.74 ± 2.08^{a}	145.18 ± 7.60^{a}	98.59	93.48	97.77	139.10
80	10	1.87 ± 0.16^{de}	59.67 ± 2.03^{bc}	163.03 ± 6.89^{ab}	143.54 ± 6.68^{a}	103.70	98.37	97.34	137.52
	20	2.29 ± 0.11^{ab}	55.48 ± 0.44^{cd}	161.44 ± 10.10^{ab}	130.81 ± 6.88^{b}	126.97	91.46	96.39	125.31
	30	2.29 ± 0.15^{ab}	56.06 ± 3.25^{cd}	159.05 ± 7.99^{abc}	111.14 ± 6.36^{c}	126.70	92.41	94.96	106.48
90	10	2.36 ± 0.34^{a}	58.06 ± 4.77^{bc}	141.07 ± 7.47^{d}	146.89 ± 5.97^{a}	131.00	95.71	84.23	140.73
	20	2.11 ± 0.18^{bc}	56.70 ± 0.76^{cd}	163.98 ± 6.42^{a}	125.32 ± 5.34^{b}	116.88	93.48	97.91	121.02
	30	2.29 ± 0.11^{ab}	48.25 ± 3.33^{d}	156.90 ± 10.90^{abc}	126.77 ± 9.71^{b}	126.97	79.54	93.68	121.46
100	10	1.67 ± 0.14^{e}	68.58 ± 5.35^{a}	157.70 ± 10.20^{abc}	144.84 ± 6.72^{a}	92.87	113.00	94.16	138.77
	20	2.02 ± 0.23^{cd}	66.83 ± 7.88^{ab}	158.81 ± 9.45^{abc}	127.17 ± 11.60^{b}	112.11	110.20	94.82	121.84
	30	1.88 ± 0.07^{de}	59.16 ± 5.62^{bc}	159.21 ± 10.00^{abc}	101.08 ± 7.18^{d}	104.24	97.52	95.06	96.84

$^{a-e}$ means within a column with the different letters are significantly difference ($p<0.05$)

GAE: Gallic acid equivalent, TE: Trolox equivalent, dw: dry weight of galangal

Appendix table 3. Effect of temperatures and heating times on the total phenolic contents and antioxidant properties of crude lemon grass extracts

Temp (^{0}C)	Heating time	Total phenolic (g/100 g dw.)	DPPH value (μmole TE/g dw.)	ABTS value (μmole TE/g dw.)	FRAP value (μmole TE/g dw.)	Relative activity (%)			
						Total phenolic	DPPH	ABTS	FRAP
ambient	0	0.46 ± 0.06^{a}	14.04 ± 0.56^{bcd}	35.47 ± 3.67^{a}	19.69 ± 0.68^{abc}	100	100	100	100
70	10	0.41 ± 0.03^{ab}	14.14 ± 0.74^{bcd}	23.43 ± 1.06^{fg}	18.65 ± 0.80^{bcd}	90.16	100.73	66.06	94.72
	20	0.40 ± 0.06^{ab}	13.51 ± 0.39^{bcd}	20.82 ± 1.53^{h}	21.32 ± 2.81^{a}	86.83	96.25	58.71	108.30
	30	0.44 ± 0.03^{a}	11.05 ± 0.61^{e}	23.15 ± 0.83^{gh}	20.13 ± 1.27^{ab}	94.73	78.68	65.26	102.26
80	10	0.45 ± 0.04^{a}	16.12 ± 2.37^{a}	23.13 ± 1.52^{gh}	19.05 ± 0.37^{bc}	89.59	114.81	65.21	96.78
	20	0.44 ± 0.03^{a}	15.41 ± 1.25^{ab}	25.74 ± 1.22^{def}	15.14 ± 1.09^{e}	95.05	109.79	72.56	76.41
	30	0.44 ± 0.10^{a}	15.09 ± 1.18^{abc}	29.01 ± 0.96^{b}	18.94 ± 1.16^{bc}	96.05	107.49	81.78	96.23
90	10	0.37 ± 0.05^{b}	14.19 ± 0.56^{bcd}	24.83 ± 2.63^{defg}	17.89 ± 3.35^{cd}	79.56	101.05	70.02	90.88
	20	0.41 ± 0.05^{ab}	13.96 ± 0.56^{bcd}	24.11 ± 3.83^{efg}	17.51 ± 1.14^{cd}	93.17	99.42	67.98	88.96
	30	0.44 ± 0.05^{a}	12.40 ± 0.84^{de}	26.21 ± 1.08^{cde}	19.40 ± 0.99^{abc}	95.42	88.29	73.89	98.56
100	10	0.42 ± 0.02^{ab}	13.71 ± 0.67^{bcd}	25.64 ± 1.43^{defg}	16.66 ± 0.97^{de}	90.53	97.67	72.29	84.64
	20	0.42 ± 0.04^{ab}	13.34 ± 1.58^{cd}	28.23 ± 1.63^{bc}	17.77 ± 1.46^{cd}	96.18	95.05	79.59	90.26
	30	0.46 ± 0.04^{a}	12.27 ± 1.61^{de}	27.02 ± 1.60^{bcd}	16.62 ± 1.16^{de}	91.97	87.41	76.18	84.43

$^{a-h}$ means within a column with the different letters are significantly difference ($p<0.05$)

GAE: Gallic acid equivalent, TE: Trolox equivalent, dw: dry weight of lemon grass

Appendix table 4. Effect of temperatures and heating times on the total phenolic contents and antioxidant properties of crude chili extracts

Temp (^{0}C)	Heating time	Total phenolic (g/100 g dw.)	DPPH value (μmole TE/g dw.)	ABTS value (μmole TE/g dw.)	FRAP value (μmole TE/g dw.)	Relative activity (%)			
						Total phenolic	DPPH	ABTS	FRAP
ambient	0	1.87 ± 0.20^{ab}	55.75 ± 4.89^{a}	223.32 ± 5.55^{a}	56.38 ± 3.01^{bc}	100	100	100	100
70	10	1.82 ± 0.27^{abcd}	38.06 ± 2.88^{cd}	200.45 ± 4.71^{c}	55.62 ± 3.09^{bc}	97.26	68.27	89.76	98.65
	20	1.64 ± 0.23^{bcd}	35.01 ± 1.20^{def}	193.53 ± 4.44^{d}	52.10 ± 4.21^{cd}	87.80	62.79	86.66	92.42
	30	1.51 ± 0.17^{cd}	35.15 ± 2.90^{def}	204.71 ± 7.08^{c}	49.13 ± 3.56^{d}	80.79	63.05	91.66	87.14
80	10	1.70 ± 0.17^{abcd}	40.54 ± 1.22^{c}	203.73 ± 4.97^{c}	57.49 ± 2.21^{ab}	90.83	72.72	91.23	101.97
	20	1.98 ± 0.21^{a}	40.69 ± 1.07^{c}	205.06 ± 6.04^{c}	61.35 ± 5.58^{a}	80.50	72.98	91.82	108.82
	30	1.75 ± 0.42^{abc}	37.09 ± 1.16^{de}	224.48 ± 5.31^{a}	56.54 ± 3.13^{bc}	93.50	66.53	100.52	100.28
90	10	1.47 ± 0.14^{d}	32.96 ± 2.45^{f}	175.45 ± 5.36^{e}	48.27 ± 2.38^{d}	78.34	59.12	78.56	85.62
	20	1.46 ± 0.21^{d}	33.35 ± 1.76^{f}	215.08 ± 3.64^{b}	57.26 ± 3.82^{ab}	77.83	59.83	96.31	101.57
	30	1.51 ± 0.16^{cd}	34.36 ± 0.66^{ef}	215.97 ± 7.86^{b}	56.28 ± 5.07^{bc}	105.92	61.63	96.70	99.83
100	10	1.64 ± 0.18^{bcd}	48.59 ± 3.54^{b}	201.34 ± 4.29^{c}	56.57 ± 1.78^{bc}	87.58	87.16	90.15	100.34
	20	1.74 ± 0.26^{abcd}	48.92 ± 1.36^{b}	216.41 ± 1.81^{b}	59.61 ± 1.45^{ab}	88.59	87.74	96.90	105.73
	30	4.53 ± 0.27^{cd}	46.58 ± 1.47^{b}	214.90 ± 5.89^{b}	50.27 ± 3.48^{d}	81.59	83.55	96.23	89.16

$^{a-f}$ means within a column with the different letters are significantly difference ($p<0.05$)

GAE: Gallic acid equivalent, TE: Trolox equivalent, dw: dry weight of chili

Appendix table 5. Effect of temperatures and heating times on the total phenolic contents and antioxidant properties of crude kaffir lime leaves extracts

Temp (^{0}C)	Heating time	Total phenolic (g/100 g dw.)	DPPH value (μmole TE/g dw.)	ABTS value (μmole TE/g dw.)	FRAP value (μmole TE/g dw.)	Relative activity (%)			
						Total phenolic	DPPH	ABTS	FRAP
ambient	0	1.21 ± 0.15^{ab}	17.65 ± 1.78^{b}	73.75 ± 1.49^{abc}	37.22 ± 0.09^{c}	100	100	100	100
70	10	1.16 ± 0.05^{abc}	11.97 ± 1.01^{f}	67.51 ± 3.97^{cde}	40.44 ± 3.26^{bc}	95.71	67.80	91.54	108.64
	20	1.03 ± 0.11^{bc}	14.08 ± 2.54^{e}	60.00 ± 3.62^{fg}	37.35 ± 3.26^{c}	86.95	79.77	81.35	100.34
	30	1.16 ± 0.15^{abc}	13.68 ± 0.80^{ef}	78.50 ± 4.79^{a}	41.68 ± 3.11^{bc}	93.39	77.49	106.44	111.97
80	10	1.11 ± 0.27^{abc}	15.00 ± 0.82^{cde}	70.28 ± 8.04^{bcde}	38.06 ± 5.52^{c}	96.16	84.98	95.29	102.24
	20	1.28 ± 0.16^{a}	14.77 ± 1.44^{de}	72.93 ± 6.94^{abc}	41.33 ± 3.03^{bc}	92.13	83.68	98.89	111.02
	30	1.30 ± 0.35^{a}	13.71 ± 1.08^{ef}	67.16 ± 1.98^{cde}	45.55 ± 3.23^{ab}	96.69	77.66	91.06	122.37
90	10	0.93 ± 0.11^{c}	16.78 ± 0.90^{bc}	58.22 ± 6.28^{g}	37.20 ± 2.55^{c}	79.53	95.08	78.95	99.93
	20	0.94 ± 0.14^{c}	16.65 ± 0.37^{bcd}	65.42 ± 2.86^{def}	43.33 ± 2.66^{b}	77.65	94.34	88.71	116.39
	30	1.13 ± 0.12^{abc}	16.41 ± 0.67^{bcd}	75.41 ± 6.96^{ab}	45.73 ± 2.99^{ab}	105.70	92.96	102.26	122.85
100	10	1.07 ± 0.11^{abc}	20.07 ± 1.20^{a}	73.00 ± 4.27^{abc}	48.57 ± 1.95^{a}	88.20	113.72	98.99	130.47
	20	1.10 ± 0.13^{abc}	17.74 ± 0.72^{b}	71.94 ± 2.41^{abcd}	43.45 ± 8.66^{b}	87.58	100.53	97.55	116.73
	30	1.16 ± 0.11^{abc}	20.89 ± 0.98^{a}	64.89 ± 5.79^{ef}	41.65 ± 2.71^{bc}	94.28	118.36	87.99	111.90

$^{a-g}$ means within a column with the different letters are significantly differenc ($p<0.05$)

GAE: Gallic acid equivalent, TE: Trolox equivalent, dw: dry weight of kaffir lime leaves

Appendix table 6. Effect of temperatures and heating times on the total phenolic contents and antioxidant properties of crude Tom-kha paste extracts

Temp (^{0}C)	Heating time	Total phenolic (g/100 g dw.)	DPPH value (μmole TE/g dw.)	ABTS value (μmole TE/g dw.)	FRAP value (μmole TE/g dw.)	Relative activity (%)			
						Total phenolic	DPPH	ABTS	FRAP
ambient	0	0.59 ± 0.04^{a}	13.07 ± 0.04^{ab}	48.50 ± 2.28^{a}	16.50 ± 1.31^{b}	100	100	100	100
70	10	0.44 ± 0.02^{d}	11.98 ± 0.13^{bcd}	31.77 ± 3.48^{e}	14.53 ± 0.66^{c}	74.12	91.64	65.51	88.07
	20	0.51 ± 0.03^{bc}	12.21 ± 0.68^{abc}	32.96 ± 3.27^{de}	15.01 ± 2.06^{bc}	86.47	93.44	68.95	90.95
	30	0.46 ± 0.04^{bcd}	12.13 ± 0.23^{bcd}	39.39 ± 3.24^{bc}	13.54 ± 1.13^{c}	78.60	92.80	81.21	82.03
80	10	0.36 ± 0.11^{e}	12.02 ± 0.46^{bcd}	39.24 ± 3.37^{bc}	11.44 ± 2.22^{d}	61.13	91.96	80.91	69.33
	20	0.47 ± 0.06^{bcd}	11.58 ± 0.64^{cde}	38.58 ± 1.95^{bc}	14.28 ± 0.95^{c}	80.70	88.60	79.53	86.54
	30	0.51 ± 0.06^{bc}	10.54 ± 0.56^{ef}	37.43 ± 3.26^{c}	13.76 ± 0.76^{c}	87.33	80.66	77.18	83.38
90	10	0.48 ± 0.04^{bcd}	13.12 ± 0.59^{ab}	35.77 ± 1.95^{cd}	15.27 ± 0.95^{bc}	81.99	100.3	73.74	92.52
	20	0.51 ± 0.06^{bcd}	12.67 ± 0.64^{abc}	32.02 ± 1.72^{e}	14.92 ± 1.62^{bc}	86.09	96.93	66.02	90.41
	30	0.45 ± 0.04^{cd}	12.48 ± 0.70^{abc}	33.67 ± 1.85^{de}	13.65 ± 0.65^{c}	77.20	95.44	69.41	82.12
100	10	0.47 ± 0.05^{bcd}	13.43 ± 1.34^{a}	36.18 ± 2.56^{cd}	14.76 ± 1.00^{bc}	79.14	102.70	74.60	89.46
	20	0.51 ± 0.03^{bc}	10.93 ± 0.31^{def}	39.05 ± 2.24^{bc}	15.36 ± 2.46^{bc}	87.39	83.63	80.52	93.11
	30	0.53 ± 0.03^{ab}	9.95 ± 1.57^{f}	41.70 ± 2.55^{b}	20.18 ± 0.46^{a}	90.62	76.08	85.97	122.29

$^{a-f}$ means within a column with the different letters are significantly difference ($p<0.05$)

GAE: Gallic acid equivalent, TE: Trolox equivalent, dw: dry weight of Tom-kha paste

ภาคผนวก ซ การตรวจสอบค่าทำนายจากสมการและค่าจริง

Appendix table 7. Predicted and actual values of sensory testing of shrimp Tom-kha soup evaluated by 30 panalists with 9-point hedonic scale

Formula	Value	Attribute					
		Appearance	Color	Viscosity	Herb odor	Taste	Overall
1	Predicted value	7.14	7.24	7.16	7.16	7.14	7.01
2		7.29	7.32	7.26	7.25	7.2	7.33
3		7.43	7.4	7.33	7.33	6.9	7.4
4		7.56	7.47	7.4	7.4	6.39	6.73
1	Actual value*	7.06 ± 0.63	7.00 ± 0.73	7.10 ± 0.70	7.48 ± 0.77	7.19 ± 1.08	7.03 ± 0.87
2		7.16 ± 0.69	7.19 ± 0.65	7.10 ± 0.83	7.45 ± 0.81	7.26 ± 0.96	7.23 ± 0.67
3		7.58 ± 0.76	7.58 ± 0.76	7.10 ± 0.94	7.29 ± 0.97	6.90 ± 1.37	7.13 ± 0.92
4		7.48 ± 0.57	7.48 ± 0.68	7.16 ± 0.64	7.06 ± 1.09	6.35 ± 1.28	6.68 ± 1.22

* Actual value was sensory testing of shrimp Tom-kha soup evaluated by 30 panalists with 9 point-hedonic scale

Appendix table 8. Predicted and actual values of the total phenolic contents and antioxidant properties of crude Tom-kha paste extracts

Formula	Value	Total phenolic (g/100 g dw.)	DPPH value (μmole TE/g dw.)	ABTS value (μmole TE/g dw.)	FRAP value (μmole TE/g dw.)
1	Predicted value	0.62	17.34	54.26	26.6
2		0.56	15.70	50.17	24.7
3		0.51	14.06	71.79	19.28
4		0.47	12.66	110.81	11.82
1	Actual value*	0.65 ± 0.03	16.45 ± 0.78	48.59 ± 4.59	40.78 ± 1.61
2		0.66 ± 0.06	15.47 ± 0.90	48.00 ± 4.69	33.31 ± 2.91
3		0.61 ± 0.02	13.86 ± 1.11	83.16 ± 4.95	28.21 ± 2.23
4		0.63 ± 0.03	14.73 ± 0.29	98.53 ± 8.13	26.34 ± 1.81

* Actual value**:** Mean ± SD from hexaplicate determination