บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัตถุดิบ

3.1.1 ถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 ได้ความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่

3.1.2 ถั่วเขียว ตราไร่ทิพย์ บริษัท ไร่ธัญญะ จำกัด

3.2 เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์

3.2.1 เครื่องกะเทาะเปลือก	
3.2.2 เครื่องบดแบบหยาบ	ยี่ห้อ Philip รุ่น Cucina , Indonesia
3.2.3 เครื่องบดแบบเข็ม (pin mill)	Retsh ZM 1000, Gemany
3.2.4 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)	Memmert UM 400, Germany
3.2.5 เครื่องสกัดแบบหมุนเหวี่ยง (Centrifuge)	Beckman Coulter, USA
3.2.6 เครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary Evaporator)	B.U.C.H.I B-169, Switzerland
3.2.7 UV-VIS สเปกโตรโฟโตมิเตอร์	Shimadzu UV-1601, Japan
3.2.8 เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง	Denver, Germany
3.2.9 เครื่องชั่งละเอียด 2 ตำแหน่ง	Pioneer, USA
3.2.10 Hot plate Stirrer	Ceramag, Thailand
3.2.11 เตาหลุมให้ความร้อน	J.Seecta, Spain
3.2.12 เครื่องทำความเย็น (Cooling)	รุ่น CBD1, Germany
3.2.10 อ่างควบคุมอุณหภูมิ	Memmert, Germany
3.2.12 ชุดกรองแบบสุญญากาศ	Sibata รุ่น WJ-20, Japan

3.3 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

3.3.1 Ethanol 95 %	
3.3.2 Diphenyl-l-picryl-hydrazyl (DPPH)	Sigma USA
3.3.3 Folin-Ciocalteu reagent	BDH England

3.3.4 Sodium carbonate (Na_2CO_3)	Merck Germany
3.3.5 Gallic acid	Sigma Germany
3.3.6 Hydrochlolic acid (HCl)	Merck Germany
3.3.7 Sodium acetate (CH_3COONa)	Merck Germany
3.3.8 Iron(III)chloride hexahydrate (FeCl3.6H2O)	Sigma Sweden
3.3.9 2,4,6-Tris (2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ)	Sigma Switzerland
3.3.10 Thiobarbituric acid	Fluka Germany
3.3.11 Acitic acid	Labscan analytical science Thailand

3.4 สถานที่ดำเนินการทดลอง

ห้องปฏิบัติการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.5 วิธีดำเนินงาน

3.5.1 การเตรียมเปลือกถั่ว (เปลือกถั่วเหลือง เปลือกถั่วเขียวสด และเปลือกถั่วเขียวแห้ง)

3.5.1.1 การเตรียมเปลือกถั่วเหลือง

นำเมล็ดถั่วเหลืองมากะเทาะเปลือกออกด้วยเครื่องกะเทาะ และแยกเปลือกออกจากส่วนของเนื้อเมล็ด จากนั้นนำเปลือกมาบดหยาบด้วยเครื่องบดแห้ง แล้วนำไปบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดแบบเข็ม (Pin mill) จากนั้นนำตัวอย่างเก็บในถุงพอลิเอทิลีน เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.5.1.2 การเตรียมเปลือกถั่วเขียว

นำเมล็ดถั่วเขียวล้างให้สะอาดแล้วนำมาแช่น้ำที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาแยกเอาเปลือกออกจากเมล็ด นำเปลือกใส่ตะแกรงเพื่อให้สะเด็ดน้ำ แล้วนำมาบดด้วยเครื่องบดหยาบจึงนำเปลือกที่ได้เก็บในถุงพอลิเอทิลีน เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เปลือกถั่วเขียวในขั้นตอนนี้เรียกว่า เปลือกถั่วเขียวสด

3.5.2 ศึกษาผลของอุณหภูมิในการอบแห้งเปลือกถั่วเขียวต่อปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมด และความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน

นำเปลือกถั่วเขียวอบแห้งที่อุณหภูมิ 50, 75 และ 100 องศาเซลเซียส (จนมีความชื้นประมาณ 4±0.02 เปอร์เซ็นต์ (w/w)) เปลือกถั่วเขียวที่ได้จากขั้นตอนนี้เรียกว่า เปลือกถั่วเขียวแห้ง จากนั้นนำเปลือกถั่วเขียวแห้ง บดหยาบด้วยเครื่องบดแห้งแล้วนำไปบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดแบบเข็ม (Pin mill) นำตัวอย่างเก็บในถุงพอลิเอทิลีน เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

นำตัวอย่างเปลือกถั่วเขียวแห้ง และตัวอย่างเปลือกถั่วเขียวสด (เตรียมจากข้อ 3.5.1.2) ตัวอย่างละ 10 กรัม ผสมกับเอธานอล 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ เขย่าที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส (ambiance temperature)) เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างปั่นแยกตะกอน (centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกเอาส่วนของแข็งออก นำสารสกัดที่ได้กรองผ่านกระดาษกรอง whatman เบอร์4 จากนั้นระเหยตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่องระเหยแบบสุญญากาศ (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ปรับปริมาตรด้วยเอธานอล ให้ได้ 20 มิลลิลิตร และเก็บตัวอย่างสารสกัดในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดตามวิธีในข้อ 3.5.2.2 และวิเคราะห์ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันตามวิธีในข้อ 3.5.2.3

3.5.2.2 วิธีวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดในตัวอย่างสารสกัด

การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมด ใช้วิธีที่รายงานโดยประพันธ์และวันทนีย์ (2545) โดยมีหลักการคือ สารประกอบโพลีฟีนอลจะทำปฏิกิริยากับ Folin-Ciocalteu reagent เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงินซึ่งสามารถติดตามโดยการตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 730 นาโนเมตร โดยใช้กรดแกลลิกเป็นสารประกอบโพลีฟีนอลมาตรฐาน

3.5.2.3 วิธีวิเคราะห์ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของตัวอย่างสารสกัด

1.) วิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH (2,2-diphenyl-2-picrylhidrazyl)

วิเคราะห์ตามวิธีที่รายงานโดย Murakami และคณะ (2004) ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการตรวจวัดความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดจากพืช โดยมีหลักการคือ เมื่ออนุมูลอิสระสังเคราะห์ DPPH ทำปฏิกิริยากับสารที่มีสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน จะมีผลทำให้อนุมูลอิสระ DPPH เปลี่ยนเป็นโมเลกุล DPPH เนื่องจากได้รับไฮโดรเจนอะตอมจากสารที่มีสมบัติการ

ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน (แสดงดังสมการ) และจะเกิดการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายจากสีม่วงแดง เป็นไม่มีสีหรือมีสีจางลง ซึ่งตรวจวัดได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร

$$\underset{\text{(สีม่วง)}}{\text{DPPH}} + \text{AH} \longrightarrow \underset{\text{(ไม่มีสี)}}{\text{DPPH-H}} + \text{A}$$

2.) วิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริก (Ferric reducing antioxidant potential, FRAP)

การวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกใช้วิธีที่รายงานโดย Benzie และ Strain (1996) ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถใช้ทดสอบความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันได้โดยตรง โดยมีหลักการคือ ภายใต้สภาวะที่เป็นกรด สารที่มีสมบัติในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันจะรีดิวซ์สารประกอบเชิงซ้อน ferric tripyridyltriazine (Fe^{III}-TPTZ) ให้เปลี่ยนไปอยู่ในรูปของเกลือเฟอร์รัส (Fe^{II}-TPTZ) เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ให้สารสีน้ำเงิน ซึ่งสามารถติดตามโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร .

$$\underset{\text{(สีส้ม)}}{(Fe^{III}\text{-TPTZ})} \longrightarrow \underset{\text{(สีน้ำเงิน)}}{(Fe^{II}\text{-TPTZ})}$$

3.5.3 ศึกษาผลของอุณหภูมิในการสกัดต่อปริมาณ และความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดจากเปลือกถั่วเหลือง และเปลือกถั่วเขียว

นำเปลือกถั่วเหลือง ที่เตรียมได้ในข้อ 3.5.1.1 และเปลือกถั่วเขียว ที่ให้ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดสูง และมีความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ดี (โดยคัดเลือกจากผลการทดลองในข้อ 3.5.2) ตัวอย่างละ 10 กรัม ผสมกับเอธานอล 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ เขย่าที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส (ambiance temperature)) และในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 50 และ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างปั่นแยกตะกอน (centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกเอาส่วนของแข็งออก นำสารสกัดที่ได้กรองผ่านกระดาษกรอง whatman เบอร์4 จากนั้นระเหยตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่องระเหยแบบสุญญากาศ (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ปรับปริมาตรด้วยเอธานอล ให้ได้ 20 มิลลิลิตร และเก็บตัวอย่างสารสกัดในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปวิเคราะห์หา

ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดตามวิธีในข้อ 3.5.2.2 และวิเคราะห์ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันตามวิธีในข้อ 3.5.2.3

3.5.4 ศึกษาผลของเวลาการสกัดต่อปริมาณ และความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดจากเปลือกถั่วเหลือง และเปลือกถั่วเขียว

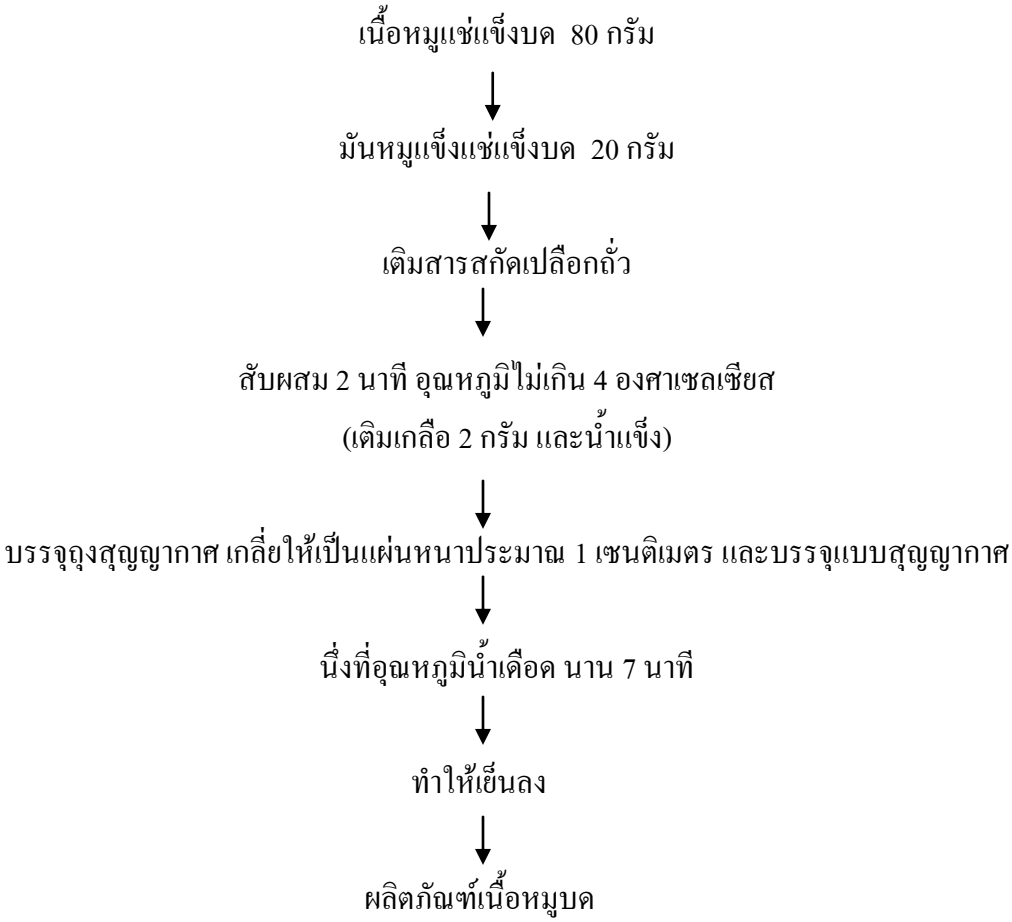
นำเปลือกถั่วเหลือง และเปลือกถั่วเขียว ตัวอย่างละ 10 กรัม ผสมกับเอธานอล 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ เขย่าที่อุณหภูมิที่คัดเลือกจากการทดลองในข้อ 3.5.3 เป็นเวลา 1, 3, 5 และ 8 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างปั่นแยกตะกอน (centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกเอาส่วนของแข็งออก นำสารสกัดที่ได้กรองผ่านกระดาษกรอง whatman เบอร์4 และระเหยตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่องระเหยแบบสุญญากาศ (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ปรับปริมาตรด้วยเอธานอล ให้ได้ 20 มิลลิลิตร และเก็บตัวอย่างสารสกัดในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดตามวิธีในข้อ 3.5.2.2 และวิเคราะห์ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันตามวิธีในข้อ 3.5.2.3

3.5.5 ศึกษาการใช้สารสกัดเปลือกถั่วเป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันธรรมชาติในผลิตภัณฑ์หมูบด

เลือกตัวอย่างสารสกัดจากเปลือกถั่วเหลือง และเปลือกถั่วเขียวโดยคัดเลือกจากผลการทดลองในข้อ 3.5.4 ทดสอบการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันธรรมชาติในผลิตภัณฑ์เนื้อหมูบด โดยเติมสารสกัดจากเปลือกถั่วเหลือง และเปลือกถั่วเขียวที่ระดับ 0, 0.5, 1.5 และ 3.0 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักทั้งหมด ดังภาพที่ 3.1 เก็บรักษาผลิตภัณฑ์เนื้อหมูบด ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในสภาวะสุญญากาศ เป็นเวลา 15 วัน โดยเก็บตัวอย่างทุกๆ 5 วัน เพื่อนำมาวิเคราะห์ติดตามการเกิดออกซิเดชันของไขมันโดยการวิเคราะห์ ด้วยวิธีดังนี้

3.5.5.1 วิเคราะห์ค่า Thiobarbituric Acid Reactive Substance (TBARS) ตามวิธีที่รายงานโดย Shahidi และคณะ (1995) .

3.5.5.2 วิเคราะห์ค่าการเกิดการฟอร์มตัวของ conjugated dienes ตามวิธีของ Sirinivasan และคณะ (1996)



ภาพที่ 3.1 ขั้นตอนการเตรียมผลิตภัณฑ์เนื้อหมูบด

ที่มา : ดัดแปลงจาก Juntachote และคณะ (2007)

3.5.6 การวางแผนการทดลองและวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมด และความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดจากเปลือกถั่วเหลืองและเปลือกถั่วเขียว โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Complete Randomized Design) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Rang Test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 การวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของการใช้สารสกัดจากเปลือกถั่วเป็นสารกันหืนในผลิตภัณฑ์เนื้อหมูบด วางแผนการทดลองแบบแฟกทอเรียล (Factorial design) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Rang Test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95