บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบ อุปกรณ์ และสารเคมี

3.1.1 วัตถุดิบ

1. ใบพลู พันธุ์พลูเขียวจาก อำเภอแม่แตง จังหวัดเชียงใหม่
2. น้ำมันปาล์มโอเลอินผ่านกรรมวิธี ตราเทสโก้
3. มันฝรั่งแท่งแช่แข็ง ตราซันนี่เดย์

3.1.2 อุปกรณ์

1. ตู้อบลมร้อน (BINDER, R3-Controller Series, USA)
2. เครื่องปั่นผสม (National model MX-T1PN, Taiwan)
3. เครื่องเขย่าตะแกรงร่อนแยกขนาด (Retsch AS200 Digit, Germany)
4. เครื่องปิดผนึกสุญญากาศ (Audionvac model VM2010, USA)
5. เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง (A&D model SK-5001WP, Japan)
6. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Oertling model VA304, England)
7. ชุดเครื่องแก้ว
8. ขวดสีชาพร้อมฝาปิด
9. ฟิล์มพลาสติก
10. เครื่องวัดอุณหภูมิ (OAKTON, China)
11. เครื่องเขย่า (Heidolph UNIMAX 2010, Germany)
12. เครื่อง Ultrasonic cleanser (CREST model 690TAE, Malaysia)
13. นาฬิกาจับเวลา (CITIZEN, Japan)
14. เครื่องไมโครเวฟ (National NN-K652, Japan)
15. Moisture can

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

16. โถแก้วดูดความชื้น
17. ไมโครปิเปต (Gilson, France)
18. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer model Genesys 10 UV Scanning, USA)
19. Glass cuvette
20. ตู้แช่เย็น (Songserm Intercool model SDC-1000AV, Thailand)
21. เตาไฟฟ้า(IKA model C-MAG HS7, Thailand)
22. ใบพัดขนาดเล็ก (LAB-EGG model RW11, China)
23. เครื่องวัดค่าสี (KONICA MINOLTA model CR-410 , Japan)
24. เครื่องวัดความหนืด (Brookfield RVDV+11, USA)
25. อุปกรณ์สำหรับการไตเตรท
26. เครื่อง Gas Chromatography Flame Ionization Detector (GC-FID) (SHIMADZU GC-2010, Japan)
27. SPME fiber holder (Supelco 57330-U, USA)
28. SPME fiber assembly Divinylbenzene/Carboxen/Polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) (Supelco 57328-U, USA)
29. เครื่องปั่นแบบมือถือ (Moulinex, Spain)
30. กระทะไฟฟ้า (VICTOR model VT-203H, Japan)
31. เครื่องระเหยสุญญากาศ (Buchi model R-205, Japan)
32. อลูมิเนียมฟอยล์
33. ขวดบรรจุตัวอย่าง (vial) และเซบตัมยาง (20 mm. Tan PTFE/White silicone septa) (Agilent 9301-0719, USA)
34. หลอดทดลองแบบฝาเกลียว (screw-cap test tubes)
35. กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 และ เบอร์ 4
36. เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (Horiba F22, USA)
37. Vortex (vortex-2 model G-560E, USA)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.1.3 สารเคมี

1. Ethanol (C_2H_5OH) (MERCK, Germany)
2. Sodium carbonate (Na_2CO_3) (MERCK, England)
3. Folin-Ciocalteu' phenol reagent (Fluka, USA)
4. Gallic acid (Fluka, USA)
5. 2, 2' -diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Fluka, Germany)
6. Methanol (CH_3OH) (J.T. Baker, USA)
7. Glacial acetic acid (CH_3COOH) (MERCK, Germany)
8. Chloroform ($CHCl_3$) (LAB-SCAN, Thailand)
9. Potassium iodide (KI) (Ajax Finechem, New Zealand)
10. Sodium thiosulphate ($Na_2S_2O_3$) (Fisher, USA)
11. Modifield starch (MERCK, Germany)
12. Diethyl ether ($(C_2H_5)_2O$) (LAB-SCAN, Thailand)
13. Phenolphthalein (MERCK, England)
14. Potassium hydroxide (KOH) (MERCK, England)
15. Hexanal ($C_6H_{12}O$) (ALDRICH, USA)
16. 2-Heptanone ($C_7H_{14}O$) (ALDRICH, USA)
17. Hexane (C_6H_{14}) (LAB-SCAN, Thailand)
18. Hydrochloric acid (HCl) (JT. Baker, USA)
19. Potassium dichlomate ($K_2Cr_2O_7$) (Scharlau, Spain)
20. Potassium hydrogen phthalate ($KHC_8H_4O_4$) (Scharlau, Spain)
21. 2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol (BHT) (Fluka, Switzerland)
22. Thiobarbituric acid (TBA) (MERCK, Germany)
23. Trichloroacetic acid (TCA) (MERCK, Germany)
24. Phosphoric acid (H_3PO_4) (MERCK, Germany)
25. 1,1,3,3-Tetramethoxypropan (TEP) (ALDRICH, Germany)
26. Aluminium chloride ($AlCl_3$) (Ajax, Australia)
27. Potassium acetate (CH_3COOK) (Ajax, Australia)
28. Quercetin (Sigma, Germany)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การเตรียมวัตถุดิบ

นำใบพลูสด (ค่าสี a* อยู่ในช่วง -9.00 ถึง -8.00) มาล้างน้ำให้สะอาด ผึ่งให้สะเด็ดน้ำ แล้วนำไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง หรือจนมีความชื้นไม่เกินร้อยละ 5 นำใบพลูที่ผ่านการอบเรียบร้อยแล้วมาปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นผสม ที่ความเร็วระดับสูง เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นนำไปร่อนผ่านตะแกรงเบอร์ 4 (ขนาดรูตะแกรง 600 ไมโครเมตร) ด้วยเครื่องเขย่าตะแกรงร่อนแยกขนาด ได้ตัวอย่างใบพลูผง เก็บตัวอย่างใบพลูผงในถุงอลูมิเนียมฟอยล์ปิดสนิท ที่อุณหภูมิ 24 ± 1 องศาเซลเซียส จนกระทั่งมีการนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.2.2 การวิเคราะห์ร้อยละผลผลิตที่ได้ ปริมาณสารต้านออกซิเดชัน และความสามารถในการต้านออกซิเดชัน

3.2.2.1 การวิเคราะห์ร้อยละผลผลิตที่ได้ (% Yield) ดัดแปลงจากวิธีการของ Boryana *et al.* (2007)

นำสารสกัดที่ได้ไประเหยตัวทำละลายในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส คำนวณหาร้อยละผลผลิตที่ได้ โดยมีวิธีการคำนวณแสดงในภาคผนวก ก

3.2.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content) ตามวิธีการของ สุทัศน์ และคณะ (2550)

ปิเปตสารสกัดที่ได้ จำนวน 100 ไมโครลิตร ลงในขวดสีชา เติมน้ำกลั่นจำนวน 1 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 75 กรัม/ลิตร จำนวน 375 ไมโครลิตร เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้ 2 นาที เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu's phenol reagent จำนวน 125 ไมโครลิตร เขย่าอีกครั้ง แล้วเติมน้ำกลั่นจำนวน 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 725 นาโนเมตร นำผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปวิเคราะห์โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก แสดงดังภาพ ก.1 ในภาคผนวก ก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.2.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (Total flavonoid content) ตามวิธีการของ Chang *et al.* (2002)

ปิเปตสารสกัดที่ได้ จำนวน 0.5 มิลลิลิตร ลงในขวดสีชา เติมสารละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 จำนวน 1.5 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายอลูมิเนียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 10 จำนวน 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลายโพแทสเซียมอะซิเตทความเข้มข้น 1 โมลาร์ จำนวน 100 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่น 2.8 มิลลิลิตร เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้ 40 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร นำผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปวิเคราะห์โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของควอเซอติน แสดงดังภาพ ก.2 ในภาคผนวก ก

3.2.2.4 การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชัน โดยวิธี DPPH ดัดแปลงจากวิธีการของ Masuda *et al.* (1999)

- **การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชัน ซึ่งแสดงในรูปร้อยละการยับยั้ง**

ปิเปตสารสกัด จำนวน 4.9 มิลลิลิตร ลงในขวดสีชา เติม 2, 2' -diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ จำนวน 100 ไมโครลิตร เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร นำผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาร้อยละการยับยั้ง โดยมีวิธีการคำนวณแสดงในภาคผนวก ก

- **การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชัน ซึ่งแสดงในรูปความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถลดการเกิดออกซิเดชันได้ร้อยละ 50 (IC_{50})**

ทำการเจือจางสารสกัดที่ได้ โดยให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 10^{-1} – 10^{-5} ปิเปตสารสกัดในแต่ละความเข้มข้น จำนวน 4.9 มิลลิลิตร ลงในขวดสีชา เติม 2, 2' -diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ จำนวน 100 ไมโครลิตร เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร นำผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาร้อยละการยับยั้ง จากนั้นนำค่าที่ได้ไปพลอตกราฟในโปรแกรม SigmaPlot 10.0 (Systat Software Inc., Germany) เพื่อวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถลดการเกิดออกซิเดชันได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) โดยมีวิธีการคำนวณแสดงในภาคผนวก ก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.3 การวิเคราะห์คุณภาพของน้ำมันพืช

3.2.3.1 การวิเคราะห์ค่าเปอร์ออกไซด์ (Peroxide value, P.V.) (AOAC, 2000)

ชั่งน้ำมันตัวอย่างให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน 5.00 ± 0.05 กรัม ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรดอะซิติก-คลอโรฟอร์ม (3:2) จำนวน 30 มิลลิลิตร ลงไปละลายตัวอย่างแกว่งเบาๆ ให้ไขมันละลายในตัวทำละลาย เติมสารละลายอิ่มตัวโพแทสเซียมไอโอไดด์ จำนวน 0.5 มิลลิลิตร เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที แล้วเติมน้ำกลั่นจำนวน 30 มิลลิลิตรทันที ไตเตรทด้วยสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล ที่ผ่านการทำมาตรฐานแล้ว จนกระทั่งสารละลายมีสีเหลืองอ่อน จึงเติมน้ำแป้งความเข้มข้นร้อยละ 1 ไตเตรทต่อจนสีน้ำเงินของสารละลายจางหายไป ทำ Blank ควบคู่ไปด้วย บันทึกปริมาตรของสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟตที่ใช้ในการไตเตรท ตัวอย่างการคำนวณแสดงในภาคผนวก ก

3.2.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันอิสระ (Free fatty acid, FFA) (AOAC, 2000)

ชั่งน้ำมันตัวอย่างให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน 2.00 – 5.00 กรัม ในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร เติม mixed neutral solvent (ไดเอทิลอีเทอร์-เอทานอล 25:25 มิลลิลิตร เติมสารละลายฟีนอล์ฟธาลีนความเข้มข้นร้อยละ 1 จำนวน 1 มิลลิลิตร ไตเตรทให้เป็นกลางด้วยสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล ที่ผ่านการทำมาตรฐานแล้ว ประมาณ 2 – 3 หยด) จำนวน 30 มิลลิลิตร เขย่าแรงๆ ให้เข้ากัน ไตเตรทด้วยสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล จนได้สีชมพูที่ถาวร บันทึกปริมาตรของสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไตเตรท ทำ blank ควบคู่ไปด้วย ตัวอย่างการคำนวณแสดงในภาคผนวก ก

3.2.3.3 การวิเคราะห์ปริมาณ Conjugate dienes และ Conjugate trienes (IUPAC, 1979)

ชั่งน้ำมันตัวอย่างให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน 0.4000 ± 0.0040 กรัม ในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมสารละลายเฮกเซนเพียงเล็กน้อยเพื่อละลายตัวอย่าง ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายเฮกเซน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 233, 262, 268 และ 274 นาโนเมตร นำผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณหาค่า conjugate dienes และ conjugate trienes โดยตัวอย่างการคำนวณแสดงในภาคผนวก ก

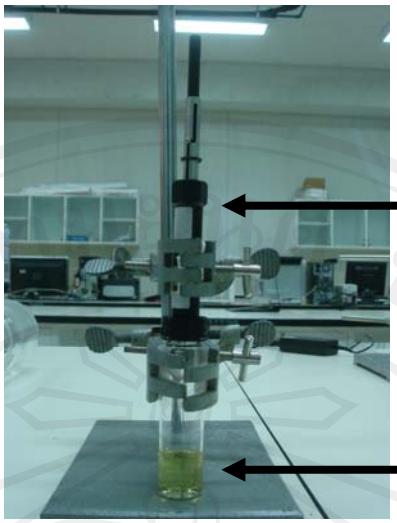
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.3.4 การวิเคราะห์ปริมาณเฮกซานาล (Hexanal content) ดัดแปลงจากวิธีการของ Vichi *et al.* (2003) และ Juntachote *et al.* (2007)

วิเคราะห์ปริมาณเฮกซานาล ด้วยวิธี Headspace Solid-phase Microextraction (HS-SPME) โดยใช้เครื่อง Gas Chromatography-Flame Ionization Detector (GC-FID) (SHIMADZU GC-2010, Japan) ซึ่งมีวิธีการใช้เครื่องแสดงในภาคผนวก ก การวิเคราะห์ทำโดย ปิเปตน้ำมันตัวอย่างจำนวน 6 มิลลิลิตร ลงใน vial ขนาด 20 มิลลิลิตร ปิดปาก vial ด้วยเซบตัมยาง ปิดฝาให้สนิท แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 24 ± 1 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เสียบ SPME ลงใน vial ค่อยๆ กดให้ fiber ออกมา โดยใช้เวลาในการสุ่มสารระเหยของตัวอย่าง 30 นาที แสดงดังรูป 3.1 จากนั้นค่อยๆ ดึง fiber ขึ้น ดึง SPME ออก แล้วนำ SPME ไปเสียบลงตรง injection port ของเครื่อง GC-FID แสดงดังรูป 3.2 นำค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของ hexanal แสดงดังภาพ ก.3 ในภาคผนวก ก ในการวิเคราะห์ปริมาณเฮกซานาล นี้ใช้ 2-Heptanone เป็น internal standard

สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ คือ capillary column (DB-1, 30 m. x 0.25 mm. I.D., 0.25 µm. film thickness; J&W Scientific, USA) ใช้ helium เป็นแก๊สพา (carrier gas) โดยกำหนดอุณหภูมิเริ่มต้นเท่ากับ 40 องศาเซลเซียส คงที่ที่อุณหภูมิดังกล่าว เป็นเวลา 1.5 นาที เพิ่มอุณหภูมิเป็น 200 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราเร็ว 6 องศาเซลเซียส/นาที และคงที่ที่อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที อุณหภูมิของ Flame Ionization Detector (FID) 250 องศาเซลเซียส เวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ทั้งหมด 33.17 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูป 3.1 การสุ่มสารระเหยของตัวอย่างด้วยเทคนิค SPME

รูป 3.2 เครื่อง Gas Chromatography-Flame Ionization Detector (GC-FID)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.4 การวิเคราะห์คุณภาพของมันฝรั่งแท่งทอด

3.2.4.1 การวิเคราะห์ค่า Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) (Miller, 1998)

ชั่งตัวอย่าง 3.5000 กรัม ในบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร ทำทั้งหมด 3 บีกเกอร์ (บันทึกน้ำหนักที่แน่นอนทุกครั้ง) เติม BHT ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 1 มิลลิลิตร ในทุกๆ บีกเกอร์ เติม 1,1,3,3-Tetramethoxypropan (TEP) ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ จำนวน 12 มิลลิลิตร ในบีกเกอร์ใดบีกเกอร์หนึ่งเพียงบีกเกอร์เดียว จากนั้นเติม Trichloroacetic acid ความเข้มข้นร้อยละ 10/Phosphoric acid ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ (TCA/H_3PO_4) จำนวน 33.5 มิลลิลิตร ในบีกเกอร์ที่มี TEP ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ จำนวน 12 มิลลิลิตร และเติม TCA/H_3PO_4 จำนวน 45.5 มิลลิลิตร ลงใน 2 บีกเกอร์ที่เหลือ ทำการปั่นตัวอย่างที่อยู่ในทุกๆ บีกเกอร์ ด้วยเครื่องปั่นแบบมือถือ ที่ความเร็วระดับสูง เป็นเวลา 30 วินาที (ล้างเครื่องปั่นทุกครั้งก่อนปั่นตัวอย่างถัดไป) กรองตัวอย่างที่ปั่นแล้ว ด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตของเหลวที่กรองได้จำนวน 5 มิลลิลิตร ลงใน screw-cap test tubes แล้วเติม Thiobarbituric acid (TBA reagent) ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ จำนวน 5 มิลลิลิตร (test sample) และปิเปตของเหลวที่กรองได้อีกจำนวน 5 มิลลิลิตร ลงใน screw-cap test tubes แล้วเติมน้ำจำนวน 5 มิลลิลิตร (sample blank) เขย่าสารละลายให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืด เป็นเวลา 15 – 20 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร โดยใช้น้ำเป็น reagent blank นำผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปวิเคราะห์โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของ Malondialdehyde (MDA) แสดงดังภาพ ก.4 ในภาคผนวก ก

3.2.5 วิธีการวิจัย

วิธีการวิจัย แบ่งออกเป็น 6 ตอนดังนี้

ตอนที่ 1 ศึกษาวิธีการสกัดที่เหมาะสมในการสกัดสารสกัดจากใบพลู

นำใบพลูผงที่ได้จากขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบ มาทำการสกัดสารสกัดด้วยวิธีการสกัดแบบต่างๆ การสกัดใช้ใบพลูผงต่อตัวทำละลายในอัตราส่วน 1 : 10 โดยนำใบพลูผง 5 กรัมใส่ลงในขวดสีชา เติมสารละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70 จำนวน 50 มิลลิลิตร ปิดปากขวดด้วยฟิล์ม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

พลาสติก จากนั้นทำการสกัดด้วยวิธีการสกัดแบบต่างๆ ดังนี้ การแช่ (maceration) โดยทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 1 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง การเขย่า (shaking) โดยนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่า (Heidolph UNIMAX 2010, Germany) ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2.5 ชั่วโมง และ 4.5 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 1 องศาเซลเซียส) การสกัดด้วยคลื่นอัลตร้าซาวด์ความถี่ต่ำ (ultrasonically assisted extraction, UAE) โดยการใช้เครื่อง Ultrasonic cleanser (CREST model 690TAE, Malaysia) ที่มีความถี่อยู่ในช่วง 42 – 45 กิโลเฮิร์ต เป็นเวลา 10 นาที และ 30 นาที การสกัดด้วยคลื่นไมโครเวฟ (microwave assisted extraction, MAE) โดยการใช้เครื่องไมโครเวฟ (National NN-K652, Japan) ที่มีความถี่ 2,450 กิโลเฮิร์ต จำนวน 2 ครั้งๆ ละ 15 วินาที และ 1 ครั้ง เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นกรองแยกเอากากออก เก็บสารสกัดที่กรองได้ในขวดสีชา นำสารสกัดที่ได้จากแต่ละวิธีการสกัด มาวิเคราะห์คุณภาพดังนี้

คุณภาพทางเคมี

- ร้อยละผลผลิตที่ได้ (% Yield) ดัดแปลงจากวิธีการของ Boryana *et al.* (2007)

- ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content) ตามวิธีการของ สุทัศน์และคณะ (2550)

- ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (Total flavonoid content) ตามวิธีการของ Chang *et al.* (2002)

- ความสามารถในการต้านออกซิเดชัน โดยวิธี DPPH ดัดแปลงจากวิธีการของ Masuda *et al.* (1999)

วางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) มีทั้งหมด 7 สิ่งทดลอง แสดงดังตาราง 3.1 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้ไปทำการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS 11.0 (SPSS Inc., Chicago, USA)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 3.1 วิธีการสกัดที่ใช้ในการศึกษา เพื่อหาวิธีการสกัดที่เหมาะสมในการสกัดสารสกัดจากใบพลู

สิ่งทดลอง	วิธีการสกัด
สิ่งทดลองที่ 1	การสกัดแบบแช่ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง
สิ่งทดลองที่ 2	การสกัดแบบเขย่า เป็นเวลา 2.5 ชั่วโมง
สิ่งทดลองที่ 3	การสกัดแบบเขย่า เป็นเวลา 4.5 ชั่วโมง
สิ่งทดลองที่ 4	การสกัดด้วยคลื่นอัลตร้าซาวด์ความถี่ต่ำ เป็นเวลา 10 นาที
สิ่งทดลองที่ 5	การสกัดด้วยคลื่นอัลตร้าซาวด์ความถี่ต่ำ เป็นเวลา 30 นาที
สิ่งทดลองที่ 6	การสกัดด้วยคลื่นไมโครเวฟจำนวน 2 ครั้งๆ ละ 15 วินาที
สิ่งทดลองที่ 7	การสกัดด้วยคลื่นไมโครเวฟจำนวน 1 ครั้ง เป็นเวลา 30 วินาที

ตอนที่ 2 ศึกษาความเข้มข้นของตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารสกัดจากใบพลู

นำใบพลูผงที่ได้จากขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบ มาทำการสกัดโดยใช้สารละลายเอทานอลที่ความเข้มข้นแตกต่างกันในการสกัด การสกัดใช้ใบพลูผงต่อตัวทำละลายในอัตราส่วน 1 : 10 โดยนำใบพลูผง 5 กรัมใส่ลงในขวดสีชา เติมสารละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 70 และ 100 จำนวน 50 มิลลิลิตร ปิดปากขวดให้สนิท ทำการสกัดด้วยวิธีการสกัดที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในตอนที่ 1 จากนั้นกรองแยกเอากากออก เก็บสารสกัดที่กรองได้ในขวดสีชา นำสารสกัดที่ได้จากการใช้สารละลายเอทานอลที่ความเข้มข้นแตกต่างกันในการสกัด มาวิเคราะห์คุณภาพดังนี้

คุณภาพทางเคมี

- ร้อยละผลผลิตที่ได้ (% Yield) ดัดแปลงจากวิธีการของ Boryana *et al.* (2007)

- ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content) ตามวิธีการของ สุทัศน์ และคณะ (2550)

- ความสามารถในการต้านออกซิเดชัน โดยวิธี DPPH ดัดแปลงจากวิธีการของ Masuda *et al.* (1999)

- วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดที่มีคุณภาพดีที่สุด วิเคราะห์โดยวิธี Gas Chromatography-Mass Spectrometer (GC-MS) ตามวิธีการของ นงลักษณ์ (2543)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) มีทั้งหมด 3 สิ่งทดลอง แสดงดังตาราง 3.2 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้ไปทำการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS 11.0 (SPSS Inc., Chicago, USA)

ตาราง 3.2 ความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลที่ใช้ศึกษา เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการสกัดสารสกัดจากใบพลู

สิ่งทดลอง	ความเข้มข้นของสารละลายเอทานอล
สิ่งทดลองที่ 1	สกัดด้วยสารละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50
สิ่งทดลองที่ 2	สกัดด้วยสารละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70
สิ่งทดลองที่ 3	สกัดด้วยสารละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 100

ตอนที่ 3 ศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อความคงตัวของสารสกัดจากใบพลู

ทำการสกัดสารสกัดจากใบพลู ด้วยวิธีการสกัดที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในตอนที่ 1 และใช้สารละลายเอทานอลที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในตอนที่ 2 ในการสกัดได้สารสกัดที่มีคุณภาพดีที่สุด มาทำการศึกษาถึงปัจจัยที่ส่งผลต่อความคงตัวของสารสกัด 2 ปัจจัย คือ แสง และอุณหภูมิ การทดลองทำโดยเก็บสารสกัดใน vial ที่มีอลูมิเนียมฟอยล์หุ้ม และไม่มีอลูมิเนียมฟอยล์หุ้ม ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 1 องศาเซลเซียส) และที่อุณหภูมิตู้แช่เย็น (4 ± 1 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 28 วัน ทำการวิเคราะห์คุณภาพของสารสกัดทุกๆ 7 วัน ดังนี้

คุณภาพทางเคมี

- ความสามารถในการต้านออกซิเดชัน โดยวิธี DPPH ดัดแปลงจากวิธีการของ Masuda *et al.* (1999)

วางแผนการทดลองแบบ 2^2 Factorial in completely randomized design มีทั้งหมด 4 สิ่งทดลอง แสดงดังตาราง 3.3 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้ไปทำการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS 11.0 (SPSS Inc., Chicago, USA)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 3.3 สภาวะการเก็บสารสกัดจากใบพลูที่ใช้ในการศึกษา

สิ่งทดลอง	สภาวะการเก็บสารสกัด
สิ่งทดลองที่ 1	เก็บสารสกัดใน vial ที่ไม่มีอลูมิเนียมฟอยล์หุ้มที่อุณหภูมิห้อง
สิ่งทดลองที่ 2	เก็บสารสกัดใน vial ที่มีอลูมิเนียมฟอยล์หุ้มที่อุณหภูมิห้อง
สิ่งทดลองที่ 3	เก็บสารสกัดใน vial ที่ไม่มีอลูมิเนียมฟอยล์หุ้มที่อุณหภูมิตู้แช่เย็น
สิ่งทดลองที่ 4	เก็บสารสกัดใน vial ที่มีอลูมิเนียมฟอยล์หุ้มที่อุณหภูมิตู้แช่เย็น

ตอนที่ 4 ศึกษาผลของความเข้มข้นของสารสกัดจากใบพลูต่อการเกิดออกซิเดชันของน้ำมันพืช

นำสารสกัดที่ได้จากวิธีการสกัดที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในตอนที่ 1 และใช้สารละลายเอทานอลที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในตอนที่ 2 ในการสกัด มาทำการระเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ ที่ความดัน 50 มิลลิบาร์ อุณหภูมิอ่างน้ำ 55 องศาเซลเซียส ได้สารสกัดข้นหนืด นำสารสกัดที่ได้ใส่ลงในน้ำมันพืชที่ความเข้มข้น 0 (ชุดควบคุม) 200 ppm 500 ppm 1,000 ppm และ 2,000 ppm จากนั้นนำน้ำมันพืชดังกล่าวไปให้ความร้อนด้วยเตาไฟฟ้า ที่อุณหภูมิ 160 ± 0.4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที วิเคราะห์คุณภาพของน้ำมันพืชก่อนและหลังนำไปให้ความร้อน ดังนี้

คุณภาพทางกายภาพ

- ค่าสี ระบบ L* a* b* ด้วยเครื่อง KONICA MINOLTA model CR-410, Japan
- ความหนืด ด้วยเครื่อง Brookfield RVDV+11, USA

คุณภาพทางเคมี

- ค่าเปอร์ออกไซด์ (Peroxide value, P.V.) (AOAC, 2000)
- ปริมาณกรดไขมันอิสระ (Free fatty acid, FFA) (AOAC, 2000)
- ปริมาณ conjugate dienes และ conjugate trienes (IUPAC, 1979)
- ปริมาณเฮกซานาล ดัดแปลงจากวิธีการของ Vichi *et al.* (2003) และ Juntachote *et al.* (2007)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) มีทั้งหมด 5 สิ่งทดลอง แสดงดังตาราง 3.4 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้ไปทำการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS 11.0 (SPSS Inc., Chicago, USA)

ตาราง 3.4 ความเข้มข้นของสารสกัดจากใบพลูที่ใส่ในน้ำมันพืช เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของสารสกัดต่อการเกิดออกซิเดชันของน้ำมันพืช

สิ่งทดลอง	ความเข้มข้นของสารสกัดที่ใส่ในน้ำมันพืช
สิ่งทดลองที่ 1	0 ppm (ชุดควบคุม)
สิ่งทดลองที่ 2	200 ppm
สิ่งทดลองที่ 3	500 ppm
สิ่งทดลองที่ 4	1,000 ppm
สิ่งทดลองที่ 5	2,000 ppm

ตอนที่ 5 ศึกษาผลของสารสกัดจากใบพลูต่อความคงตัวของน้ำมันพืชเมื่อได้รับความร้อนซ้ำ

ใส่สารสกัดที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในตอนที่ 4 ลงในน้ำมันพืช นำน้ำมันพืชไปให้ความร้อนด้วยเตาไฟฟ้า ที่อุณหภูมิ 160 ± 0.4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 1 ครั้ง 2 ครั้ง 3 ครั้ง และ 4 ครั้ง ทำการทดลองเทียบกับน้ำมันพืชไม่ใส่สารสกัด (ชุดควบคุม) และน้ำมันพืชใส่ BHT 200 ppm วิเคราะห์คุณภาพของน้ำมันพืชก่อนและหลังนำไปให้ความร้อน ดังนี้

คุณภาพทางกายภาพ

- ค่าสี ระบบ L* a* b* ด้วยเครื่อง KONICA MINOLTA CR-410, Japan
- ความหนืด ด้วยเครื่อง Brookfield RVDV+11, USA

คุณภาพทางเคมี

- ค่าเปอร์ออกไซด์ (Peroxide value, P.V.) (AOAC, 2000)
- ปริมาณกรดไขมันอิสระ (Free fatty acid, FFA) (AOAC, 2000)
- ปริมาณ conjugate dienes และ conjugate trienes (IUPAC, 1979)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- ปริมาณเฮกซานาล ดัดแปลงจากวิธีการของ Vichi *et al.* (2003) และ Juntachote *et al.* (2007)

วางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้ไปทำการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS 11.0 (SPSS Inc., Chicago, USA)

ตอนที่ 6 การประยุกต์ใช้น้ำมันพืชใส่สารสกัดจากใบพลูกับผลิตภัณฑ์อาหาร

ทำการทอดมันฝรั่งแท่งแช่แข็ง ในน้ำมันพืชใส่สารสกัดจากใบพลูที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม ที่อุณหภูมิ 160 ± 0.4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที การทอดใช้มันฝรั่งแท่งแช่แข็ง 200 กรัมต่อน้ำมันพืช 1,000 มิลลิลิตร ทำการทอดมันฝรั่งครั้งใหม่ในน้ำมันพืชเดิมที่ผ่านการทอดมาแล้ว 1 ครั้ง 2 ครั้ง และ 3 ครั้ง ที่อุณหภูมิและเวลาดังกล่าว ทำการทดลองเทียบกับเมื่อใช้น้ำมันพืชไม่ใส่สารสกัดทอดมันฝรั่งแท่งแช่แข็ง (ชุดควบคุม) วิเคราะห์คุณภาพของน้ำมันพืชและมันฝรั่งแท่งทอดหลังการทอดแต่ละครั้ง ดังนี้

น้ำมันพืช วิเคราะห์คุณภาพดังนี้

คุณภาพทางเคมี

- ค่าเปอร์ออกไซด์ (Peroxide value, P.V.) (AOAC, 2000)
- ปริมาณกรดไขมันอิสระ (Free fatty acid, FFA) (AOAC, 2000)

มันฝรั่งแท่งทอด วิเคราะห์คุณภาพดังนี้

คุณภาพทางกายภาพ

- ค่าสี ระบบ L* a* b* ด้วยเครื่อง KONICA MINOLTA CR-410, Japan

คุณภาพทางเคมี

- Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) (Miller, 1998)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

คุณภาพทางด้านประสาทสัมผัส

ทำการทดสอบความชอบของผู้บริโภคจำนวน 50 คน ที่มีต่อผลิตภัณฑ์มันฝรั่งแท่งทอด ในด้าน ความชอบโดยรวม สีของมันฝรั่งแท่งทอด กลิ่นของมันฝรั่งแท่งทอด และรสชาติของมันฝรั่งแท่งทอด โดยการให้คะแนนความชอบ 1 ถึง 9 (9-point hedonic scale) (Peryam and Pilgrim, 1957) ผู้ทดสอบชิมประกอบไปด้วยนักศึกษา และบุคลากร ของคณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยมีตัวอย่างแบบสอบถาม ดังแสดงในภาคผนวก ข

วางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้ไปทำการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS 11.0 (SPSS Inc., Chicago, USA)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved