

เบทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบ

ผลมะเกี๋ยง (*Cleistocalyx nervosum* var. *paniala*) คัดเฉพาะผลสุกสีแดงสดทั้งผล จากนั้นล้างทำความสะอาดผลมะเกี๋ยงด้วยน้ำคลอรีนความเข้มข้น 50 ppm รอสะเด็ดน้ำ และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อรอทำการวิจัยต่อไป

3.2 เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

3.2.1 เครื่องมือ

1. เครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary Evaporators)
2. เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (UV-Vis Spectrophotometer)
3. เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze Dryer)
4. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด – ด่าง (pH Meter)
5. เครื่องปั่น (Shaker)
6. เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Digital Balance)
7. ตู้เย็น (Refrigerator)
8. เครื่องปั๊มสุญญากาศ (Vacuum Pump)
9. เครื่องวัดค่าปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (Pocket- Refractometer)
10. เครื่องเขย่าสาร (Vortex Mixer)
11. ตู้แช่แข็ง (Deep Freezer)

3.2.2 วัสดุและอุปกรณ์

1. ตะแกรงตั้งหลอดทดลอง (Stainless Test Tube Stand)
2. ขวดน้ำกลั่น (Plastic Wash Bottle)
3. กระดาษกรองเบอร์ 1 (Filter Paper No.1)
5. ปีกเกอร์ (Beaker)
6. แท่งแก้วคนสาร (Stirring Rod)
7. ปิเปตต์ (Pipette)
8. หลอดทดลอง (Tube)
9. ขวดปรับปริมาตร (Volumetric Flask)

10. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmayer Flask)
11. ช้อนตักสาร (Chemical Spoon)
12. กระบอกตวง (Cylinder)
13. กรวยกรองบุชเนอร์ (Buchner Funnel)
14. ลูกยางแดง (Rubber)
15. หลอดวัดการดูดแสง (Cuvette)
16. ขวดสีชา (Dropping Bottle)
17. ไมโครปิเปตต์ (Micropipette)
18. หลอดหยด (Dropper)
19. ถุงอะลูมิเนียมฟอยล์ (Aluminium Foil Bag)
20. อะลูมิเนียมฟอยล์ (Aluminium Foil)
21. กรวยกรอง (Extraction Cup)

3.3 สารเคมี

1. เอทานอล C_2H_5OH (Ethanol)
2. โพแทสเซียมคลอไรด์ KCL (Potassium Chloride)
3. กรดไฮโดรคลอริก HCL (Hydrochloric Acid)
4. โซเดียมอะซิเตต $CH_3COONa.3H_2O$ (Sodium Acetate)
5. โซเดียมคาร์บอเนต Na_2CO_3 (Sodium Carbonate)
6. สารละลายฟอลิน (Folin-Ciocalteu Reagent)
7. กรดแกลลิก $C_7H_6O_5$ (Gallic Acid)
8. สาร DPPH (2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl)
9. มอลโตเดกซ์ทริน (Maltodextrin)
10. กัมอาระบิก (Gum Arabic)
11. ไตรแคลเซียมฟอสเฟต (Tricalcium Phosphate)

3.4 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง

3.4.1 การเตรียมตัวอย่าง

นำผลไม้แห้งที่แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส มาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อละลายน้ำแข็ง จากนั้นคัดเลือกเอาเฉพาะผลที่มีสีแดงถึงสีแดงปน

ม่วง ล้างทำความสะอาด รอสระเด็ดน้ำ จากนั้นทำการเอามะลิสดออก จะได้เฉพาะส่วนเนื้อมะเกี๋ยง นำเนื้อมะเกี๋ยงไปปั่นด้วยเครื่องปั่นจนละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน จะได้เนื้อมะเกี๋ยงปั่นละเอียด

3.4.2 การศึกษาผลของอัตราส่วนของเนื้อมะเกี๋ยงต่อตัวทำละลายในการสกัดแอนโธไซยานินจากมะเกี๋ยง

ในการศึกษาผลของอัตราส่วนของเนื้อมะเกี๋ยงต่อตัวทำละลายในการสกัดแอนโธไซยานินจากมะเกี๋ยง จะใช้อัตราส่วนของเนื้อมะเกี๋ยงต่อตัวทำละลาย ได้แก่ 1:3 , 1:4 , 1:5 , 1:6 และ 1:7 กรัม : มิลลิลิตร ซึ่งใช้ตัวทำละลายเป็นเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 90 ใส่ลงในขวดแก้วสีชา เขย่าและเก็บไว้ในที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 และนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ แล้วเก็บใส่ในขวดสีชาไว้ในที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เพื่อรอทำการวิเคราะห์

- 1) ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด
- 2) ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)
- 3) ค่าสี L^*, a^*, b^*
- 4) ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด
- 5) ปริมาณแอนโธไซยานิน ด้วยวิธี pH differential
- 6) ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (ร้อยละ)

3.4.3 การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารเอนแคปซูเลตติ้งที่เหมาะสมในการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งของมะเกี๋ยง

ในการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารเอนแคปซูเลตติ้งที่เหมาะสมในการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งของมะเกี๋ยง จะทำการศึกษาสารเอนแคปซูเลตติ้ง 3 ชนิด ได้แก่ มอลโตเด็คซ์ตริน กัมอารบิก และสารผสมระหว่างมอลโตเด็คซ์ตรินและกัมอารบิก โดยสารเอนแคปซูเลตแต่ละชนิดที่จะทำการทดลองด้วยความเข้มข้น 3 ระดับ ได้แก่ 10% , 20% และ 30% โดยนำสารสกัดแอนโธไซยานินจากมะเกี๋ยง แช่แข็งที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างไปเข้าเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง เป็นเวลา 15 ชั่วโมง ทำการวิเคราะห์ปริมาณผลิตภัณฑ์ผงที่ได้ (% yield) และประสิทธิภาพของการเอนแคปซูเลตแอนโธไซยานินที่กักเก็บได้ (% EE)

3.4.4 การศึกษาสมบัติทางกายภาพและเคมีของผงแอนโธไซยานินจากมะเกี๋ยง

3.4.4.1 ปริมาณผลิตภัณฑ์ผงที่ได้ (%Yield) (นันทศักดิ์และคณะ, 2553) เป็นเปอร์เซ็นต์ผลิตภัณฑ์ผงที่ได้ คือ อัตราส่วนปริมาณของแข็งทั้งหมดในผลิตภัณฑ์แห้งต่อปริมาณ

ของแข็งทั้งหมดในวัตถุดิบที่ป้อน หาโดยการชั่งน้ำหนักของผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้ และปริมาณของแข็งในวัตถุดิบเริ่มต้น โดยนำตัวอย่างผลิตภัณฑ์มาหาความชื้นและนำมาคำนวณจากสมการ

$$\%Yield = \frac{W_{CP}}{SS_{CF}} \times 100$$

เมื่อ W_{CP} = ปริมาณของแข็งทั้งหมดในผลิตภัณฑ์แห้ง (g)

SS_{CF} = ปริมาณของแข็งทั้งหมดในวัตถุดิบที่ป้อน (g)

3.4.4.2 ปริมาณความชื้น (Moisture content, %) นำผงตัวอย่าง 3 กรัม ไปชั่งน้ำหนัก หลังจากนั้นนำไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง อบจนน้ำหนักคงที่ คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความชื้นจาก อัตราส่วนของน้ำหนักผลิตภัณฑ์ผงที่หายไปต่อน้ำหนักของผงเริ่มต้น (Knegt, R. & Brink, H., 1998) จากสมการ

$$\% moisture = \frac{(m_1 - m_2) \times 100}{m_1 - m_0}$$

เมื่อ m_0 = น้ำหนักถ้วยและฝา (g)

m_1 = น้ำหนักถ้วย ฝา และน้ำหนักก่อนอบ (g)

m_2 = น้ำหนักถ้วย ฝา และน้ำหนักหลังอบ (g)

3.4.4.3 ค่า Water activity, (a_w) การวัดปริมาณน้ำอิสระที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ในการดำรงชีวิตได้โดยใช้เครื่องวัดค่า a_w อัตโนมัติ

3.4.4.4 ค่าสี (Color) (Selim, et al., 2008) นำผลิตภัณฑ์ผง วัดค่าสี L^* a^* b^* (ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ) ในระบบสี CIE โดย ค่า L^* แทนค่าความสว่าง ค่า a^* แทนค่าสีแดง เมื่อ (+) แทนค่าสีเขียว เมื่อ (-) และ ค่า b^* แทนค่าสีเหลือง เมื่อ (+) แทนค่าสีน้ำเงิน เมื่อ (-)

3.4.4.5 ความหนาแน่น (Bulk density, g/cm^3) ชั่งน้ำหนักถ้วยหรือภาชนะที่ทราบปริมาตรแน่นอน ใส่ตัวอย่างให้เต็มภาชนะแล้วปาดออก คำนวณค่าเพื่อหาความหนาแน่น จากสมการ

$$\rho = \frac{m}{v}$$

เมื่อ m = มวลของตัวอย่าง (g)
 v = ปริมาตรของตัวอย่าง (cm^3)

3.4.4.6 ความสามารถในการละลาย (Solubility) (สโรบล และคณะ, 2550)

ชั่งน้ำหนักผลิตภัณฑ์ผง 3 กรัม ใส่ลงในน้ำปริมาณ 150 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส กวนผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง Magnetic stirrer ที่ความเร็วคงที่จับเวลาที่ใช้ในการละลายของตัวอย่างจนสมบูรณ์

Solubility = เวลาที่ใช้ในการละลายของตัวอย่างจนสมบูรณ์

3.4.4.7 ประสิทธิภาพในการเอนแคปซูเลทแอนโธไซยานิน (Encapsulation Efficiency) อัตราส่วนระหว่างปริมาณแอนโธไซยานินหลังการทำแห้งต่อปริมาณแอนโธไซยานินก่อนการทำแห้ง

$$\% \text{ EE} = \frac{\text{Total Anthocyanin in Dried Sample}}{\text{Initial Total Anthocyanin Extract}} \times 100$$

3.5 การวางแผนการทดลองและบันทึกข้อมูลทางสถิติ

โดยการวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design : CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และทำการวิเคราะห์ผลข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Statistic 8.0