บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. วัสดุพันธุ์พืช ผัก 25 ชนิด ที่ใช้ในการทดลองประกอบไปด้วย

- ผักกาดหอมห่อ (*Lactuca sativa* L. var. *Capitata* L.)
- เซเลอรี (*Apium graveolens*)
- หอมต้น (*Allium fistulosum* L.)
- กระเทียมต้น (*Allium ampeloprasum*)
- ผักกาดหางหงส์ (*Brassica campestris* var. *Cylindrical*)
- ผักกาดหอมใบแดง (*Lactuca sativa* var. *Acephala* cv. Lollo Rossa)
- ปวยเล้ง (*Spinacia oleracea*)
- กะหล่ำปลี (*Brassica oleracea* var. *Capitata*)
- ผักกาดหวาน (*Lactuca sativa* L. var. *Longifolia*)
- ผักกาดขาวปลี (*Brassica campestris* var. *Pekinensis*)
- ยอดผักชาโยเต้ (*Sechium edule*)
- บรอกโคลี (*Brassica oleracea* L. var. *Italica*)
- กะหล่ำปลีสีม่วง (*Brassica oleracea* var. *Capitata* f. *rubra*)
- ข้าวโพดหวาน (*Zea mays* var. *Rugosa*)
- แตงกวายาว (*Cucumis sativus*)
- ซุกินี (*Cucurbita pepo*)
- พริกหวานเขียว (*Capsicum annuum* L.)
- พริกหวานแดง (*Capsicum annuum* L.)
- พริกหวานเหลือง (*Capsicum annuum* L.)
- ถั่วแขก (*Phaseolus vulgaris*)
- ฟักทองญี่ปุ่น (*Cucurbita moschata* L.)
- มะเขือเทศผลโต (*Lycopersicon esculentum* var. *Esculentum*)
- มะเขือเทศเชอรี (*Lycopersicon esculentum* var. *Cerasiforme*)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- แครอท (*Daucus carota*)
- บีท (*Beta vulgaris*)

ผักทั้ง 25 ชนิด เก็บเกี่ยวในระยะความแก่ทางการค้า จากแหล่งปลูกศูนย์พัฒนาโครงการหลวงแม่แฮ อ่างขาง และแม่สาใหม่ ขนส่งมาที่ศูนย์ผลิตผลโครงการหลวง ตำบลแม่เหียะ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ แล้วส่งมายังห้องปฏิบัติการหลังการเก็บเกี่ยวพืชสวน สาขาวิชาพืชสวน ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

2. อุปกรณ์

2.1 เครื่องชั่งแบบทศนิยม 2 ตำแหน่ง รุ่น BA3100P ของบริษัท Satorius *Basic* ชั่งน้ำหนักได้สูงสุด 600 กรัม และเครื่องชั่งแบบละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่งรุ่น HR-200 ของบริษัท AND ชั่งน้ำหนักได้สูงสุด 210 กรัม

2.2 เครื่องบดเมล็ดกาแฟ (coffee blender) รุ่น 2149 ของบริษัท PRINCESS

2.3 เครื่องเขย่าสาร

2.4 เครื่องกวนสารเคมีด้วยแท่งแม่เหล็กและให้ความร้อน ของบริษัท Nuova II

2.5 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (digital spectrophotometer) รุ่น Spectro 23 ของบริษัท LaboMed

2.6 micropipette ของบริษัท NICHIRYO

2.7 กระดาษกรอง Whatman No.1 และ No.4

2.8 เครื่องวัดสี (chroma meter) ตัวเครื่องรุ่น CR-300 หัววัด CR-310 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร ของบริษัท Minolta

2.9 เครื่องลดอุณหภูมิด้วยระบบสุญญากาศ รุ่น Vacuum cooler-2 pallets ของบริษัท Hussmann

2.10 ตู้แช่ที่ใช้ในการเก็บรักษาผัก รุ่น PT203 ของบริษัท Sanden Intercool

2.11 มีดปอกผลไม้

2.12 เขียงพลาสติก

2.13 กล้องถ่ายรูป

2.14 ชั้นวางหลอดทดลอง

2.15 nylon syringe filter ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 μm ของบริษัท Sartorius

2.16 ลูกยางดูดอากาศ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.17 เครื่องวัดความชื้น

2.18 เครื่องวัดอุณหภูมิ

2.19 นาฬิกาจับเวลา ของบริษัท CASIO

2.20 กล่องครอบปฏิกิริยาในที่มืด

2.21 ถังอะลูมิเนียม

2.22 เครื่องแก้ว

- บีกเกอร์ (beaker)
- ขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask)
- ขวดปรับปริมาตร (volumetric flask)
- กระบอกตวง (cylinder)
- บิวเรต (burette)
- ปิเปต (pipette)
- syringe 50 ขนาดมิลลิลิตร
- แท่งแก้วคนสารละลาย (stirrer)
- กรวยกรอง
- หลอดทดลอง
- cork borer

3. สารเคมีและวิธีการเตรียมสารเคมี

3.1 สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณวิตามินซี

- กรดออกซาลิก (oxalic acid, UNIVAR) ความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยชั่งกรดออกซาลิก 4.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1000 มิลลิลิตร

- 2, 6-ไดคลอโรฟีนอล อินโดฟีนอล (2, 6-dichlorophenol indophenol, SIGMA) ความเข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยชั่ง 2, 6-ไดคลอโรฟีนอล อินโดฟีนอล 0.4 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1000 มิลลิลิตร แล้วนำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิต่ำ

- กรดแอสคอร์บิกมาตรฐาน (ascorbic acid, Merck) ชั่งกรดแอสคอร์บิก 0.05 กรัม ละลายในกรดออกซาลิกเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ แล้วปรับปริมาตรด้วยกรดออกซาลิกให้ครบ 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปไทไทรตด้วย 2, 6-ไดคลอโรฟีนอล อินโดฟีนอล เพื่อนำปริมาณ 2, 6-ไดคลอ-โรฟีนอล อินโดฟีนอล ที่ใช้ไปมาเป็นมาตรฐานในการคำนวณหาปริมาณวิตามินซี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2 สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซนานิน

- กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid, J.T. Baker) ความเข้มข้น 1.5 นอร์มัล เตรียมโดยใช้กรดไฮโดรคลอริกปริมาตร 62.17 มิลลิลิตร เติมลงในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 500 มิลลิลิตร

- เอททาโนลิกไฮโดรคลอริก (เอทานอล : กรดไฮโดรคลอริก) เตรียมโดยใช้เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ : กรดไฮโดรคลอริก 1.5 นอร์มัล ในอัตราส่วน 85 : 15 แล้วเก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิต่ำ

3.3 สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์

- ไดเมธิลซัลฟอกไซด์ (dimethylsulphoxide: DMSO, LAB-SCAN)

3.4 สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์

- อะซีโตน (acetone, Merck) ความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยตวงอะซีโตนความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ 80 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

3.5 สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์กิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระ

- สารละลาย DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, Fluka) เตรียมโดยชั่ง 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl 74 มิลลิกรัม ละลายในเอทานอลเข้มข้น 99.8 เปอร์เซ็นต์ (absolute ethanol) แล้วปรับปริมาตรด้วยเอทานอลเข้มข้น 99.8 เปอร์เซ็นต์ให้ครบ 200 มิลลิลิตร แล้วนำมากรองด้วย nylon syringe filter ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 μm เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิต่ำ

- กรดแกลลิก (gallic acid, Fluka) เตรียมโดยชั่งกรดแกลลิก 24.1 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.6 สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอล

- โซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate, Merck) ความเข้มข้น 7.5 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยชั่งโซเดียมคาร์บอเนต 7.5 กรัม ละลายในนำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

- Folin-Ciocalteau's phenol reagent, Merck.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

4. วิธีการเตรียมสารสกัดผัก

สุ่มตัวอย่างผักจากชั้นวางจำหน่ายจำนวน 3 หน่วย

↓

หั่นผักให้ละเอียด แล้วเติมไนโตรเจนเหลวลงไปจนผักแข็งตัว

↓

ปั่นตัวอย่างที่แข็งตัวให้ละเอียดด้วยเครื่องบดเมล็ดกาแฟ

↓

ชั่งตัวอย่างละเอียด 20 กรัม แล้วเติม methanol 100% ปริมาตร 20 มิลลิลิตร

↓

เขย่าสารละลายที่อุณหภูมิห้องในสภาพมืดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

↓

กรองสารละลายที่ได้โดยใช้กระดาษกรอง Whatman No.1 และดูดสารสกัดจากพืชที่กรองได้ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตรโดย methanol 100%

↓

กรองสารละลายด้วย 0.45 μm syringe nylon filter

↓

เก็บรักษาสารสกัดผักไว้ในสภาพมืด ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

สถานที่ทำการวิจัย

1. หน่วยวิจัยหลังการเก็บเกี่ยวพืชสวน สาขาวิชาพืชสวน ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2. ศูนย์ผลิตผลโครงการหลวง ตำบลแม่เหียะ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1คุณภาพทางกายภาพ คุณภาพทางเคมี กิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระ และอายุการวางจำหน่ายของผัก 25 ชนิด

นำตัวอย่างผักชนิดละ 3 ซ้ำ มาวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอล ปริมาณวิตามินซี ปริมาณแอนโทไซยานิน ปริมาณคลอโรฟิลล์รวม ปริมาณแคโรทีนอยด์รวม กิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระ และอายุการวางจำหน่าย โดยผักที่ใช้แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 กลุ่มผักบริโภคใบ ได้แก่ ผักกาดหอมห่อ เซลารี หอมต้น กระเทียมต้น ผักกาดหางหงษ์ ผักกาดหอมใบแดง ปวยเล้ง กะหล่ำปลี ผักกาดหวาน ผักกาดขาวปลี ยอดผักชาโยเต้ บรอกโคลี และกะหล่ำปลีสีม่วง

กลุ่มที่ 2 กลุ่มผักบริโภคผล ได้แก่ ข้าวโพดหวาน แตงกวายาว ซุกินี พริกหวานสีเขียว พริกหวานสีแดง พริกหวานสีเหลือง ถั่วแขก ฟักทองญี่ปุ่น มะเขือเทศผลโต และมะเขือเทศเชอรี

กลุ่มที่ 3 กลุ่มผักบริโภคส่วนราก ได้แก่ แครอท และบีท

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD) มี 25 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีคือผักแต่ละชนิด แต่ละกรรมวิธีประกอบด้วย 3 ซ้ำ ซึ่งวิธีการวิเคราะห์หาสารประกอบแต่ละชนิด และอายุการวางจำหน่ายมีรายละเอียดดังนี้

1.1 การหาปริมาณสารประกอบฟีนอล

หาปริมาณสารประกอบฟีนอลตามกระบวนการดัดแปลงมาจาก Sellappan *et al*. (2002) ซึ่งมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

นำสารสกัดผักที่เตรียมไว้ปริมาตร 50 ไมโครลิตรใส่ลงในหลอดทดลองขนาดเล็ก

↓

เติม methanol 100% ปริมาตร 50 ไมโครลิตร

↓

เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1000 ไมโครลิตร

↓

เติมโซเดียมคาร์บอเนต 7.5% ปริมาตร 375 ไมโครลิตร แล้ววางไว้ประมาณ 5 นาที

↓

เติม Folin-Ciocalteau solution ปริมาตร 125 ไมโครลิตร ร่วมกับน้ำกลั่นปริมาตร 1000 ไมโครลิตร

↓

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้องในสภาวะมืดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง
วัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร
(ใช้สารละลายที่ปราศจากสารสกัดจากพืชเป็นค่ามาตรฐาน (Blank))

นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาปริมาณสารประกอบฟีนอล โดยเทียบเป็นหน่วยไมโครกรัมเทียบกับกรดแกลลิกต่อน้ำหนักตัวอย่างสด 1 กรัม (Microgram Gallic Acid Equivalent/g Fresh Weight)

1.2 การหาปริมาณวิตามินซี

วิเคราะห์ปริมาณวิตามินซี ด้วยวิธี Indophenol โดยนำตัวอย่างผักที่ปั่นละเอียดมา 10 กรัม แล้วเติมกรดออกซาลิกเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ โดยปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 นำสารละลายที่กรองได้มา 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปไทเทรตกับ 2, 6-ไดคลอโรฟีนอล อินโดฟีนอล ความเข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์ จนถึงจุดยุติซึ่งสารละลายมีสีชมพูประมาณ 15 วินาที ในกรณีของบีท และกะหล่ำปลีสีม่วงจะนำสารละลายที่กรองได้มา 1 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยกรดออกซาลิกเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ เป็น 10 มิลลิลิตร ก่อนนำไปไทเทรตด้วย 2, 6-ไดคลอโรฟีนอล อินโดฟีนอล หลังจากนั้นคำนวณหาปริมาณวิตามินซีโดยใช้ปริมาณ 2, 6-ไดคลอโรฟีนอล อินโดฟีนอล ที่ใช้กับสารตัวอย่าง เทียบกับ 2, 6-ไดคลอโรฟีนอล อินโดฟีนอล ที่ใช้กับวิตามินซีมาตรฐาน โดยคำนวณตามสูตร (Ranganna, 1986)

ปริมาณ indophenol dye a มิลลิลิตร มี ascorbic acid เท่ากับ 1 มิลลิกรัม (จาก standard)
ปริมาณ indophenol dye b มิลลิลิตร มี ascorbic acid เท่ากับ (1 × b) / a มิลลิกรัม
(จากสารละลายตัวอย่าง) เท่ากับ c มิลลิกรัม

สารละลาย 10 มิลลิลิตร มี ascorbic acid เท่ากับ c มิลลิกรัม
สารละลาย 100 มิลลิลิตร มี ascorbic acid เท่ากับ (c × 100) / 10 มิลลิกรัม
เท่ากับ d มิลลิกรัม

เนื้อตัวอย่าง 10 กรัม มี ascorbic acid เท่ากับ d มิลลิกรัม
เนื้อตัวอย่าง 100 กรัม มี ascorbic acid เท่ากับ (d × 100) / 10 มิลลิกรัม
เท่ากับ e มิลลิกรัม / 100 กรัมน้ำหนักสด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.3 การหาปริมาณแอนโทไซยานิน/บีตาเลน

วิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินตามวิธีการของ Ranganna (1986) ซึ่งมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

ชั่งตัวอย่างปั่นละเอียดมา 1 กรัม

↓

เติม ethanolic hydrochloric ปริมาตร 40 มิลลิลิตร แล้วใช้แท่งแก้วคนสารละลายให้ผสมกัน

↓

เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องสภาวะมืดนาน 5 ชั่วโมง

↓

กรองสารละลายด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1

↓

ปรับปริมาตรด้วยสารละลาย ethanolic hydrochloric ให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

↓

วัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 535 นาโนเมตร กรณีการหาแอนโทไซยานิน

วัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 533 นาโนเมตร กรณีการหาบีตาเลน

นำค่า OD ที่ได้ไปแทนค่าในสูตรหาปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด มีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักสด โดยสูตรที่ใช้คำนวณคือ

$$\text{Total absorbance} = \frac{\text{Absorbance at 535 nm} \times \text{final volume} \times 100}{\text{Weight of sample}}$$

$$\text{Total anthocyanin content} = \frac{\text{Total absorbance}}{98.2}$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.4 การหาปริมาณคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และคลอโรฟิลล์รวม

วิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ด้วยวิธีของ Whitham (1971) ตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

ชั่งตัวอย่างปั่นละเอียดมา 1 กรัม

↓

เติม acetone เข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

↓

วางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที

กรองสารละลายด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1

↓

ปรับปริมาตรด้วย acetone เข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ เป็น 15, 20 หรือ 25 มิลลิลิตร ขึ้นอยู่กับความเข้มขององค์ประกอบสีเขียว

↓

นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 645 และ 663 นาโนเมตร

นำค่า OD ที่ได้ไปแทนค่าในสูตรหาปริมาณคลอโรฟิลล์ มีหน่วยเป็น มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักสด โดยสูตรที่ใช้คำนวณคือ

Chlorophyll a = [12.7(Absorbance at 663 nm) – 2.69(Absorbance at 645 nm)] × (V / 1000W)

Chlorophyll b = [22.9(Absorbance at 645 nm) – 4.68(Absorbance at 663 nm)] × (V / 1000W)

Total chlorophyll = [20.2(Absorbance at 645 nm) + 8.02(Absorbance at 663 nm)] × (V / 1000W)

กำหนดให้ V = ปริมาตรสุดท้ายของสารละลาย

W = น้ำหนักของตัวอย่างพืชที่นำมาหาคลอโรฟิลล์

1.5 การหาปริมาณแคโรทีนอยด์

วิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์รวมตามวิธีการของ Pawelzik (2005) ซึ่งมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

ชั่งตัวอย่างผักที่สับละเอียดมา 1 กรัม

↓

แช่ตัวอย่างผักใน dimethylsulphoxide (DMSO) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

↓

คนตัวอย่างพืชด้วยความเร็วและแรงนาน 2 นาที

↓

วางไว้ที่อุณหภูมิห้องในสภาวะมืดนาน 16 ชั่วโมง

↓

กรองสารละลายด้วยกระดาษกรอง Whatman No.4

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

↓

วัดค่าการดูดกลืนแสง OD ที่ความยาวคลื่น 665, 649 และ 480 นาโนเมตร

นำค่า OD ที่ได้ไปแทนค่าในสูตรหาปริมาณแคโรทีนอยด์รวม มีหน่วยเป็นไมโครกรัมต่อหนึ่งกรัมน้ำหนักตัวอย่างสด โดยสูตรที่ใช้คำนวณคือ

Chlorophyll a = [(12.19 × Absorbance at 665) – (3.45 × Absorbance at 649)] µg/gFW

Chlorophyll b = [(21.99 × Absorbance at 649) – (5.32 × Absorbance at 665)] µg/gFW

Total chlorophyll = Chlorophyll a + b

$$\text{Total carotenoid} = \frac{[(1000 \times \text{Absorbance at } 480) - (2.14 \times \text{Chlorophyll a}) - (70.16 \times \text{Chlorophyll b})]}{220}$$

1.6 การหากิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระ

หากิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระตามกระบวนการดัดแปลงมาจาก Manthey (2004) ซึ่งมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

นำสารสกัดผักที่เตรียมไว้ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาดเล็ก

↓

เติม DPPH solution ลงไป 2000 ไมโครลิตร

↓

นำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้องภายใต้สภาวะมืดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้ปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์

↓

วัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร

(ใช้สารละลายที่ปราศจากสารสกัดจากผักเป็นค่ามาตรฐาน (Blank))

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นำค่า OD ที่ได้มาคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหากิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระ โดยเทียบเป็นหน่วยไมโครกรัมเทียบกับกรดแกลลิกต่อน้ำหนักตัวอย่างสด 1 กรัม (Microgram Gallic Acid Equivalent/g Fresh Weight)

1.7 ลักษณะปรากฏและอายุการวางจำหน่าย

นำผักทั้ง 25 ชนิด เก็บรักษาในสภาพจำลองชั้นวางจำหน่าย (อุณหภูมิเท่ากับ 10 ± 2 องศา-เซลเซียส) (ภาพภาคผนวก 1) บันทึกผลโดยใช้ผู้ประเมิน 10 คน ให้คะแนนลักษณะปรากฏตามเกณฑ์และระดับคะแนน ดังนี้

เงื่อนไขที่ 1 สีของผัก ประเมินจากสี และการเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลของใบ (ในกรณีผักบริโภคใบ) ประเมินจากสีผิวของผล (กรณีผักบริโภคส่วนผล) และประเมินสีของราก (กรณีของผักบริโภคส่วนราก)

เงื่อนไขที่ 2 ความสดของผัก ประเมินการเหี่ยวของใบ ผิวของผลเหี่ยว และผิวของรากเหี่ยว รวมไปถึงการอ่อนนุ่มของเนื้อราก

เงื่อนไขที่ 3 สีบริเวณรอยตัด ประเมินจากการเกิดสีน้ำตาลของรอยตัด

เงื่อนไขที่ 4 การเกิดโรคหรือแผล ประเมินจากการเกิดเชื้อรา และการเน่าเสียของผัก

เงื่อนไขที่ 5 คุณภาพโดยรวม ประเมินจากสภาพของผัก รวมไปถึงการตัดสินใจหรือยอมรับในผักชนิดนั้น ซึ่งเป็นตัวกำหนดอายุการวางจำหน่าย ซึ่งการให้คะแนนลักษณะปรากฏแบ่งตามระดับคะแนน ดังนี้

ระดับคะแนน 1 ผู้ประเมินไม่พอใจในเงื่อนไขนั้นมากที่สุด

ระดับคะแนน 2 ผู้ประเมินไม่พอใจในเงื่อนไขนั้น

ระดับคะแนน 3 ผู้ประเมินพอใจในเงื่อนไขนั้นปานกลาง

ระดับคะแนน 4 ผู้ประเมินพอใจในเงื่อนไขนั้นมาก

ระดับคะแนน 5 ผู้ประเมินพอใจในเงื่อนไขนั้นมากที่สุด

กำหนดให้ผักหมดอายุการวางจำหน่ายเมื่อมีลักษณะปรากฏที่ระดับคะแนนคุณภาพโดยรวมเท่ากับหรือน้อยกว่า 3.0

การทดลองที่ 2 การเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางกายภาพ คุณภาพทางเคมี กิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระ และอายุการเก็บรักษาของผักบางชนิดที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ

จากผลการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติในการทดลองที่ 1 นำผักที่มีกิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดในแต่ละกลุ่มที่รับมาจากศูนย์ผลิตผลโครงการหลวงที่ผ่านกระบวนการคัดเลือกและบรรจุด้วยถุงพลาสติกชนิดพอลิเอทิลีนมาศึกษาต่อ โดยการเก็บรักษาผักตามอุณหภูมิที่กำหนด วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design: CRD โดยมีอุณหภูมิเป็นวิธีการ แบ่งเป็นกรรมวิธีดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กรรมวิธีที่ 1 เก็บรักษาผักที่อุณหภูมิห้อง

กรรมวิธีที่ 2 เก็บรักษาผักที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส

กรรมวิธีที่ 3 เก็บรักษาผักที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส

กรรมวิธีที่ 4 เก็บรักษาผักที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส

บันทึกการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางกายภาพ ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงสีและการสูญเสียน้ำหนักสด คุณภาพทางเคมี ได้แก่ ปริมาณสารประกอบฟีนอล ปริมาณวิตามินซี ปริมาณแอนโท-ไซยานิน ปริมาณคลอโรฟิลล์รวม ปริมาณแคโรทีนอยด์รวม ปริมาณบีตาเลน และกิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระทุกๆ 2 วัน ตามวิธีการวิเคราะห์เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 จนผลิตผลหมดอายุการเก็บรักษา โดยกำหนดให้ผักหมดอายุการเก็บรักษาเมื่อลักษณะปรากฏในเงื่อนไขคุณภาพโดยรวมมีคะแนนเท่ากับหรือน้อยกว่า 3.0 โดยวิธีการหาเปอร์เซ็นต์สูญเสียน้ำหนักสดและการเปลี่ยนแปลงสีมีรายละเอียดดังนี้

2.1 การหาเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักสด

ชั่งน้ำหนักผักโดยใช้เครื่องชั่งแบบทศนิยม 2 ตำแหน่ง BA3100P แล้วนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักจากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนัก} = \frac{\text{น้ำหนักผักก่อนการเก็บรักษา - น้ำหนักผักหลังการเก็บรักษา}}{\text{น้ำหนักผลก่อนการเก็บรักษา}} \times 100$$

2.2 การหาการเปลี่ยนแปลงสี

วัดการเปลี่ยนแปลงสีโดยเครื่องวัดสี ซึ่งวัดสีออกมาเป็นค่า L*, a* และ b* (ภาพ 11) โดยมีรายละเอียดดังนี้ คือ

L* = The Lightness factor (value)

ค่า L* แสดงค่าความสว่าง

- มีค่าความสว่างมากเมื่อมีค่าใกล้ 100
- มีค่าความมืดมากเมื่อมีค่าใกล้ 0

a*, b* = The chromaticity coordinates (hue, chroma)

ค่า a* - มีค่าบวก หมายถึง วัตถุมีสีแดง

- มีค่าลบ หมายถึง วัตถุมีสีเขียว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ค่า b* - มีค่าบวก หมายถึง วัตถุมีสีเหลือง

- มีค่าลบ หมายถึง วัตถุมีสีน้ำเงิน

ทั้ง a* และ b* หากมีค่าเป็นศูนย์ หมายถึง วัตถุมีสีเทา

ค่า chroma - มีค่าเข้าใกล้ 0 หมายถึง วัตถุมีสีซีดจาง (เทา)

- มีค่าเข้าใกล้ 60 หมายถึง วัตถุมีสีเข้ม

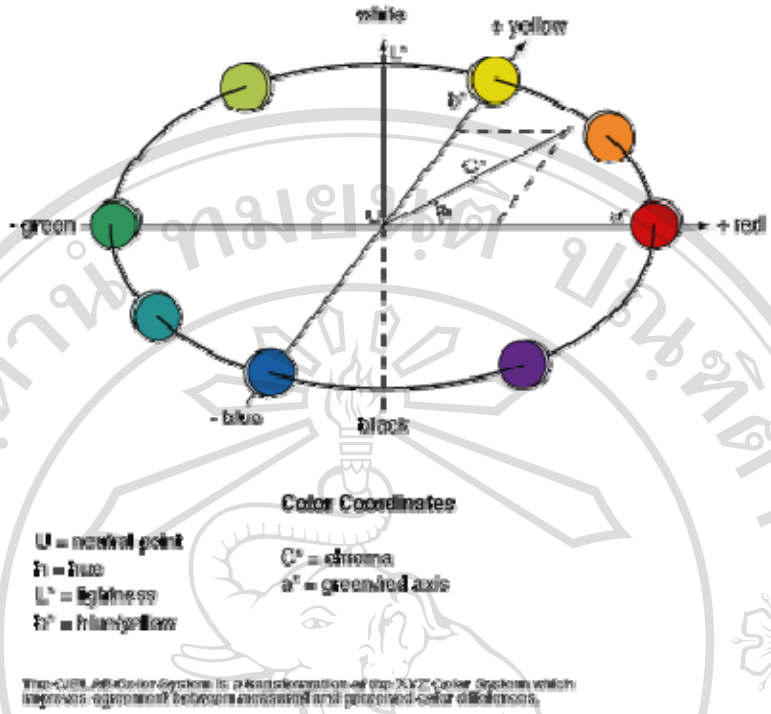
คำนวณหาค่า chroma ซึ่งเป็นค่าที่แสดงให้เห็นถึงความอิ่มตัวของสี (McGuire, 1992) (ภาพ 12)

ค่า hue angle (h^o) เป็นค่าที่แสดงถึงมุมในการตกกระทบของค่า a* ซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง 0-360 องศา (McGuire, 1992)

ค่า h^o เป็นค่าที่แสดงช่วงสีของวัตถุ คือ

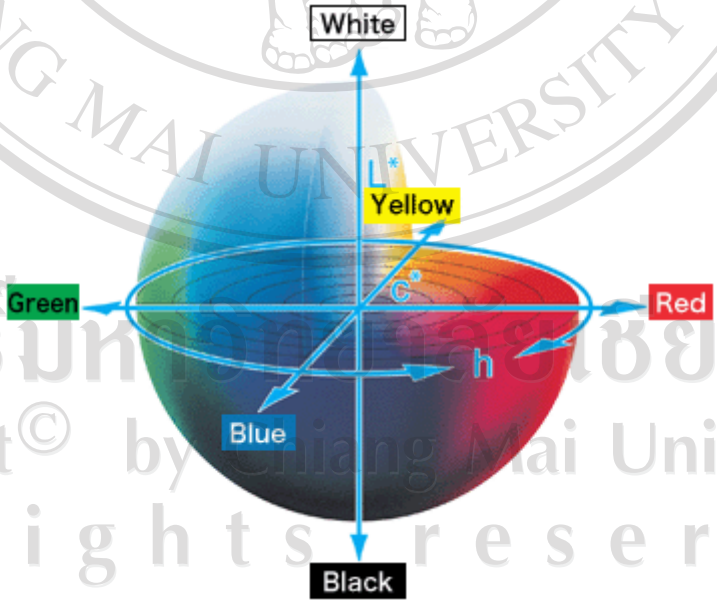
0-45	องศา	แสดงสีม่วงแดงถึงสีส้มแดง
45-90	องศา	แสดงสีส้มแดงถึงสีเหลือง
90-135	องศา	แสดงสีเหลืองถึงเหลืองเขียว
135-180	องศา	แสดงสีเหลืองเขียวถึงสีเขียว
180-225	องศา	แสดงสีเขียวถึงสีน้ำเงิน
225-270	องศา	แสดงสีน้ำเงินเขียวถึงสีน้ำเงิน
270-315	องศา	แสดงสีน้ำเงินถึงม่วง
315-360	องศา	แสดงสีม่วงถึงม่วงแดง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 11 แผนภาพของสีที่อ่านเป็นค่า L*, a* และ b*

ที่มา: © Konica Minolta Holdings, Inc. 2007-2009



ภาพ 12 ค่าความอิ่มตัว (chroma) และความสว่าง (Lightness) ของสี

ที่มา: © Konica Minolta Holdings, Inc. 2007-2009

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 3 ผลของการลดอุณหภูมิแบบ Vacuum cooling และการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางกายภาพ คุณภาพทางเคมี กิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระ และอายุการเก็บรักษาของผักบางชนิด

จากผลการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติในการทดลองที่ 1 นำผักที่มีกิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดในแต่ละกลุ่มที่รับมาจากศูนย์ผลิตผลโครงการหลวงที่ผ่านการคัดเลือกและบรรจุด้วยถุงพลาสติกชนิดพอลิเอทิลีนมาศึกษาต่อ โดยทำการลดอุณหภูมิผักแบบ Vacuum cooling ภายในศูนย์ผลิตผลโครงการหลวงจนให้ผลิตผลมีอุณหภูมิภายในเท่ากับ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design: CRD แบ่งเป็นกรรมวิธีดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 Non-vacuum cooling และเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง
กรรมวิธีที่ 2 Vacuum cooling และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
กรรมวิธีที่ 3 Non-vacuum cooling และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

โดยบันทึกผลการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ คุณภาพทางเคมีเช่นเดียวกับการทดลองที่ 2 ระหว่างการเก็บรักษาจนผลิตผลหมดอายุการเก็บรักษา

การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ

นำข้อมูลผลการทดลองที่ได้มาทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยหาค่าเฉลี่ย ค่าแสดงความผิดพลาด; Mean±S.E. และค่า least significant difference ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved