บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. วัสดุพันธุ์พืช

ผักปวยเหล็งพันธุ์ Dash (*Spinacia oleracea* cv. Dash) ซึ่งเก็บเกี่ยวในระยะความแก่ทางการค้าจากศูนย์พัฒนาโครงการหลวงแม่ปูนหลวง อ. พร้าว จ. เชียงใหม่ บรรจุในตะกร้าพลาสติกแล้วขนส่งมายังศูนย์ผลิตผลโครงการหลวง ต.แม่เหียะ จ.เชียงใหม่ นำส่งมายังห้องปฏิบัติการหลังการเก็บเกี่ยว ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ใช้ผักทั้งต้นสำหรับการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีโดยตัดเฉพาะส่วนของรากทิ้งไป ทำการทดลองทันทีหลังจากขนส่งผลิตผลมาถึงห้องปฏิบัติการ

2. อุปกรณ์

2.1 เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (digital refractometer) รุ่น PR-101 ของบริษัท ATAGO ประเทศญี่ปุ่น อ่านค่าได้ตั้งแต่ 0-45 เปอร์เซ็นต์

2.2 เครื่องชั่งแบบละเอียดแบบทศนิยม 2 ตำแหน่ง รุ่น BA3100P ของบริษัท Satorius *Basic* ประเทศเยอรมัน ชั่งน้ำหนักได้สูงสุด 600 กรัม และแบบทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น HR-200 ของบริษัท AND ประเทศญี่ปุ่น ชั่งน้ำหนักได้สูงสุด 210 กรัม

2.3 เครื่องปั่นเมล็ดกาแฟ (coffee blender) รุ่น CG-100 ของบริษัท KENWOOD ประเทศอังกฤษ

2.4 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (digital spectrophotometer) รุ่น Spectro 23 ของบริษัท LaboMed ประเทศสหรัฐอเมริกา และเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (thermo spectronic) รุ่น GENESYS 10 UV scanning ของบริษัท CE ประเทศสหรัฐอเมริกา

2.5 เครื่องกวนสารเคมีด้วยแท่งแม่เหล็กและให้ความร้อน รุ่น SP-18420-26 ของบริษัท Nuova II ประเทศสหรัฐอเมริกา

2.6 Micropipette ของบริษัท Rainin Instruments ประเทศสหรัฐอเมริกา

2.7 กระดาษกรอง Whatman No.1 และ No.4 ของบริษัท Whatman International ประเทศอังกฤษ

2.8 Water bath รุ่น WB 10 ของบริษัท Memmert ประเทศเยอรมัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2.9 เครื่องวัดสี (Chroma meter) ตัวเครื่องรุ่น CR-300 ของบริษัท Minolta ประเทศญี่ปุ่น หัววัด CR-310 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร ซึ่งวัดสีออกมาเป็นค่า L*, chroma, hue angle (h°) โดยมีรายละเอียดดังนี้ คือ (ภาพ 5)

L* = The lightness factor (value)

ค่า L* แสดงค่าความสว่าง

- มีค่าความสว่างมากเมื่อมีค่าใกล้ 100
- มีค่าความมืดมากเมื่อมีค่าใกล้ 0

ค่า chroma เป็นค่าที่แสดงให้เห็นถึงความอิ่มตัวของสี (McGuire, 1992)

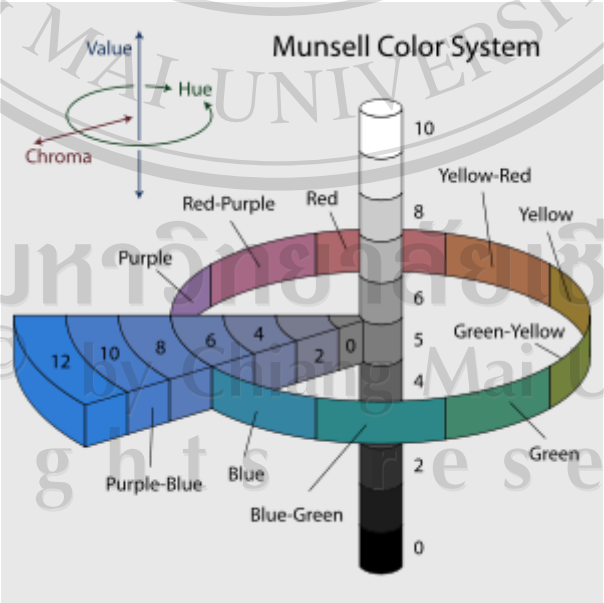
– มีค่าเข้าใกล้ 0 หมายถึง วัตถุมีสีซีดจาง (เทา)

– มีค่าเข้าใกล้ 60 หมายถึง วัตถุมีสีเข้ม

ค่า Hue angle (h°) เป็นค่าที่แสดงถึงมุมในการตกกระทบของค่า a* ซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง 0 -360 องศา (McGuire, 1992)

ค่า h° เป็นค่าที่แสดงช่วงสีของวัตถุ คือ

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



ภาพ 5 แผนภาพของสีที่อ่านค่าเป็นค่า L*, chroma, hue angle

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.10 เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วรอบสูง Hettich zentrifugen model 32 R ประเทศเยอรมัน

2.11 เครื่องลดอุณหภูมิระบบสุญญากาศ (Hydro-vacuum cooling) บริษัท Hussmann ประเทศจีน

2.12 เครื่องวัดความชื้น (Data logger) รุ่น A-38010-16 บริษัท Cole Parmer ประเทศสหรัฐอเมริกา

2.13 เครื่องวัดอุณหภูมิภายในผักและผลไม้ รุ่น PDT 550 Digital Thermometer บริษัท Tequipment.NET ประเทศสหรัฐอเมริกา

2.14 ตู้เย็นอุณหภูมิ 0, 4 และ 8 องศาเซลเซียส รุ่น LC 203LD ของบริษัท ฟรีเซอร์ (ไทยแลนด์) ประเทศไทย

2.15 เครื่องเขย่า รุ่น Vortex-Genie 2 ของบริษัท Scientific Industries Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา

2.16 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH-meter) รุ่น CG842 ของบริษัท SCHOTT GLAS Mainz ประเทศเยอรมัน

2.17 เครื่องเขย่าสาร

2.18 กล้องถ่ายรูปรุ่น Cyber-shot 2.1 ของบริษัท SONY ประเทศญี่ปุ่น

2.19 นาฬิกาจับเวลาของบริษัท CASIO

2.20 เครื่องวัดความชื้น

2.21 ลูกยางดูดอากาศ

2.22 กล่องครอบปฏิกิริยาในที่มืด

2.23 ชั้นวางหลอดทดลอง

2.24 nylon syringe filter

2.25 ถังอะลูมิเนียม

2.26 มีดปอกผลไม้

2.27 เขียงพลาสติก

2.28 ผ้าขาวบาง

2.29 เครื่องแก้ว

- บีกเกอร์ (beaker)
- ขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask)
- ขวดปรับปริมาตร (volumetric flask)
- กระบอกตวง (cylinder)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- บิวเรต (burette)
- ปิเปต (pipette)
- หลอดหยด (dropper)
- แท่งแก้วคนสารละลาย (stirrer)
- โกร่งบด
- กรวยกรอง
- ช้อนตักสารเคมี
- หลอดทดลอง

สารเคมีและวิธีการเตรียมสารเคมี

3.1 สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณวิตามินซี

- กรดออกซาลิก (oxalic acid, UNIVAR) ความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยชั่งกรดออกซาลิก 4.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

- 2, 6 - ไดคลอโรฟีนอล อินโดฟีนอล (2, 6-dichlorophenol indophenol, SIGMA) ความเข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยชั่ง 2, 6-ไดคลอโรฟีนอล อินโดฟีนอล 0.4 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร แล้วนำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิต่ำ

- กรดแอสคอร์บิกมาตรฐาน (ascorbic acid, Merck) ชั่งกรดแอสคอร์บิก 0.05 กรัม ละลายในกรดออกซาลิกเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ แล้วปรับปริมาตรด้วยกรดออกซาลิกให้ครบ 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปไทเทรตด้วย 2, 6- ไดคลอโรฟีนอล อินโดฟีนอล จนถึงจุดยุติ จดบันทึกปริมาตร 2, 6- ไดคลอโรฟีนอล อินโดฟีนอลที่ใช้ไป เพื่อเป็นมาตรฐานในการคำนวณหาปริมาณวิตามินซี

3.2 สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์

- ไดเมธิลซัลฟอกไซด์ (dimethylsulphoxide: DMSO, LAB-SCAN)

3.3 สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์

- อะซิโตน (acetone, Merck) ความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยตวงอะซิโตนความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ 800 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

3.4 สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์กิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระ

- สารละลาย DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, Fluka) เตรียมโดยชั่ง 2, 2 - diphenyl -1-picrylhydrazyl 74 มิลลิกรัม ละลายในเอทานอลเข้มข้น 99.9 เปอร์เซ็นต์ (absolute

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ethanol) แล้วปรับปริมาตรด้วยเอทานอลเข้มข้น 99.9 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

3.5 สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอล

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

- Folin-Ciocalteau's phenol reagent, Merck.

3.6 สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์คลอโรฟิลเลส

3.6.1 สารละลายฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 7.0 และ 7.5

- สารละลายไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (*di*-potassium hydrogen phosphate, Merck) เตรียมโดยชั่งไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 3.4023 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 500 มิลลิลิตร

- สารละลายโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (potassium dihydrogen phosphate, Merck) ชั่งโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 4.354 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 500 มิลลิลิตร

เติมสารละลายโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (กรด) ลงในสารละลายไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (ด่าง) จนได้ค่า pH 7.0 และ 7.5 เก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำ

3.6.2 สารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ (potassium chloride, Univar) ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ เตรียมโดยชั่งโพแทสเซียมคลอไรด์ 1.8638 กรัม ละลายในสารละลายฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 7.0 แล้วปรับปริมาตรด้วยสารละลายฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 7.0 ให้ครบ 500 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำ

3.6.3 สารละลาย Triton X-100 ความเข้มข้น 0.24 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยใช้สารละลาย Triton X-100 ปริมาตร 1.2 มิลลิลิตร เติมลงในสารละลายฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 7.0 แล้วปรับปริมาตรด้วยสารละลายฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 7.0 ให้ครบ 500 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำ

3.6.4 สารละลาย Triton X-100 ความเข้มข้น 1.44 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยใช้สารละลาย Triton X-100 ปริมาตร 0.72 มิลลิลิตร เติมลงในสารละลายฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 7.5 แล้วปรับปริมาตรด้วยสารละลายฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 7.5 ให้ครบ 50 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.6.5 อะซิโตน (acetone, Merck) ความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยตวงอะซิโตนความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ 800 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

3.6.6 คลอโรฟิลล์ เอ (chlorophyll a from spinach, Fluka)

3.6.7 เฮกเซน (hexane, Unilab)

3.7 สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

3.7.1 Albumin from bovin serum, Fluka.

3.7.2 Coomassie brilliant blue R 250, Fluka.

3.7.3 เอทานอล (absolute ethanol, Merck) ความเข้มข้น 99.9 เปอร์เซ็นต์

3.7.4 กรดฟอสฟอริก (phosphoric acid, Merck) ความเข้มข้น 85 เปอร์เซ็นต์

สถานที่ทำการวิจัย

1. ห้องปฏิบัติการวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวพืชสวน ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2. ห้องปฏิบัติการภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
3. ศูนย์ผลิตผลโครงการหลวง ตำบลแม่เหียะ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่

วิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1 คุณภาพทางกายภาพและทางเคมีระหว่างการเก็บรักษาปวยเหล็งที่อุณหภูมิต่าง ๆ

วางแผนการทดลอง แบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD) มี 4 กรรมวิธี คือ

กรรมวิธีที่ 1 เก็บรักษาปวยเหล็งที่อุณหภูมิห้อง

กรรมวิธีที่ 2 เก็บรักษาปวยเหล็งที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส

กรรมวิธีที่ 3 เก็บรักษาปวยเหล็งที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

กรรมวิธีที่ 4 เก็บรักษาปวยเหล็งที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส

แต่ละกรรมวิธีมี 3 ซ้ำ ซ้ำละ 1 หน่วย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีการทดลอง

นำปวยเหล็งจากศูนย์พัฒนาโครงการหลวงแม่ปูนหลวง อ. พร้าว จ. เชียงใหม่ ซึ่งเก็บเกี่ยวในระยะความแก่ทางการค้า มาคัดคุณภาพให้มีความสม่ำเสมอ ตัดแต่งเอาใบที่ถูกทำลายด้วยโรคหรือแมลงหรือช้ำออก บรรจุปวยเหล็งน้ำหนัก 200 กรัม ในถุงพลาสติกชนิดพอลิเอทิลีนขนาดกว้าง 25.40 เซนติเมตร ยาว 40.64 เซนติเมตร เจาะรู จำนวน 18 รู เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง (28±2 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิ 0, 4 และ 8 องศาเซลเซียส ทำการวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพและทางเคมีทุกๆ วัน จนหมดอายุการเก็บรักษา

การบันทึกผลการทดลอง

การประเมินคุณภาพทางกายภาพ

1. **ลักษณะปรากฏ** บันทึกโดยการให้คะแนนลักษณะปรากฏตามระดับคะแนน ดังนี้

ระดับคะแนน 1 ใบมีความสดอยู่ระหว่าง 0 – 20 เปอร์เซ็นต์
(ใบเหี่ยวมาก มีสีเหลือง มีรอยช้ำ และเน่า)

ระดับคะแนน 2 ใบมีความสดอยู่ระหว่าง 21 – 40 เปอร์เซ็นต์
(ใบเหี่ยวมากและมีสีเหลือง)

ระดับคะแนน 3 ใบมีความสดอยู่ระหว่าง 41 – 60 เปอร์เซ็นต์
(ใบเหี่ยวและมีสีเหลือง * หมดอายุในการเก็บรักษา)

ระดับคะแนน 4 ใบมีความสดอยู่ระหว่าง 61 – 80 เปอร์เซ็นต์
(ใบเริ่มเหี่ยว และเริ่มมีสีเหลืองเล็กน้อย)

ระดับคะแนน 5 ใบมีความสด 81 – 100 เปอร์เซ็นต์ (ใบมีสีเขียวสด)

2. **เปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนัก**

วัดโดยใช้เครื่องชั่งละเอียดแบบทศนิยม 2 ตำแหน่ง BA3100P นำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนัก จากสูตร

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

3. **สีใบ**

วัดโดยใช้เครื่อง Chroma meter รุ่น CR300 หัววัด CR-310 ของบริษัท Minolta และใช้แหล่งกำเนิดแสง D65 โดยการวัดที่ตำแหน่งกลางใบ ค่าที่ได้แสดงเป็นค่า L*, chroma และ hue angle

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การประเมินคุณภาพทางเคมี

1. ปริมาณวิตามินซี

วิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซีในผักปวยเหล็งด้วยวิธี Indophenol โดยนำตัวอย่างผักที่ปั่นละเอียด 10 กรัม เติมกรดออกซาลิกเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 จากนั้นดูดสารละลายที่กรองได้ 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปไทเทรตกับ 2,6-ไดคลอโรฟีนอล อินโดฟีนอล ความเข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์ จนถึงจุดยุติ ซึ่งสารละลายมีสีชมพูประมาณ 15 วินาที คำนวณหาปริมาณวิตามินซีโดยใช้ปริมาณ2,6-ไดคลอโรฟีนอล อินโดฟีนอล ที่ใช้กับสารตัวอย่าง เทียบกับ 2,6-ไดคลอโรฟีนอล อินโดฟีนอลที่ใช้กับวิตามินซีมาตรฐาน โดยคำนวณตามสูตร (Ranganna, 1997)

ปริมาตร indophenol dye a มิลลิลิตร มี ascorbic acid เท่ากับ 1 มิลลิกรัม (จาก standard)
ปริมาตร 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

2. ปริมาณคลอโรฟิลล์ ตามวิธีการของ Whitham *et al*. (1971)

ชั่งตัวอย่างปวยเหล็งที่ปั่นละเอียด 1 กรัม เติมสารละลายอะซิโตนความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ 10 มิลลิลิตร วางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 ปรับปริมาตรด้วยสารละลายอะซิโตนความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 25 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density, OD) ที่ความยาวคลื่น 645 และ 633 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer โดยใช้สารละลายอะซิโตนความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ เป็น blank บันทึกค่าที่ได้แล้วนำไปคำนวณปริมาณคลอโรฟิลล์ มีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักสด

$$\text{ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ} = [12.7\ (OD_{663} - 2.69\ (OD_{645})] \times \frac{V}{1{,}000 \times W}$$

$$\text{ปริมาณคลอโรฟิลล์ บี} = [22.9\ (OD_{645} - 4.68\ (OD_{663})] \times \frac{V}{1{,}000 \times W}$$

$$\text{ปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด} = [20.2\ (OD_{645} + 8.02\ (OD_{663})] \times \frac{V}{1{,}000 \times W}$$

โดยที่ V คือ ปริมาตรสุดท้ายของสารละลายที่นำมาหาปริมาณคลอโรฟิลล์
W คือ น้ำหนักของปวยเหล็งที่นำมาสกัดคลอโรฟิลล์
OD คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้จากเครื่อง Spectrophotometer ตามความยาวคลื่นที่กำหนด

3. ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ (total soluble solids ; TSS)

โดยใช้เครื่องวัดปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ (digital refractometer) รุ่น PR-101 ของบริษัท ATAGO อ่านค่าได้ตั้งแต่ 0-45 เปอร์เซ็นต์ โดยอ่านค่าจากน้ำของผักปวยเหล็งที่ปั่นรวมกัน

4. ปริมาณแคโรทีนอยด์ ตามวิธีการของ Pawelzik (2006)

ชั่งตัวอย่างปวยเหล็งที่สับละเอียด 1 กรัม เติมสารละลาย dimethylsulphoxide (DMSO) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร คนตัวอย่างให้เข้ากับสารละลายด้วยความเร็วและแรงนาน 2 นาที จากนั้นวางไว้ที่อุณหภูมิห้องในสภาวะมืดนาน 16 ชั่วโมง จากนั้นกรองสารละลายด้วยกระดาษกรอง Whatman No.4 นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density, OD) ที่ความยาวคลื่น 665, 649 และ 480 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer โดยใช้สารละลาย DMSO เป็น blank บันทึกค่าที่ได้แล้วนำไปคำนวณปริมาณแคโรทีนอยด์ มีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด

$$\text{ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ} = [(12.19 \times OD_{665}) - (3.45 \times OD_{649})]$$

$$\text{ปริมาณคลอโรฟิลล์ บี} = [(21.99 \times OD_{649}) - (5.32 \times OD_{665})]$$

ปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด = ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ + ปริมาณคลอโรฟิลล์ บี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ปริมาณแคโรทีนอยด์

$$= \frac{[(1000 \times OD_{480}) - (2.14 \times \text{ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ}) - (70.16 \times \text{ปริมาณคลอโรฟิลล์ บี})]}{220}$$

5. หลักเกณฑ์การวิเคราะห์อายุการเก็บรักษาของปวยเหล็ง

กำหนดให้ปวยเหล็งหมดอายุการเก็บรักษา เมื่อมีลักษณะปรากฏที่ระดับคะแนนเท่ากับหรือน้อยกว่า 3 คะแนน ซึ่งปวยเหล็งมีความสดอยู่ระหว่าง 41–60 เปอร์เซ็นต์ (ใบเหี่ยวและมีสีเหลือง)

การทดลองที่ 2 การศึกษาสภาวะการทำงานที่เหมาะสมของการลดอุณหภูมิปวยเหล็งด้วยระบบสุญญากาศ โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลองย่อย ดังนี้

การทดลองที่ 2.1 การลดอุณหภูมิปวยเหล็งด้วยระบบสุญญากาศ (vacuum cooling)

นำปวยเหล็งที่ผ่านการตัดแต่งบรรจุลงในถุงพลาสติกชนิดพอลิเอทิลีนขนาดกว้าง 25.40 เซนติเมตร ยาว 40.64 เซนติเมตร ที่เจาะรู 18 รู แล้วนำไปจัดเรียงลงในตะกร้าพลาสติกชนิดพอลิโพรพิลีน ขนาดกว้าง 35.56 เซนติเมตร ยาว 55.88 เซนติเมตร สูง 29.21 เซนติเมตร โดยมีปริมาณในการบรรจุ 5 กิโลกรัมต่อ 1 ตะกร้า จากนั้นนำตะกร้าไปจัดเรียงในเครื่องลดอุณหภูมิแบบสุญญากาศเพื่อลดอุณหภูมิปวยเหล็งจนถึงอุณหภูมิที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 1 ทำการปรับเปลี่ยนค่าพารามิเตอร์สำหรับการทำงานของเครื่องลดอุณหภูมิแบบสุญญากาศ ได้แก่ ค่าความดันสุดท้ายภายในห้องลดอุณหภูมิ และเวลาที่วางผักไว้ในห้องลดอุณหภูมิจนกว่าจะได้พารามิเตอร์ที่ทำให้ปวยเหล็งมีอุณหภูมิสุดท้ายตามที่กำหนดและใช้เวลาในการลดอุณหภูมิน้อยที่สุด

การทดลองที่ 2.2 การลดอุณหภูมิปวยเหล็งด้วยระบบสุญญากาศร่วมกับน้ำ (hydro-vacuum cooling)

นำปวยเหล็งที่ผ่านการตัดแต่งบรรจุลงในตะกร้าพลาสติกชนิดพอลิโพรพิลีน ขนาดกว้าง 35.56 เซนติเมตร ยาว 55.88 เซนติเมตร สูง 29.21 เซนติเมตร โดยมีปริมาณในการบรรจุ 5 กิโลกรัมต่อ 1 ตะกร้า จากนั้นนำตะกร้าไปจัดเรียงในเครื่องลดอุณหภูมิแบบสุญญากาศเพื่อลดอุณหภูมิปวยเหล็งจนถึงอุณหภูมิที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 1 ทำการปรับเปลี่ยนค่าพารามิเตอร์สำหรับการทำงานของเครื่องลดอุณหภูมิแบบสุญญากาศ ได้แก่ ค่าความดันสุดท้ายภายในห้องลดอุณหภูมิ เวลาที่วางผักไว้ในห้องลดอุณหภูมิ และเวลาที่ใช้ในการพ่นน้ำ จนกว่าจะได้พารามิเตอร์ที่ทำให้ปวยเหล็งมีอุณหภูมิสุดท้ายตามที่กำหนดและใช้เวลาในการลดอุณหภูมิน้อยที่สุด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บันทึกผลการทดลอง

1. การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิระหว่างกระบวนการทุก 1 นาทีจนสิ้นสุดกระบวนการ
2. ความสัมพันธ์ระหว่างความดัน อุณหภูมิและเวลา
3. ความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศในห้องลดอุณหภูมิจนสิ้นสุดกระบวนการ
4. พลังงานไฟฟ้าที่ใช้ในกระบวนการลดอุณหภูมิ

การทดลองที่ 3 ผลของการลดอุณหภูมิด้วยระบบสุญญากาศต่อคุณภาพทางกายภาพและทางเคมีของปวยเหล็งระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ

จากผลการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติในการทดลองที่ 1 และ 2 นำปวยเหล็งมาผ่านการลดอุณหภูมิโดยระบบสุญญากาศและสุญญากาศร่วมกับน้ำโดยใช้พารามิเตอร์ที่เหมาะสมสำหรับการลดอุณหภูมิของปวยเหล็งจากการทดลองที่ 2 และนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิที่ให้ผลดีที่สุดจากการทดลองที่ 1 โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design: CRD มี 3 กรรมวิธี คือ

กรรมวิธีที่ 1 ปวยเหล็งที่ไม่ผ่านการลดอุณหภูมิ (control)

กรรมวิธีที่ 2 ปวยเหล็งที่ผ่านการลดอุณหภูมิด้วยระบบสุญญากาศ (vacuum cooling)

กรรมวิธีที่ 3 ปวยเหล็งที่ผ่านการลดอุณหภูมิด้วยระบบแบบสุญญากาศร่วมกับน้ำ (hydro - vacuum cooling)

แต่ละกรรมวิธีมี 3 ซ้ำ ซ้ำละ 1 หน่วย บันทึกการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางกายภาพและทางเคมีทั้งหมดทุกวันจนผลิตผลหมดอายุการเก็บรักษา ซึ่งอายุการเก็บรักษาถูกกำหนดโดยลักษณะปรากฏของคุณภาพโดยรวม โดยกำหนดให้ผักหมดอายุการเก็บรักษา เมื่อมีลักษณะปรากฏของคุณภาพโดยรวมที่ระดับคะแนนต่ำกว่า 3 คะแนน ซึ่งบ่งบอกว่าผู้ประเมินเริ่มไม่พอใจในผลิตผลนั้นๆ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6. กิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระ ตามวิธีการดัดแปลงจาก Manthey (2004)

หั่นผักปวยเหล็งให้ละเอียด แล้วเติมไนโตรเจนเหลวลงไปจนผักแข็งตัว นำไปปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นเมล็ดกาแฟ จากนั้นชั่งตัวอย่างปวยเหล็งที่ปั่นละเอียดมา 20 กรัม เติมสารละลายเมทานอล ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตรลงไป แล้วนำสารละลายไปเขย่าในสภาพมืดที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง จากนั้นกรองสารละลายด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 ดูดสารละลายปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยสารละลายเมทานอล ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 25 มิลลิลิตร กรองสารละลายอีกครั้งด้วย 0.45 μm syringe

nylon filter นำสารละลายที่กรองได้ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาดเล็ก แล้วเติม DPPH solution ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำสารละลายที่ได้ไปเขย่าเพื่อให้สารทำปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์ในสภาพมืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายที่ปราศจากสารสกัดจากผักเป็น blank

นำค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ได้มาคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหากิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระโดยเทียบเป็นหน่วยไมโครกรัมเทียบกับกรดแกลลิกต่อน้ำหนักตัวอย่างสด 1 กรัม (Microgram Gallic Acid Equivalent/g Fresh Weight)

7. ปริมาณสารประกอบฟีนอล ตามวิธีการดัดแปลงจาก Sellappan *et al*.(2002)

นำสารสกัดที่ผ่านการกรองด้วย syringe nylon filter 0.45 μm ปริมาตร 50 ไมโครลิตรใส่ลงในหลอดทดลองขนาดเล็ก เติมสารละลายเมทานอล ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร น้ำกลั่น ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร โซเดียมคาร์บอเนต 7.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 375 ไมโครลิตร จากนั้นวางทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที แล้วเติม Folin-Ciocalteau solution ปริมาตร 125 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร นำไปเขย่าในสภาพมืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง และนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายที่ปราศจากสารสกัดจากผักเป็น blank

นำค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ได้มาคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาปริมาณสารประกอบฟีนอล โดยเทียบเป็นหน่วยไมโครกรัมเทียบกับกรดแกลลิกต่อน้ำหนักตัวอย่างสด 1 กรัม (Microgram Gallic Acid Equivalent/g Fresh Weight)

8. ลักษณะปรากฏ บันทึกโดยการให้คะแนนลักษณะปรากฏตามระดับคะแนน ดังนี้

ระดับคะแนน 1 ผู้ประเมินไม่พอใจในปัจจัยนั้นมากที่สุด
ระดับคะแนน 2 ผู้ประเมินไม่พอใจในปัจจัยนั้น
ระดับคะแนน 3 ผู้ประเมินพอใจในปัจจัยนั้นในระดับปานกลาง
ระดับคะแนน 4 ผู้ประเมินพอใจในปัจจัยนั้นมาก
ระดับคะแนน 5 ผู้ประเมินพอใจในปัจจัยนั้นมากที่สุด

บันทึกผลโดยใช้ผู้ประเมินที่ผ่านการฝึกฝนแล้วจำนวน 10 คน ให้คะแนนลักษณะปรากฏตามระดับคะแนน โดยพิจารณาจากลักษณะต่างๆ ดังต่อไปนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ลักษณะที่ 1 สีของผัก ประเมินจากสี และการเปลี่ยนเป็นสีเหลืองของใบ

ลักษณะที่ 2 ความกรอบของผัก ประเมินโดยดูจากความเหี่ยวของใบ

ลักษณะที่ 3 การเกิดโรคหรือแผล ประเมินจากการเกิดเชื้อรา และการเน่าเสียของผัก

ลักษณะที่ 4 คุณภาพโดยรวม ประเมินจากสภาพโดยรวมของผัก รวมไปถึงการตัดสินใจหรือยอมรับในผักนั้นๆ ซึ่งเป็นตัวกำหนดอายุการวางจำหน่าย โดยกำหนดให้ผักหมดอายุการวางจำหน่ายเมื่อมีลักษณะปรากฏของคุณภาพโดยรวมที่ระดับคะแนนน้อยกว่า 3 คะแนน ซึ่งบ่งบอกว่าผู้ประเมินเริ่มไม่พอใจในผลิตผลนั้นๆ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์คลอโรฟิลเลส

วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์คลอโรฟิลเลสโดยดัดแปลงจากวิธีของ Amir-Shapira *et al.* (1987)

1. **การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์คลอโรฟิลเลส มีวิธีการดังต่อไปนี้**

สกัด acetone powder 0.5 กรัม ด้วย 10 มิลลิโมลาร์ Phosphate buffer pH 7.0 ปริมาตร 15 มิลลิลิตร
(ประกอบด้วย KCl ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ และ 0.24% Triton X-100)

↓

คนให้เข้ากันและวางไว้ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียสนาน 16 ชั่วโมง

↓

นำไปตกตะกอนที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที

↓

ส่วนใสที่ได้ คือ crude enzyme

↓

ผสม crude enzyme 250 ไมโครลิตร กับ

- 1.44% Triton X-100 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร
- Chlorophyll a acetone solution ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร
- 0.1 โมลาร์ Phosphate buffer pH 7.5 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร

↓

นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 40 นาที

↓

หยุดปฏิกิริยาด้วย acetone ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และเฮกเซน ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

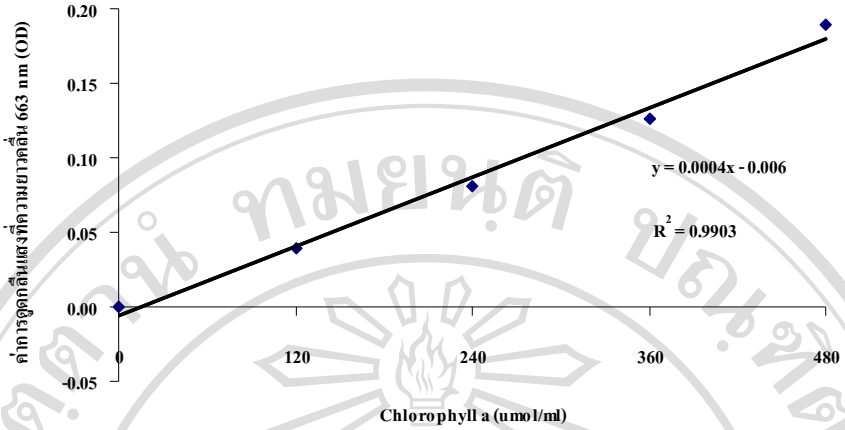
↓

วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 663 นาโนเมตร

↓

คำนวณกิจกรรมของเอนไซม์โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ภาพ 6) มีหน่วยเป็น มิลลิกรัมโปรตีน โดยกำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์เท่ากับ 0.1 Absorbance $_{663}$ ที่เปลี่ยนไป/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 6 กราฟมาตรฐานของปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ

2. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยใช้วิธี Bradford Protein Assay (Bradford, 1976) ดังต่อไปนี้

ดูด crude enzyme มา 250 ไมโครลิตร

แล้วเติม 0.1 โมลาร์ Phosphate buffer pH 7.5 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร

↓

สารละลายที่ได้ คือ crude enzyme solution

↓

ดูด crude enzyme solution มา 300 ไมโครลิตร

↓

เติมสารละลาย Coomassie brilliant blue ปริมาตร 3,000 มิลลิลิตร

↓

วางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที

↓

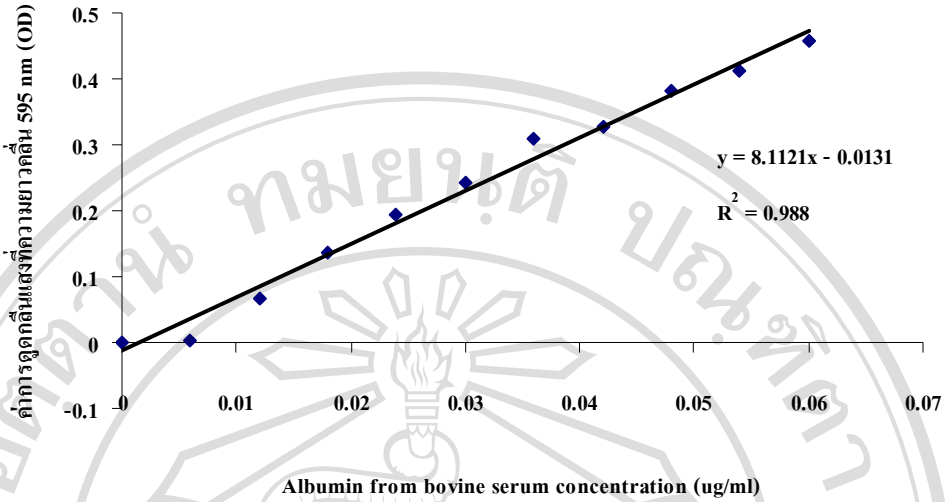
วัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

↓

คำนวณปริมาณโปรตีนที่ได้โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ภาพ 7)

มีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 7 กราฟมาตรฐานของปริมาณโปรตีน (albumin from bovine serum)

การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ

นำข้อมูลผลการทดลองที่ได้มาทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยหาค่าเฉลี่ย ค่าแสดงความผิดพลาด (mean±S.E.) และค่า Least Significant Difference ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved