บทที่ 3
วัตถุดิบ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบ

บัวบก (*Centella asiatica* (Linn.) Urban) ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ได้จากตลาดท้องถิ่น อำเภอเมือง จังหวัดเชียงราย ในเดือน กันยายน พ.ศ. 2549 โดยคัดเลือกบัวบกที่มีความแก่สม่ำเสมอกัน นำลำต้นและใบมาทดลอง

3.2 การเตรียมน้ำบัวบก

3.2.1 การเตรียมน้ำบัวบกไม่ใส่น้ำตาล

นำลำต้นและใบของบัวบกปริมาณ 1,000 กรัม มาล้างให้สะอาด ปั่นแยกกากด้วยเครื่องแยกกาก (Moulinex, model A753, UK) ได้น้ำบัวบกประมาณ 300 มิลลิลิตร จากนั้นแบ่งเป็น 2 ส่วนให้เท่ากัน นำส่วนที่หนึ่ง 150 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำสะอาดที่ผ่านการต้มฆ่าเชื้อแล้ว 500 มิลลิลิตร ได้น้ำบัวบกปริมาตรรวม 650 มิลลิลิตร

3.2.2 การเตรียมน้ำบัวบกความหวาน 14°Brix

นำน้ำบัวบกส่วนที่สองประมาณ 150 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำสะอาดที่ผ่านการต้มฆ่าเชื้อแล้วประมาณ 400 มิลลิลิตร เติมน้ำตาลทรายขาวมิตรผลลงในส่วนผสม (ประมาณ 91 กรัม) ปรับความหวานด้วยเครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (Atago, model N-1E, USA) โดยให้น้ำบัวบกให้มีความหวานสุดท้ายเป็น 14°Brix และปริมาตรรวมเป็น 650 มิลลิลิตร

3.3 การทำบัวบกผงด้วยวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

นำน้ำบัวบก 25 มิลลิลิตร ใส่ในขวดก้นกลมขนาด 500 มิลลิลิตร แช่แข็งตัวอย่าง (pre-freeze) ในอ่างควบคุมความเย็นด้วยแอลกอฮอล์ (Heto, model CBN 18-50, Denmark) ที่อุณหภูมิ -50C° เป็นเวลา 15 นาที โดยใช้ spin freezing เป็นตัวหมุนขวดก้นกลมเพื่อให้ตัวอย่างเรียบบางเท่ากัน แล้วนำไปทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบสุญญากาศ (Heto, model FD8-55, Denmark) (รูปที่ 3.1) โดยทำแห้งที่อุณหภูมิห้อง (25C°) และลดความดันลงประมาณ 4.58 ทอรร์ (610.5 พาสคาล) ซึ่งทำให้ความดันไอน้ำในตัวอย่างลดต่ำลงน้ำที่อยู่ในสภาพน้ำแข็งจะระเหิดกลายเป็นไอ และไอน้ำที่เกิดขึ้นจะถูกดูดออกไปด้วยปั๊มสุญญากาศ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(ก)

(ข)

(ค)

รูปที่ 3.1 การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง
(ก) แช่แข็งที่อุณหภูมิ -50 C° ในอ่างควบคุมความเย็นด้วยแอลกอฮอล์
(ข) และ (ค) ทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบสุญญากาศ

3.4 การหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำแห้งน้ำบัวบกแบบแช่เยือกแข็ง

นำน้ำบัวบกไม่ใส่น้ำตาลและน้ำบัวบกที่มีความหวาน 14°Brix จากข้อ 3.2.1 และ 3.2.2 มาทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ตามวิธีข้อ 3.3 โดยใช้เวลาทำแห้ง 3, 4, 5 และ 6 ชั่วโมง แล้ววัดค่าวอเตอร์แอคทิวิตี (a_w) ด้วยเครื่องวัดค่าวอเตอร์แอคทิวิตี (Novasina, model AWC500, Switzerland) จากนั้นนำตัวอย่างไปตรวจสอบคุณภาพทางกายภาพและเคมี

3.5 การเตรียมน้ำบัวบกคืนรูปจากบัวบกผง

ก่อนที่จะทำการตรวจสอบคุณภาพทางกายภาพและเคมีบัวบกผงที่เตรียมจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งต้องนำมาทำเป็นน้ำบัวบกคืนรูปก่อน สามารถทำได้ดังนี้ นำบัวบกผงจากการทำแห้งของน้ำบัวบกไม่ใส่น้ำตาลจำนวน 1.74 กรัม และบัวบกผงจากการทำแห้งของน้ำบัวบกความ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

หวาน 14°Brix จำนวน 16.83 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวมเป็น 100 มิลลิลิตร สังเกตการละลายของบัวบกผงและสังเกตสีของน้ำบัวบกหลังการละลายโดยเปรียบเทียบกับกับชุดควบคุม (น้ำบัวบกสด) จากนั้นนำไปตรวจสอบค่าสี และคุณภาพทางเคมี

3.6 การตรวจสอบค่าสี

ตรวจสอบค่าสีน้ำบัวบกโดยเครื่องวัดสี (HunterLab, model Color Quest XE, USA) วัดการเปลี่ยนสีด้วยระบบ CIE L*C*H° โดยตั้งค่าการทำงานของเครื่อง ดังนี้

Mode	:	Total transmission
Scale	:	CIELCh
Illuminant	:	D 65
Observer	:	10º
MI Illuminant	:	Fcw

การวัดค่าสีของตัวอย่างน้ำบัวบก เจือจางตัวอย่าง (อัตราส่วน 1:4) โดยปิเปตน้ำบัวบก 4 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวมเป็น 20 มิลลิลิตร จากนั้นใส่ตัวอย่างลงในเซลล์ที่มีความหนา (path length) 1 เซนติเมตร แล้วบันทึกค่าสีในระบบ CIE L*C*H°

ค่า L* คือ Lightness เป็นค่าความสว่าง มีค่าอยู่ในช่วง 0 ถึง 100

L* มีค่าใกล้ศูนย์ หมายถึง ตัวอย่างมีความสว่างน้อยจนเป็นสีคล้ำ

L* เข้าใกล้ 100 หมายถึง ตัวอย่างสว่างมากจนเป็นสีขาว

ค่า C* คือ Chroma เป็นค่าแสดงถึง ความเข้มของสี

C* มีค่าเข้าใกล้ศูนย์ หมายถึง วัตถุมีความเข้มสีต่ำลงจนเป็นสีเทา

C* มีค่าเพิ่มขึ้น หมายถึง วัตถุมีความเข้มสีเพิ่มมากขึ้น

ค่า H° คือ Hue angle เป็นค่าแสดงถึง สีแท้จริงที่ปรากฏให้เห็น ซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง 0-360 องศา Hue angle แต่ละช่วงองศา แสดงสีแตกต่างกันดังนี้ (McGuire, 1992)

0 - 45 องศา	แสดงสีม่วงแดงถึงสีส้มแดง
45 - 90 องศา	แสงสีส้มแดงถึงสีเหลือง
90 - 135 องศา	แสดงสีเหลืองถึงเหลืองเขียว
135 - 180 องศา	แสดงสีเหลืองเขียวถึงเขียว
180 - 225 องศา	แสดงสีเขียวถึงสีน้ำเงิน
225 - 270 องศา	แสดงสีน้ำเงินเขียวถึงน้ำเงิน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

270 - 315 องศา แสดงสีน้ำเงินถึงม่วง

315 - 360 องศา แสดงสีม่วงถึงม่วงแดง

3.7 การตรวจสอบคุณภาพทางเคมี

3.7.1 ค่า pH

นำน้ำบัวบกปริมาตร 20 มิลลิลิตร วัดค่า pH ด้วยเครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (Eutech, model CyberScan PH510, Singapore) โดยปรับมาตรฐานเครื่องวัดค่า pH ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์มาตรฐาน pH 4.01, 7.00 และ 10.01 ก่อนแล้วจึงวัดค่า pH ของตัวอย่าง

3.7.2 ปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิค

วิเคราะห์หาปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิค โดยวิธีทางสเปกโตรโฟโตเมตริก ตามวิธีของ Tsai *et al*. (2005) มีหลักการ คือ ตัวอย่างทำปฏิกิริยากับ Folin-Ciocalteu reagent ซึ่งประกอบด้วย phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents โดยสารดังกล่าวจะไปออกซิไดซ์หมู่ฟีนอลิคไฮดรอกซิลของสารประกอบฟีนอลิคในตัวอย่าง เกิดเป็น tungsten และ molybdenum blue ซึ่งเป็นสารประกอบสีน้ำเงินและสามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุด 765 นาโนเมตร แล้วหาปริมาณรวมสารประกอบฟีนอลิคโดยเปรียบเทียบกับปริมาณของกรดแกลลิกมาตรฐาน (gallic acid) มีวิธีการ ดังนี้

วิธีวิเคราะห์

นำน้ำบัวบก 5 มิลลิลิตร มาปั่นเหวี่ยงด้วยแรง 12,000xg โดยเครื่องปั่นเหวี่ยง (Hettich Zentrifuge Universal, model Mikro22R, Germany) เป็นเวลา 20 นาที นำสารละลายใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยง มาเจือจาง 3 เท่า โดยปิเปตสารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายที่เจือจางแล้ว 0.1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลอง เติม Folin-Ciocalteu phenol reagent 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 10% (w/v) จำนวน 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร หาปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิค โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก (ภาคผนวก ค) และรายงานผลเป็น μg/ml ของผลิตภัณฑ์ตัวอย่าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การคำนวณหาปริมาณรวมสารประกอบฟีนอลิค

กราฟมาตรฐานสารประกอบฟีนอลิค แสดงดังรูปภาคผนวก ค1

โดยมีสูตรสมการเส้นตรง คือ

$$y = 0.0056x \quad (5)$$

โดย y = ค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้

x = ปริมาณรวมสารประกอบฟีนอลิคเป็น μg/ml

จากนั้นนำค่า x มาคูณ 3 (dilution factor) จะได้ปริมาณรวมสารประกอบฟีนอลิคโดยมีหน่วยเป็น μg/ml ของผลิตภัณฑ์ตัวอย่าง

3.7.3 ปริมาณรวมคลอโรฟิลล์

วิเคราะห์หาปริมาณรวมคลอโรฟิลล์ในน้ำบัวบก โดยวิธีทางสเปกโตรโฟโตเมตริก ตามวิธีของ Mahanom *et al*. (1999) โดยทั่วไปในพืชมีคลอโรฟิลล์ 2 ชนิด คือ คลอโรฟิลล์เอ (chlorophyll a) และ คลอโรฟิลล์บี (chlorophyll b) โดยรงควัตถุทั้งสองสามารถดูดกลืนแสงในย่านสเปกตรัมสีน้ำเงินและแดง แต่สามารถดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นที่จำเพาะแตกต่างกัน โดยคลอโรฟิลล์เอ มีความสามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 663 นาโนเมตร ส่วนคลอโรฟิลล์บีมีความสามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 645 นาโนเมตร เนื่องจากสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของคลอโรฟิลล์ทั้งสองชนิดซ้อนทับกัน ดังนั้น การคำนวณหาปริมาณรวมคลอโรฟิลล์ มีวิธีการคำนวณ ดังสมการต่อไปนี้ (http://www-class.unl.edu/biochem/labs/student/exp1.htm)

$$\text{Chl a } (\mu\text{g/ml sample}) = \frac{((12.7 \times \text{Abs}_{663}) - (2.6 \times \text{Abs}_{645})) \times \text{ml Acetone}}{\text{ml sample}} \quad (6)$$

$$\text{Chl b } (\mu\text{g/ml sample}) = \frac{((22.9 \times \text{Abs}_{645}) - (4.68 \times \text{Abs}_{663})) \times \text{ml Acetone}}{\text{ml sample}} \quad (7)$$

$$\text{Total chlorophyll} = \text{Chl a} + \text{Chl b} \quad (8)$$

หมายเหตุ ปริมาณรวมคลอโรฟิลล์มีหน่วยเป็น μg/ml ของผลิตภัณฑ์ตัวอย่าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีวิเคราะห์

ปิเปตน้ำบัวบก 2 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลอง เติมแคลเซียมคาร์บอเนต (Merck, Germany) 0.2 กรัม และสารละลายอะซิโตน 80% (v/v) ปริมาณ 10 มิลลิลิตร เขย่า 3 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็ว 4,200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 645 และ 663 นาโนเมตรโดยใช้อะซิโตน 80% (v/v) เป็นสารละลายแบลงค์ แล้วคำนวณหาปริมาณรวมคลอโรฟิลล์

3.7.4 ปริมาณกรดแอสคอร์บิก

วิเคราะห์หาปริมาณกรดแอสคอร์บิกในน้ำบัวบก โดยวิธีการไทเทรตด้วยสารละลาย indophenol dye ตามวิธีของ Mahanom *et al*. (1999)

วิธีวิเคราะห์

นำสารละลายกรดแอสคอร์บิกมาตรฐานความเข้มข้น 1 mg/ml จำนวน 2 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายกรดเมตาฟอสฟอริก (m-phosphoric acid) 30%(w/v) จำนวน 5 มิลลิลิตร ไทเทรตกับสารมาตรฐานอินโดฟีนอลความเข้มข้น 1 mM จนถึงจุดยุติ (สมมุติเท่ากับ a มิลลิลิตร) บันทึกปริมาตรที่ใช้สำหรับเป็นค่ามาตรฐานในการคำนวณหาปริมาณกรดแอสคอร์บิก

นำน้ำบัวบก 2 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายกรดเมตาฟอสฟอริก (m-phosphoric acid) 30%(w/v) จำนวน 5 มิลลิลิตร ไทเทรตกับสารมาตรฐานอินโดฟีนอลจนถึงจุดยุติ (สมมุติเท่ากับ b มิลลิลิตร) บันทึกปริมาตรที่ใช้

การคำนวณหาปริมาณกรดแอสคอร์บิก

การคำนวณหาปริมาณกรดแอสคอร์บิกในน้ำบัวบก โดยใช้ปริมาตรของสารมาตรฐานอินโดฟีนอลที่ใช้ในการไทเทรตน้ำบัวบก เปรียบเทียบกับที่ใช้ในการไทเทรตกับสารละลายกรดแอสคอร์บิกมาตรฐาน โดยมีวิธีคำนวณดังนี้

ปริมาตรสารมาตรฐานอินโดฟีนอล a มิลลิลิตร ไทเทรตพอดีกับกรดแอสคอร์บิกมาตรฐาน เท่ากับ 1 มิลลิกรัม

น้ำบัวบกใช้สารมาตรฐานอินโดฟีนอล b มิลลิลิตร ดังนั้น น้ำบัวบกมีปริมาณกรดแอสคอร์บิก เท่ากับ $(1 \times b) / a = c$ มิลลิกรัม นั่นคือ น้ำบัวบก 1 มิลลิลิตร มีกรดแอสคอร์บิกเท่ากับ c มิลลิกรัม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.8 การตรวจสอบคุณภาพทางกายภาพและเคมีระหว่างการเก็บรักษาบัวบกผงสำเร็จรูป

ศึกษาคุณภาพทางกายภาพและเคมีระหว่างการเก็บรักษาบัวบกผงสำเร็จรูป ที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งที่สภาวะเหมาะสม จากข้อ 3.4 โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ บัวบกผงที่ได้จากน้ำบัวบกไม่ใส่น้ำตาลและบัวบกผงที่ได้จากน้ำบัวบกความหวาน 14°Brix เก็บบัวบกผงในถุงอลูมิเนียมฟอยล์ (laminated aluminum foil) ในสภาพสุญญากาศ ที่อุณหภูมิ 25 และ 40C° เป็นเวลา 5 สัปดาห์ โดยถุงอลูมิเนียมฟอยล์นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายสำหรับผลิตภัณฑ์อาหารแห้ง เนื่องจากสามารถป้องกันความชื้น ออกซิเจน และแสงได้ดี จากนั้นตรวจสอบคุณภาพทางกายภาพและเคมี 4 ครั้ง คือ สัปดาห์ที่ 1, 2, 3 และ 5 โดยวัดค่าวอเตอร์แอคทิวิตีด้วยเครื่องวัดค่าวอเตอร์แอคทิวิตี วัดค่าสีตามวิธีข้อ 3.6 และหาปริมาณรวมสารประกอบฟีนอลิคและปริมาณรวมคลอโรฟิลล์ ตามวิธีข้อ 3.7.2 และ 3.7.3 ตามลำดับ โดยชุดควบคุม คือ น้ำบัวบกคืนรูปสัปดาห์ที่ 0

3.9 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การทดลองนี้ วางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (Complete Randomized Design, CRD) นำข้อมูลผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธีการหาค่าเฉลี่ย และทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple-range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($p \leq 0.05$) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved