# บทที่ 3

# วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

## 3.1 วัสดุ

### 3.1.1 วัตถุดิบ

- ตัวอย่างข้าว

การศึกษานี้ใช้ข้าวเหนียวดำพันธุ์ช่อไม้ไผ่ซึ่งเป็นข้าวพื้นเมือง ซึ่งได้ผ่านการปรับปรุงพันธุ์โดย ศูนย์วิจัยข้าวปัตตานี เตรียมตัวอย่างข้าวให้อยู่ในรูปของข้าวกล้อง บรรจุข้าวกล้องในถุงอลูมิเนียมฟอยด์ปริมาณ 500 กรัม ปิดผนึกแบบสุญญากาศและเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส

- ผลิตภัณฑ์

ส่วนผสมในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มน้ำข้าวสกัดเข้มข้นได้แก่ กระเจี๊ยบแห้ง น้ำผึ้ง น้ำตาลฟรุกโตส และอินนูลิน

### 3.1.2 สารเคมี

- กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid, HCl) (Labscan Asia Co. Ltd., ประเทศไทย)
- เอทานอล (ethanol, $C_2H_6O$) (Labscan Asia Co. Ltd., ประเทศไทย)
- โซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate, $Na_2Co_3$) (Merck, ประเทศเยอรมัน)
- โฟลินชิโอคัลทิว (folin-Ciocalteu) (BHD, ประเทศเยอรมัน)
- โพแทสเซียมซัลเฟต (potassium sulfate, $K_2SO_4$) (Merck, ประเทศเยอรมัน)
- โพแทสเซียมคลอไรด์ (potassium chloride, KCI) (Sigma-aldrich, ประเทศเยอรมัน)
- โซเดียมอะซิเตต (sodium acetate, $CH_3COOHNa$) (Sigma-aldrich, ประเทศเยอรมัน)
- $ABTS^+$ (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid),$C_{18}H_{18}N_4O_6S_4$) (Labscan Asia Co. Ltd., ประเทศไทย)
- $DPPH^{\cdot}$ (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl,$C_{18}H_{12}N_5O_6$) (Labscan Asia Co. Ltd., ประเทศไทย)
- กรดแกลลิก (gallic acid, $C_7H_6O_5$) (Sigma-aldrich, ประเทศเยอรมัน)

Prince of Songkla University Pattani Campus

- สารมาตรฐานโทรลอกซ์ (6-hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid, $C_{14}H_{18}O_4$) (Merck, ประเทศเยอรมัน)

**3.2 เครื่องมือวิเคราะห์และอุปกรณ์**

- เครื่องกะเทาะเปลือกข้าว (บริษัททองทวี ประเทศไทย)
- เครื่องกำเนิดคลื่นเสียงความถี่สูง (ultrasonic) (Model VCX500S/N57083AC, SONIC, Sonics Vibra Cell, USA)
- เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) (Model SevenEasy, Mettler Toledo, Switzerland)
- อ่างน้ำร้อน (water bath) (Model WB-22, Memert, German)
- เครื่องชั่งน้ำหนัก 4 ตำแหน่ง (Model TE 313S-DS 310, Sartorius, USA)
- เครื่องผสม (vortex mixer) (Model Vortex Genic 2, Scientific industries, USA)
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) (Libra S22, Biochrom, England)
- เครื่องเซ็นตริฟิวส์ (Model HARRIER 15/80 Bench Top Refrigerated Centrifuge, Sanyo, Japan)
- ตู้อบแบบลมร้อน (Model UNB 500, memert, German)
- โถดูดความชื้น (desiccator)
- คิวเวตพลาสติก
- เครื่องแก้ว เช่น ปิเปต บีกเกอร์ กระบอกตวง
- อุปกรณ์เครื่องครัวสำหรับการเตรียมผลิตภัณฑ์ เช่น หม้อ ทัพพี กระชอน

**3.3 วิธีการทดลอง**

**3.3.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (Ultrasonic, US) เพื่อสกัดสารแอนโทไซยานินจากข้าวเหนียวดำ**

เครื่องกำเนิดคลื่นเสียงความถี่สูงที่ใช้ในการทดลองนี้มีขนาด 20 กิโลเฮิรตซ์ มีกำลังสูงสุด 500 วัตต์ คลื่นถูกส่งผ่านหัวโพรบขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 13 มิลลิเมตร

**3.3.1.1 ศึกษาผลของระดับกำลังและระยะเวลาการใช้ US ต่อปริมาณแอนโทไซยานิน**

ผสมข้าวเหนียวดำกับน้ำกลั่น (อัตราส่วนข้าวต่อน้ำเท่ากับ 1:5) ปริมาณข้าว 20 กรัม และน้ำ 100 มล. โดยแปรระดับกำลัง US 5 ระดับ คือ 100, 200, 300, 400 และ 500 วัตต์ ระยะเวลาการใช้ 10, 20, 30, 40 และ 50 นาที โดยควบคุมอุณหภูมิในการสกัดไม่เกิน 50 องศาเซลเซียส วางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียล (5x5) ในแบบสุ่มสมบูรณ์ กรองน้ำข้าวด้วยผ้าขาวบาง

Prince of Songkla University Pattani Campus

น้ำสกัดที่ได้นำไปเซ็นตริฟิวส์ แล้ววิเคราะห์ปริมาณสารแอนโทไซยานินทั้งหมด (Finocchiaro *et al.*, 2010) ดังภาคผนวก ก.ข้อที่ 5. และคำนวนอัตราการสกัดสารแอนโทไซยานิน โดยวิธีการคำนวณแสดงในภาคผนวก ก.ข้อที่ 5.1

เปรียบเทียบผลการทดลองและคัดเลือกชุดการทดลองที่เหมาะสม กล่าวคือ ให้ปริมาณสารแอนโทไซยานินสูงสูดและเมล็ดข้าวเกิดความเสียหายน้อยหรือเกิดการแตกหักน้อย (อันเป็นอุปสรรคในการทดลองขั้นตอนต่อไป

**3.3.1.2 ศึกษาผลของสัดส่วนข้าวต่อปริมาณน้ำและปริมาณรวมตัวอย่าง**

ใช้ US ที่กำลังและระยะเวลาที่คัดเลือกจากตอนที่ 3.3.1.1 กำหนดข้าวต่อน้ำ 3 ระดับ และปริมาณตัวอย่างรวมสัดส่วนละ 2 ปริมาณรวม ดังแสดงในตาราง 3.1 น้ำข้าวสกัดที่ได้กรองด้วยผ้า ก่อนนำไปเซ็นตริฟิวส์ จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณสารแอนโทไซยานินทั้งหมด (Finocchiaro *et al.*, 2010)

**Table 3.1** Ratio of rice to water and the total volume of the sample in the experiment

| Rice to water | | Total sample weight (g) | Treatment |
|---|---|---|---|
| Ratio | Volume (g/g) | | |
| 1:2.5 | 40:100 | 140 | A |
| 1:5 | 20:100 | 120 | B |
| 1:10 | 10:100 | 110 | C |
| 1:2.5 | 60:150 | 210 | A1 |
| 1:5 | 35:175 | 210 | B1 |
| 1:10 | 20:200 | 220 | C1 |

วางแผนการทดลองแบบ CRD วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของค่าเฉลี่ย และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของชุดการทดลอง A B และ C ด้วย DMRT และเปรียบเทียบระหว่าง A กับ A1, B กับ B1 และ C กับ C1 ด้วย T-test จากนั้นคัดเลือกสภาวะที่เหมาะสม โดยพิจารณาจากปริมาณสารแอนโทไซยานินสูงสุดและเมล็ดข้าวเสียหายน้อย เพื่อใช้ในการทดลองตอนต่อไป

Prince of Songkla University Pattani Campus

**3.3.2 เปรียบเทียบการสกัดด้วยความร้อน (Heating extraction, HE) และการใช้ US ร่วมกับความร้อน (Ultrasonic combinations with heating extraction, USHE)**

ศึกษาเปรียบเทียบสมบัติของน้ำข้าวสกัดที่ผ่านและไม่ผ่านการพรีทรีเม้นต์ด้วย US ก่อนการให้ความร้อนดังนี้ ผสมข้าวต่อน้ำ 1:5 (ปริมาณข้าว 20 กรัม และน้ำ 100 มล.) นำไปพรีทรีเม้นต์ด้วย US กำหนดกำลัง และระยะเวลาของการใช้ US ที่คัดเลือกจากข้อ 3.3.1.1 และให้ความร้อนโดยกำหนดอุณหภูมิการสกัดเป็น 50, 60, 70, 80 และ 100 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการสกัด 10, 20 30 และ 40 นาที กรองน้ำข้าวสกัดด้วยผ้าขาวบาง วิเคราะห์สมบัติต่างๆของน้ำข้าวสกัดที่ได้เปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ไม่ผ่านการพรีทรีตเม้นต์ด้วย US แต่ให้ความร้อนที่อุณหภูมิและระยะเวลาระดับเดียวกัน ตรวจสอบคุณสมบัติน้ำสกัดดังนี้ (วิธีวิเคราะห์สมบัติต่างๆ แสดงในภาคผนวก ก.)

- ปริมาณของแข็งทั้งหมด (AOAC, 2000)
- ความหนืด (Orolan and Gutt, 2010)
- สี โดยเครื่องวัด colorimeter (Palou *et al*., 1999)
- การส่องผ่านของแสง (transmission) (Palou *et al*., 1999)
- ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด* (Finocchiaro *et al*., 2010)
- ปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด* (Aguilar-Garcia *et al.,* 2007)
- ความสามารถในการยับยั้งอนุมูล $ABTS^{+}$ * (Choi *et al*., 2007)
- ความสามารถในการยับยั้งอนุมูล $DPPH^{\cdot}$ * (Butsat and Siriamornpun, 2010)
- น้ำข้าวเหนียวดำสกัด ผ่านการเซ็นตริฟิวส์แยกตะกอนด้วยความเร็ว 8000 รอบ/ นาที เป็นระยะเวลา 15 นาที ก่อนทำการวิเคราะห์

วางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียล ในแผนสุ่มสมบูรณ์ นำผลการวิเคราะห์คุณภาพน้ำสกัด มาวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล (Analysis of Variance ANOVA) และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของคุณภาพต่างๆ โดยใช้ Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับ 95 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบน้ำสกัดที่ได้จากวิธี HE กับ USHE ด้วยวิธี T-test

**3.3.3 เปรียบเทียบการให้ความร้อนโดยตรง (Hotplate heating, HH) และการให้ความร้อนโดยอ้อม (Water bath heating, WH) ต่อคุณสมบัติของน้ำสกัดจากข้าวเหนียวดำ**

ศึกษาเปรียบเทียบสมบัติของน้ำข้าวสกัดที่ผ่านการให้ความร้อนโดยตรง (Hotplate heating, HH) และการให้ความร้อนโดยอ้อม (Water bath heating, WH) ดังนี้ การให้ความร้อนแบบ HH โดยผสมข้าวต่อน้ำ 1:5 (ปริมาณข้าว 20 กรัม และน้ำ 100 มล.) ในบิกเกอร์แล้วนำไปให้ความร้อนบนเตา (hot plate) โดยตรงที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส และระยะเวลาในการสกัดคือ 30, 40, 50

Prince of Songkla University Pattani Campus

และ 60 นาที จากนั้นกรองด้วยผ้าขาวบาง ส่วนวิธีการให้ความร้อนแบบ WH โดยนำตัวอย่างในบิกเกอร์ ไปให้ความร้อนด้วยอ่างน้ำร้อน โดยใช้อุณหภูมิและระยะเวลาที่ระดับเดียวกันกับ HH ได้น้ำสกัดจาก 2 วิธีนำไปตรวจสอบคุณภาพน้ำสกัดเช่นเดียวกับข้อ 3.3.2

วางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียลในแผนสุ่มสมบูรณ์ นำผลการวิเคราะห์คุณภาพน้ำสกัด มาวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล (Analysis of Variance ANOVA) และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของคุณภาพต่างๆ โดยใช้ Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับ 95 เปอร์เซ็นต์

คัดเลือกชุดการทดลองที่เหมาะสม โดยพิจารณาปริมาณสารแอนโทไซยานิน และฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระสูง ปริมาณของแข็งและความหนืดที่เหมาะสมกับผลิตภัณฑ์ เพื่อใช้ในการเตรียมน้ำข้าวสกัดสำหรับการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

**3.3.4 การเตรียมผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มน้ำข้าวเหนียวดำสกัด**

เตรียมผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มน้ำข้าวเหนียวดำสกัด และศึกษาทดลองจนได้กระบวนการผลิตที่เหมาะสม ได้เป็นผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มน้ำข้าวเหนียวดำสกัด ในขวดแก้วปิดฝาสนิท จากนั้นศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพระหว่างการเก็บรักษา โดยทำการเก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของตัวอย่างผลิตภัณฑ์ วันที่ 0, 7, 14, 21, 28 และ 35 วิเคราะห์คุณภาพของเครื่องดื่มน้ำข้าวเหนียวดำสกัดน้ำดังนี้

**3.3.4.1 คุณภาพด้านจุลินทรีย์** (วิเคราะห์วันที่ 0, 14 และ 35)

- ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด* (Larry and James, 1998)
- ปริมาณยีสต์และรา* (Valerie *et al.,* 2000)
- ปริมาณ *S. aureus* (Reginald and Gayle, 1998)
- ปริมาณ *E. coli* (Feng *et al.,* 2002)
- ปริมาณคอลิฟอร์มแบคทีเรีย (Feng *et al.,* 2002)
- ปริมาณ *B. cereus* (Rhodehamel and Harmon, 2004)
- ปริมาณ *C perfringens sp*. (Rhodehamel and Harmon, 2004)

Prince of Songkla University Pattani Campus

**3.3.4.2 คุณภาพทางเคมี** (วิธีการวิเคราะห์คุณภาพ แสดงในภาคผนวก ก.)

- ค่าความหนืด (Orolan and Gutt, 2010)
- ปริมาณของแข็งทั้งหมด (AOAC, 2000)
- ค่าสี โดยเครื่องวัด colorimeter* (Palou *et al*., 1999)
- pH (AOAC, 2000) *

นำตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่เตรียมข้างต้นไปเซนตริฟิวส์ที่ความเร็ว 8000 รอบ/ นาที เป็นระยะเวลา 15 นาที แยกเฉพาะส่วนที่เป็นน้ำสกัดเพื่อวิเคราะห์ดังนี้

- ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด* (Finocchiaro *et al*.,2010)
- ปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด* (Aguilar-Garcia *et al.,* 2007)
- ความสามารถในการยับยั้งอนุมูล $ABTS^{+}$ * (Choi *et al*., 2007)
- ความสามารถในการยับยั้งอนุมูล $DPPH^{\cdot}$ (Butsat and Siriamornpun, 2010)

* วิเคราะห์วันที่ 0, 7, 14, 21, 28 และ 35

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล (Analysis of Variance, ANOVA) และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของสมบัติต่างๆ โดยใช้ Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับ 95 เปอร์เซ็นต์

**3.3.4.3 คุณภาพทางประสาทสัมผัส**

ทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มน้ำข้าวเหนียวดำสกัด โดยนำตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่เก็บรักษาในอุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มาประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์ในวันที่ 0, 7, 14, 21, 28 และ 35 โดยใช้การทดสอบแบบ Hedonic Scale 9 ระดับ ใช้จำนวนผู้ทดสอบจำนวน 15 คน ที่ผ่านการฝึกฝนเพื่อทดสอบชิมผลิตภัณฑ์มาแล้ว วิธีการทดสอบใช้แบบ 9-point hedonic scale (1 = ไม่ชอบมากที่สุด และ 9 = ชอบมากที่สุด) คุณลักษณะที่ประเมินได้แก่ สี กลิ่นรสข้าว รสหวาน รสเปรี้ยว ความรู้สึกภายในปาก ความข้นหนืด และความชอบโดยรวม

วางแผนการทดลองแบบการทดลองที่มีแผนแบบสุ่มบล็อกสมบูรณ์ทำการทดลอง 15 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล (Analysis of Variance, ANOVA) และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของสมบัติต่างๆ โดยใช้ Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับ 95 เปอร์เซ็นต์

Prince of Songkla University Pattani Campus