บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การเตรียมตัวอย่าง

1. น้ำผึ้ง

น้ำผึ้งมีอายุไม่เกิน 1 ปี ซื้อจากร้านจำหน่ายน้ำผึ้ง อ. สันทราย จ. เชียงใหม่ น้ำผึ้งมีสามชนิดได้แก่ น้ำผึ้งดอกลำไย น้ำผึ้งดอกไม้ป่า และน้ำผึ้งดอกทานตะวัน เก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-6 °C เพื่อรักษาคุณภาพของน้ำผึ้งซึ่งก่อนที่จะวิเคราะห์สมบัติของน้ำผึ้งต้องนำน้ำผึ้งวางไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 12 ชั่วโมง

2. เมี่ยง

เมี่ยงที่ใช้ในการทดลองได้จากบ้านแม่ตอน ต.เทพเสด็จ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่ โดยเป็นเมี่ยงที่หมักแล้วเสร็จในเดือนตุลาคม

ภาพ 3.1 เมี่ยง

3. การเตรียมเมี่ยงทรงเครื่อง

การผลิตเมี่ยงทรงเครื่องใช้สูตรของ ผศ.พรธิรา บุญเรืองยา ซึ่งมีส่วนประกอบตามตาราง 3.1 แบ่งออกเป็น 2 ส่วนได้แก่ใบเมี่ยง และไส้เมี่ยง การเตรียมไส้เมี่ยงมีส่วนผสมของน้ำผึ้ง 390 กรัม มะพร้าวคั่ว 296 กรัม ถั่วลิสงคั่ว (บด) 130 กรัม งาดำคั่ว 58 กรัม และเกลือป่น 9 กรัม นำส่วนผสมดังกล่าวมาผสมให้เข้ากันและทำเป็นก้อนๆ ให้มีขนาดก้อนละประมาณ 8.5±1.4 กรัม จากนั้นจึงนำใบเมี่ยงมาห่อไส้เมี่ยงให้มีลักษณะเป็นก้อนกลมซึ่งได้ทั้งหมด 104 ก้อน เมี่ยงทรงเครื่อง 1 ก้อนมีน้ำหนักประมาณ 11.5±1.2 กรัมประกอบด้วยใบเมี่ยงประมาณ 2.5 ±0.2 กรัมและไส้เมี่ยงประมาณ 8.5 ±0.8 กรัม

เมี่ยงทรงเครื่องที่ใช้ในการวิเคราะห์ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 °C จนได้ความชื้น 12 % จากนั้นนำมาบดให้ละเอียด บรรจุในถุงอะลูมิเนียมฟอยล์และในตู้แช่แข็ง

PAYAP UNIVERSITY

ตาราง 3.1 ส่วนประกอบของไส้เมี่ยงทรงเครื่อง

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (กรัม)
น้ำผึ้ง	390
เนื้อมะพร้าว	296
ถั่วลิสง	130
งาดำ	58
เกลือป่น	9

3.2 สารเคมี อุปกรณ์ และเครื่องมือ

3.2.1 สารเคมีที่สำคัญ

1. Folin-Ciocalteu reagent (BDH)
2. Gallic acid (Aldrich)
3. DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) (Fluka)
4. Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) (Fluka)
5. Quercetin (Aldrich)
6. Aluminum chloride hexahydrate (UNIVAR)
7. Sodium carbonate anhydrous (UNIVAR)
8. Sodium nitrite (UNIVAR)
9. Methanol (QReC)

3.2.2 อุปกรณ์

1. Burette
2. Volumetric flask
3. Pipette
4. Erlenmeyer flask

3.2.3 เครื่องมือ

1. Spectrophotometer (Specronic 21)
2. Analytical balance (OHAUS)
3. pH meter (SCHOTT CG 840)

3.3 วิธีการศึกษา

3.3.1 การวิเคราะห์สมบัติของน้ำผึ้ง

1. การวิเคราะห์สมบัติทางเคมีและกายภาพ

(1) ความชื้นโดยวิธี vacuum oven method (Ahmed *et al.*, 2007)

PAYAP UNIVERSITY

น้ำผึ้ง 5 กรัมใน aluminum dish (pre-weighed) อบที่อุณหภูมิ 70 °C ความดัน 25 mmHg เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ด้วย vacuum oven

$$\text{ความชื้น (moisture content)} = \frac{M_2 - M_3}{M_2 - M_1} \times 100\ \%$$

เมื่อ M_1 เป็นมวลของ aluminum dish (pre-weighed) (g)
M_2 เป็นมวลของ aluminum dish (pre-weighed) + ตัวอย่าง (g) ก่อนอบ
M_3 เป็นมวลของ aluminum dish (pre-weighed) + ตัวอย่าง(g) หลังอบ

(2) ปริมาณเถ้าด้วยวิธี dry ashing (Lawan *et al.*, 2009)

น้ำผึ้งประมาณ 2-3 กรัม ชั่งใน crucible (pre-weighed) นำไปเผาในเตา (Muffle furnace) ที่อุณหภูมิ 550±1 °C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

$$\text{ปริมาณเถ้า (ash)} = \frac{M_2 - M_1}{M_3 - M_1} \times 100\ \%$$

เมื่อ M_1 เป็นมวลของ crucible (pre-weighed) (g)
M_2 เป็นมวลของ crucible (pre-weighed) + ตัวอย่าง (g)
M_3 เป็นมวลของ crucible (pre-weighed) + เถ้า(g)

(3) ค่าความเป็นกรด-เบส ด้วยเครื่อง pH meter (Ahmed *et al.*, 2007)

น้ำผึ้ง 10 กรัมละลายในน้ำกลั่น 90 mL (CO_2-free) วัดค่าความเป็นกรด-เบส ด้วยเครื่อง pH meter

(4) ปริมาณกรดโดยวิธีการไทเทรตกรด-เบส (Lawan *et al.*, 2009)

น้ำผึ้ง 10 กรัมละลายในน้ำกลั่น 100 mL (CO_2-free) เติมสารละลายฟีนอล์ฟทาลีน 0.3 mL นำไปไทเทรตกับสารละลาย 0.1N NaOH เมื่อสารละลายปรากฏสีชมพูอ่อนๆเป็นจุดยุติของการไทเทรต ปริมาณกรดจากการไทเทรตคำนวณจากกรดแลกติก ตามสมการต่อไปนี้

$$\text{ปริมาณกรด (as lactic acid)} = \frac{M \times V \times 9}{w}\ \%$$

เมื่อ M เป็นความเข้มข้นของสารละลาย NaOH (mol/L)
V เป็นปริมาตรของสารละลาย NaOH ที่จุดยุติ (mL)
w เป็นมวลของน้ำผึ้ง (g)

PAYAP UNIVERSITY

(5) ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้ วัดด้วย hand refractometer

เก็บน้ำผึ้งไว้ที่อุณหภูมิ 20 °C เป็นเวลาหนึ่งคืน ใช้น้ำผึ้ง 1-2 หยดวัดค่าปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้ด้วยเครื่อง hand refractometer

(6) ปริมาณน้ำตาลโดยวิธี Lane-Eynon titration (Lawan *et al.*, 2009)

การไทเทรตหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธี Lane-Eynon titration ใช้สารละลายน้ำตาลอินเวอร์ท (เตรียมจากซูโครส) เป็นสารละลายมาตรฐาน

2. การวิเคราะห์สมบัติในการต้านออกซิเดชัน

(1) ปริมาณพอลิฟีนอลทั้งหมดโดยวิธี Folin-Ciocalteu assay (Alvarez-Suarez *et at.*, 2010)

น้ำผึ้งประมาณ 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 50 mL สารละลายน้ำผึ้ง 5 mL เจือจางให้มีปริมาตร 50 mL สารละลายน้ำผึ้งที่เจือจางแล้ว 1 mL ผสมกับสารละลาย Folin-Ciocalteu (1:10) 5 mL หลังจาก 8 นาทีเติมสารละลาย Na_2CO_3 (7.5 %) จำนวน 4 mL ผสมด้วย vortex mixer เก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm เทียบกับสารละลายกรดแกลลิก (0.0002 - 0.003 mg/L) เป็นสารละลายมาตรฐาน ปริมาณพอลิฟีนอลทั้งหมดกำหนดเป็น gallic acid equivalent หน่วย mg GAE / 100 g

(2) ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดโดยวิธี aluminum chloride colorimetric assay (Alvarez-Suarez *et at.*, 2010)

สารละลายน้ำผึ้ง (12.5g /100 mLในเมทานอล) หรือสารละลายเควอซีทิน (ความเข้มข้น5 - 200 mg/L) จำนวน 1 mL ผสมน้ำกลั่น 6 mL เติมสารละลาย $NaNO_2$ (5 %) จำนวน 0.5 mL เก็บไว้ 5 นาที และวินาทีที่ 6 เติมสารละลาย $AlCl_3$ (10 % ในเมทานอล) จำนวน 0.5 mL และสารละลาย NaOH (1 mol/L) จำนวน 2 mL ผสมด้วย vortex mixer วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 nm ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดกำหนดเป็น quercetin equivalent (QE) หน่วย mg QE / 100 g

(3) การวิเคราะห์ free radical scavenging activity โดยวิธี DPPH free radical scavenging assay (Meda *et al.*, 2005)

สารละลายน้ำผึ้ง (10 % ในเมทานอล) ปริมาตร 1, 1.5, 2, 2.5, 3 และ 3.5 mL เป็นสารละลายตัวอย่างผสมกับสารละลาย DPPH (3.5 mg/100 mL ในเมทานอล) 5 mL ปรับปริมาตรให้ครบ 10 mL ด้วยเมทานอล เก็บไว้ในที่มืด 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm และใช้เมทานอลเป็น blank ส่วนสารละลาย DPPH 5 mL ผสมกับเมทานอล 5 mL วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm ที่เวลา 0 นาที เป็น control ค่า free radical scavenging activity ในทำนองเดียวกันกับสารละลายน้ำผึ้งแต่ใช้สารละลาย Trolox (10.2 mg/100 mL ในเมาทนอล) เป็นสารมาตรฐานปริมาตร 0.2, 0.8, 1.6, 2.4, 3.2, 4 และ 5 mL เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน ค่า TEAC กำหนดในหน่วย µmol Trolox/100g

PAYAP UNIVERSITY

3.3.2 การวิเคราะห์สมบัติของเมี่ยง

1. การวิเคราะห์สมบัติทางเคมีและกายภาพ

(1) การวิเคราะห์ความชื้นโดยวิธี hot air oven

(2) การวิเคราะห์เถ้าโดยวิธี dry ashing

2. การวิเคราะห์สมบัติการต้านออกซิเดชัน

(1) ปริมาณพอลิฟีนอลทั้งหมดโดยวิธี Folin-Ciocalteu assay

ตัวอย่างประมาณ 1 กรัมบดละเอียด สกัดด้วยเมทานอล 2 ครั้งๆ ละ 20 mL กรอง และรวบรวม filtrate ปรับปริมาตรของ filtrate ให้ครบ 250 mL ด้วยเมทานอล ปิเปตสารสกัดเจือจางมา 2 mL ปรับปริมาตรเป็น 50 mL ด้วยเมทานอล สารละลายของสารสกัดที่เจือจาง 1 mL ผสมกับสารละลาย Folin-Ciocalteu (1:10) 5 mL หลังจาก 8 นาทีเติมสารละลาย Na_2CO_3 (7.5 %) จำนวน 4 mL ผสมด้วย vortex mixer เก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm เทียบกับสารละลายกรดแกลลิก (0.0002-0.003 mg/L) เป็นสารละลายมาตรฐาน ปริมาณพอลิฟีนอลทั้งหมดกำหนดเป็น *gallic acid equivalent* หน่วย *mg GAE /100 g db*

(2) ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดโดยวิธี aluminum chloride colorimetric assay

ตัวอย่างประมาณ 1 กรัมบดละเอียด สกัดด้วยเมทานอล 2 ครั้งๆ ละ 20 mL กรอง และรวบรวม filtrate ปรับปริมาตรของ filtrate ให้ครบ 250 mL ด้วยเมทานอล ปิเปตสารสกัดเจือจางมา 2 mL ปรับปริมาตรเป็น 50 mL ด้วยเมทานอล สารละลายของสารสกัดที่เจือจางแล้ว 1 mL ผสมน้ำกลั่น 6 mL เติมสารละลาย $NaNO_2$ (5 %) จำนวน 0.5 mL เก็บไว้ 5 นาที วินาทีที่ 6 เติมสารละลาย $AlCl_3$ (10 % ในเมทานอล) จำนวน 0.5 mL หลังจาก 5 นาที เติมสารละลาย NaOH (1mol/L)จำนวน 2 mL ผสมด้วย vortex mixer วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 nm สารละลายเควอซีทิน (ความเข้มข้น5-200 mg/L) เป็นสารละลายมาตรฐาน ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดกำหนดเป็น quercetin equivalent (QE) หน่วย mg QE / 100 g db

(3) การวิเคราะห์ free radical scavenging activity โดยวิธี DPPH free radical scavenging assay

ตัวอย่างประมาณ 1 กรัมบดละเอียด สกัดด้วยเมทานอล 2 ครั้งๆ ละ 20 mL กรอง และรวบรวม filtrate ปรับปริมาตรของ filtrate ให้ครบ 250 mL ด้วยเมทานอล สารสกัดเจือจาง 2 mL ปรับปริมาตรเป็น 50 mL ด้วยเมทานอล สารละลายของสารสกัดที่เจือจาง 1 mL ผสมกับสารละลาย DPPH (3.5 mg/100 mL ในเมทานอล) 5 mL ปรับปริมาตรให้ครบ 10 mL ด้วยเมทานอล เก็บไว้ในที่มืด 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm เมทานอลเป็น blank สารละลาย *DPPH* 5 mL ผสมกับเมทานอล 5 mL วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm ที่เวลา 0 เป็น control ค่า free radical scavenging activity คำนวณในเทอมค่า TEAC กำหนดในหน่วย μmol Trolox/100 g db

PAYAP UNIVERSITY

3.3.3 การวิเคราะห์สมบัติของเมี่ยงทรงเครื่อง

1. การวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (proximate analysis)

(1) ความชื้นโดยวิธี vacuum oven drying

(2) ปริมาณเถ้าด้วยวิธี dry ashing

(3) ปริมาณไขมันโดยวิธี Soxhlet method

(4) ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Kjeldahl method

(5) คาร์โบไฮเดรททั้งหมดโดยวิธี difference method

2. การวิเคราะห์การต้านออกซิเดชัน

(1) ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดโดยวิธี aluminum chloride colorimetric assay

ตัวอย่างประมาณ 5 กรัมบดละเอียด สกัดด้วยเมทานอล 2 ครั้งๆ ละ 50 mL กรอง และรวบรวม filtrate ปรับปริมาตรของ filtrate ให้ครบ 250 mL ด้วยเมทานอล ปิเปตสารสกัดที่เจือจางแล้วมา 2 mL ปรับปริมาตรเป็น 50 mL ด้วยเมทานอล สารละลายของสารสกัดที่เจือจางแล้ว 1 mL ผสมน้ำกลั่น 6 mL เติมสารละลาย $NaNO_2$ (5 %) จำนวน 0.5 mL เก็บไว้ 5 นาที วินาทีที่ 6 เติมสารละลาย $AlCl_3$ (10 %ในเมทานอล) จำนวน 0.5 mL หลังจาก 5 นาที เติมสารละลาย NaOH (1mol/L) จำนวน 2 mL ผสมด้วย vortex mixer วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 nm สารละลายเควอซีทิน(ความเข้มข้น5-200 mg/L) เป็นสารละลายมาตรฐาน ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดกำหนดเป็น quercetin equivalent (QE) หน่วย mg QE/100g db

(2) ปริมาณพอลิฟีนอลทั้งหมดโดยวิธี Folin-Ciocalteu assay

ตัวอย่างประมาณ 5 กรัมบดละเอียด สกัดด้วยเมทานอล 2 ครั้งๆ ละ 50 mL กรอง และรวบรวม filtrate ปรับปริมาตรของ filtrate ให้ครบ 250 mL ด้วยเมทานอล ปิเปตสารสกัดที่เจือจางแล้วมา 2 mL ปรับปริมาตรเป็น 50 mL ด้วยเมทานอล สารละลายของสารสกัดที่เจือจางแล้ว 1 mL ผสมกับสารละลาย Folin-Ciocalteu (1:10) 5 mL หลังจาก 8 นาทีเติมสารละลาย Na_2CO_3 (7.5%) จำนวน 4 mL ผสมด้วย vortex mixer เก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm เทียบกับสารละลายกรดแกลลิก (0.0002-0.003 mg/L) เป็นสารละลายมาตรฐาน ปริมาณพอลิฟีนอลทั้งหมดกำหนดเป็น gallic acid equivalentหน่วย mg GAE/100g db

(3) การวิเคราะห์ free radical scavenging activity โดยวิธี DPPH free radical scavenging assay

ตัวอย่างประมาณ 5 กรัมบดละเอียด สกัดด้วยเมทานอล 2 ครั้ง ๆ ละ 50 mL กรอง และรวบรวม filtrate ปรับปริมาตรของ filtrate ให้ครบ 250 mL ด้วยเมทานอล ปิเปตสารสกัดที่เจือจางแล้วมา 2 mL ปรับปริมาตรเป็น 50 mL ด้วยเมทานอล สารละลายของสารสกัดที่เจือจางแล้ว 1 mL ผสมกับสารละลาย DPPH (4 mg/100 mLในเมทานอล) 5 mL ปรับปริมาตรให้ครบ 10 mL ด้วยเมทานอล เก็บไว้ในที่มืด 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm เมทานอลเป็น blank สารละลาย DPPH 5 mL ผสมกับเมทานอล 5 mL วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm ที่เวลา 0 เป็น control ค่า free radical scavenging activity คำนวณในเทอมค่า TEAC กำหนดในหน่วย μmol Trolox/100g db

PAYAP UNIVERSITY

3.4 การประเมินข้อมูลทางสถิติ

(1) แผนการทดลองเป็นแบบ CRD

(2) วิเคราะห์ ANOVA โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ SPSS

(3) วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan´s Multiple Range Test

****

PAYAP UNIVERSITY