บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

เครื่องมือและสารเคมี

1. เครื่องมือ

เครื่องกวนแม่เหล็ก (Magnetic Stirrer), Fisher Scientific, United State America; เครื่องกวนเชิงกล (Mechanical Stirrer), IKA Labortechnik, China; เครื่องชั่ง (Balance) 2 ตำแหน่ง และ 4 ตำแหน่ง, Sartorius, Germany; เครื่องระเหยตัวทำละลายภายใต้สภาวะสุญญากาศ (Rotary Evaporator), Buchi B-171, Switzerland; เครื่องปั๊มสุญญากาศสมรรถนะสูง (High vacuum pump), Edward; เครื่องทำแห้งเยือกแข็งสุญญากาศ (Freeze Dry), Edward; เครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (Nuclear Magnetic Resonance), รุ่น AVANCE 300 MHz Digital (Bruker DPX-300); เครื่อง FT-IR, Perkin-Elmer Spectrum รุ่น GX0 Series X; เครื่อง Ultraviolet Visible Spectrometer (UV-visible), Perkin-Elmer รุ่น Lamda 950

2. สารเคมี

Sodium acetate tri-hydrate, $CH_3COONa{\cdot}3H_2O$ (Fisher Chemicals, United Kingdom); Glacial acetic acid, CH_3COOH (Lab-Scan, Thailand); Hydrochloric acid, HCl (Lab-Scan, Thailand); Sodium phosphate dodecahydrate, $Na_3PO_4{\cdot}12H_2O$ (Merck, Germany); Boric acid, H_3BO_3 (Acors, United State American); Citric acid, $H_3C_6H_5O_7{\cdot}H_2O$ (Acors, United State American); Sulfuric acid, H_2SO_4 (Lab-Scan, Thailand); Trifluoroacetic acid, CF_3COOH (Aldrich, United State American); Phosphoric acid, H_3PO_4 (Lab-Scan, Thailand); Sodium Tripolyphosphate, $Na_5P_3O_{10}$ (Acros, United State American); Tyrosinase mushroom (Sigma-Aldrich, Germany); Distilled water, H_2O; Chitosan flake 90%DD (Taming, Thailand)

ขั้นตอนของการพัฒนาและปรับปรุงตัวชี้วัดความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์อาหารหมักประกอบไปด้วยขั้นตอน ดังนี้

สารสกัดแอนโธไซยานินส์จากใบผีเสื้อราตรี

1. การสกัดสารแอนโธไซยานินส์จากใบผีเสื้อราตรี

ต้นผีเสื้อราตรี (*Oxalis triangulalis*) ที่มีอายุของใบอยู่ระหว่าง 30 ถึง 60 วัน ทำการล้างใบผีเสื้อราตรีให้สะอาด ซับด้วยกระดาษ ทำการผึ่งให้แห้งแล้วหั่นให้ละเอียด และอบใบผีเสื้อราตรีที่สะอาดด้วยไอน้ำเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำใบผีเสื้อราตรีที่ผ่านการอบมาผสมกับน้ำในอัตราส่วนที่เหมาะสม และเก็บให้พ้นแสง ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลาอย่างน้อย 2 ชั่วโมง จึงกรองด้วยผ้าขาวบาง จะได้สารละลายสีม่วงเข้ม จากนั้นกรองแบบละเอียดอีกครั้ง จะได้สารสกัดใสสีม่วงเข้ม จากนั้นนำสารที่ได้นั้น มาทำให้เป็นผงของแข็งด้วยเครื่องทำแห้งเยือกแข็งสุญญากาศ (Freeze Drying) และทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค FT-IR spectroscopy และ ^{13}C NMR spectroscopy

2. การทดสอบคุณสมบัติการเปลี่ยนสีของสารสกัดแอนโธไซยานินส์ จากใบผีเสื้อราตรี

2.1 เตรียมสารละลาย 0.5 M acetate buffer pH 4.5 และ 5.0 จากสารละลายผสมระหว่าง $CH_3COONa.3H_2O/CH_3COOH$ โดยมีความเข้มข้นของสารละลายที่ pH 4.50 = 1.826×10^{-1} M/3.174×10^{-1} M และที่ pH 5.00 = 3.227×10^{-1} M/1.773×10^{-1} M

2.2 เตรียมสารละลายสารสกัดแอนโธไซยานินส์ 4% ในน้ำกลั่นโดยชั่งสารสกัดแอนโธไซยานินส์ 0.40 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร

2.3 เตรียมสารละลายผสม เพื่อนำมาทดสอบหาค่าสี ทำได้โดยนำสารสกัดแอนโธไซยานินส์ 4% ในน้ำกลั่น จำนวน 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในสารละลายบัฟเฟอร์ (pH 4.5 หรือ 5.0) 5 มิลลิลิตร ทดสอบด้วยเทคนิค spectrophotometry เพื่อหาค่าสี โดยใช้การวัดสีในระบบ CIELAB เพื่อวัดค่า L*, a*, b* ซึ่งใช้โปรแกรมทางคอมพิวเตอร์ช่วยในการคำนวณ และหาความแตกต่างโดยรวมของสีระหว่าง pH 4.5 กับ 5.0 โดยสามารถคำนวณหาค่าของความแตกต่างโดยรวมของสีจาก (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ก)

$$\text{Total color difference (TCD, } \Delta E) = [(L^*_1-L^*_2)^2 + (a^*_1-a^*_2)^2 + (b^*_1-b^*_2)^2]^{1/2}$$

โดยที่

L^*_1, a^*_1 และ b^*_1 คือ ค่าความสว่าง ค่าความแดง และค่าความเหลืองของสีที่ 1

L^*_2, a^*_2 และ b^*_2 คือ ค่าความสว่าง ค่าความแดง และค่าความเหลืองของสีที่ 2

QD
471
น1911ก
2552

i.4482220

สำนักหอสมุด
3 - มี.ย. 2552

การเตรียมเม็ดไคโตซาน

เนื่องจากงานวิจัยนี้มีจุดประสงค์ที่จะพัฒนาสารสกัดจากธรรมชาติที่มีสารแอนโธไซยานินส์เป็นองค์ประกอบเพื่อใช้เป็นตัวชี้วัดความปลอดภัยต่อการบริโภคผลิตภัณฑ์อาหารหมักที่มีความเหมาะสม และสะดวกต่อการนำไปใช้งาน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้คัดเลือกไคโตซานซึ่งเป็นวัสดุชีวภาพที่สามารถขึ้นรูป และจับยึดกับสารแอนโธไซยานินส์ได้ อีกทั้งยังคงความสามารถในการเป็นตัวชี้วัดค่า pH อยู่ และไม่มีความเป็นพิษต่อร่างกาย โดยในงานวิจัยนี้ได้ทำการเตรียมเม็ดไคโตซาน 3 วิธี ดังต่อไปนี้

1. การเตรียมเม็ดไคโตซาน (B1)

ชั่งไคโตซาน จำนวน 0.5 กรัม ใส่ลงในสารละลายกรดอะซิติกที่มีความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ 25 มิลลิลิตร กวนสารละลายด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกันเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นหยดสารละลายไคโตซานลงในสารละลายของ 10% ผลิตภัณฑ์ล้างจานในน้ำ (w/v) อย่างช้าๆ โดยผลิตภัณฑ์ดังกล่าวมี sodium linear alkylbenzene sulfonate 14.4% และ sodium lauryl ether sulfate 3.6% เป็นส่วนประกอบ กวนด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กเป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง กรองเม็ดไคโตซาน และทำการล้างด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง

2. การเตรียมเม็ดไคโตซาน (B2)

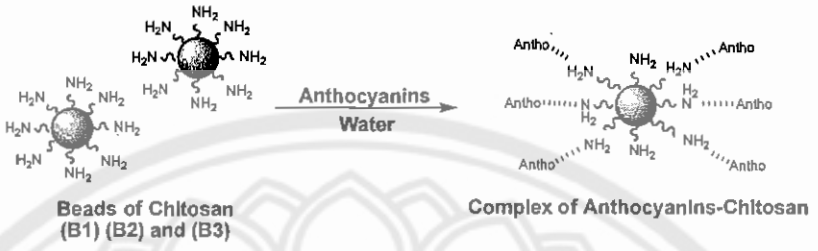
ชั่งไคโตซาน จำนวน 0.5 กรัม ใส่ลงในสารละลายกรดอะซิติกที่มีความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ 25 มิลลิลิตร กวนสารละลายด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกันเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นหยดสารละลายไคโตซานลงในสารละลายของ 10% ผลิตภัณฑ์ล้างจานในน้ำ (w/v) อย่างช้าๆ โดยผลิตภัณฑ์ดังกล่าวมี sodium linear alkylbenzene sulfonate 14.4% และ sodium lauryl ether sulfate 3.6% เป็นส่วนประกอบ กวนด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กเป็นเวลานาน 10 ชั่วโมง กรองเม็ดไคโตซาน และทำการล้างด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค FT-IR spectroscopy และ ^{13}C NMR spectroscopy

3. การเตรียมเม็ดไคโตซาน (B3)

ชั่งไคโตซาน จำนวน 0.5 กรัม ใส่ลงในสารละลายกรดอะซิติกที่มีความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ 25 มิลลิลิตร กวนสารละลายด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกันเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นหยดสารละลายไคโตซานลงในสารละลายของ 10% sodium tripolyphosphate ในน้ำ (w/v) อย่างช้าๆ โดยปล่อยให้เม็ดไคโตซานแช่ในสารละลายนั้น เป็นเวลานาน 4 ชั่วโมง กรองเม็ดไคโตซาน และทำการล้างด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง

การเตรียมเม็ดสารประกอบแอนโธไซยานินส์-ไคโตซาน

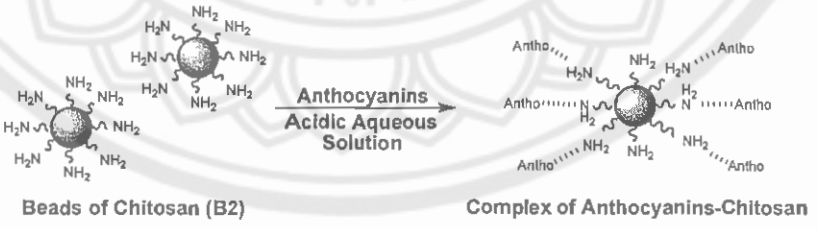
1. การเตรียมเม็ดสารประกอบแอนโธไซยานินส์-ไคโตซาน โดยไม่ใช้ตัวเร่งปฏิกิริยา



ภาพ 20 รูปแบบการเตรียมเม็ดสารประกอบแอนโธไซยานินส์-ไคโตซาน โดยไม่ใช้ตัวเร่งปฏิกิริยา

นำเม็ดไคโตซาน (B1), (B2) และ (B3) ที่เตรียมได้ ใส่ลงในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร เติมสารสกัดแอนโธไซยานินส์ 200 มิลลิกรัม กวนด้วยเครื่องกวนแม่เหล็ก เป็นเวลานาน 7 ชั่วโมง จากนั้นกรองเม็ดสารประกอบแอนโธไซยานินส์-ไคโตซาน และทำการล้างด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร เป็นเวลานาน 5 ชั่วโมง โดยทำการล้างทั้งหมด 3 ครั้ง (เนื่องจากเม็ดไคโตซาน (B3) ไม่แข็งแรง และอาจได้รับความเสียหายจากการแท่งกวนแม่เหล็กได้ จึงทำการทดลองโดยการแช่ในสารละลายแอนโธไซยานินส์แทน)

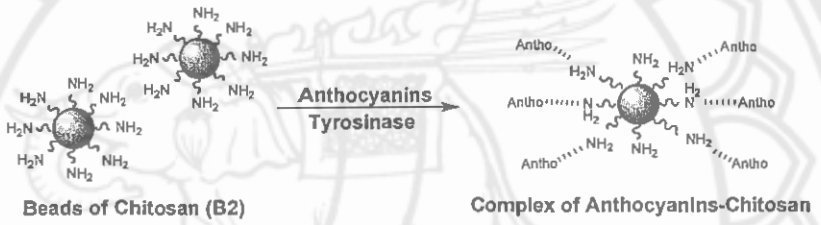
2. การเตรียมเม็ดสารประกอบแอนโธไซยานินส์-ไคโตซาน โดยใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา



ภาพ 21 รูปแบบการเตรียมเม็ดสารประกอบแอนโธไซยานินส์-ไคโตซาน โดยใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

นำเม็ดไคโตซาน (B2) ที่เตรียมได้ ใส่ลงในสารละลายกรด 50 มิลลิลิตร (โดยสารละลายกรดที่ใช้ศึกษาครั้งนี้ประกอบด้วย กรดซัลฟิวริก, กรดไฮโดรครอลิก, กรดอะซิติก, กรดไตรฟลูออโรอะซิติก และกรดฟอสเฟอริก ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ดังนี้ 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 โมลาร์) เติมสารสกัดแอนโธไซยานินส์ 200 มิลลิกรัม กวนด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กเป็นเวลานาน 7 ชั่วโมง จากนั้นกรองเม็ดสารประกอบแอนโธไซยานินส์-ไคโตซาน และทำการล้างด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร เป็นเวลานาน 5 ชั่วโมง โดยทำการล้างทั้งหมด 3 ครั้ง ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค FT-IR spectroscopy และ ^{13}C NMR spectroscopy

3. การเตรียมเม็ดสารประกอบแอนโธไซยานินส์-ไคโตซาน โดยใช้เอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinaze) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา



ภาพ 22 รูปแบบการเตรียมเม็ดสารประกอบแอนโธไซยานินส์-ไคโตซาน โดยใช้เอนไซม์ไทโรซิเนสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

นำเม็ดไคโตซาน (B2) ที่เตรียมได้ ลงในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร เติมสารสกัดแอนโธไซยานินส์ 50 มิลลิกรัม และเติมเอนไซม์ไทโรซิเนส ที่ความเข้มข้น 2, 20, 100 และ 200 Units กวนด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กเป็นเวลานาน 24 และ 144 ชั่วโมง ตามลำดับ จากนั้นกรองเม็ดสารประกอบแอนโธไซยานินส์-ไคโตซาน และทำการล้างด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร เป็นเวลานาน 5 ชั่วโมง โดยทำการล้างทั้งหมด 3 ครั้ง ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค FT-IR spectroscopy และ ^{13}C NMR spectroscopy

การศึกษาเม็ดสารประกอบแอนโธไซยานินส์-ไคโตซานที่พัฒนาขึ้น

1. การเตรียมเม็ดไคโตซาน (B4)

ชั่งไคโตซาน จำนวน 0.5 กรัม ใส่ลงในสารละลายกรดอะซิติกที่มีความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ 25 มิลลิลิตร กวนสารละลายด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกันเป็น

เวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นหยดสารละลายไคโตซานลงในสารละลายของ 10% ผลิตภัณฑ์ล้างจานในน้ำ (w/v) อย่างช้าๆ โดยผลิตภัณฑ์ดังกล่าวมี sodium linear alkylbenzene sulfonate 14.4% และ sodium lauryl ether sulfate 3.6% เป็นส่วนประกอบ กวนด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กเป็นเวลานาน 10 ชั่วโมง กรองเม็ดไคโตซาน และทำการล้างด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง

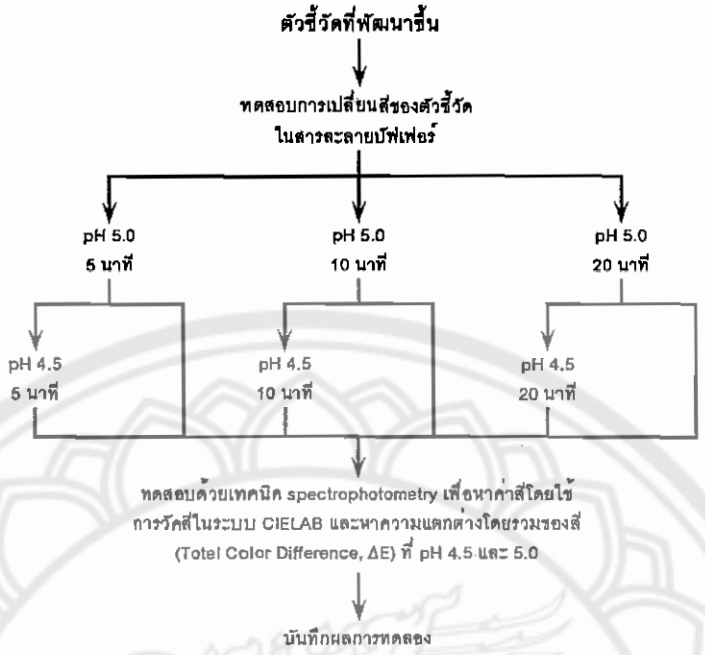
2. การเตรียมเม็ดสารประกอบแอนโธไซยานินส์-ไคโตซาน

นำเม็ดไคโตซาน (B4) จำนวน 120 เม็ด (0.3204 กรัม) ใส่ลงในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร เติมสารสกัดแอนโธไซยานินส์ 200 มิลลิกรัม กวนด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กเป็นเวลานาน 7 ชั่วโมง จากนั้นกรองเม็ดสารประกอบแอนโธไซยานินส์-ไคโตซาน และทำการล้างด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร เป็นเวลานาน 5 ชั่วโมง โดยทำการล้างทั้งหมด 3 ครั้ง

3. การศึกษาเวลาที่เหมาะสมต่อการเปลี่ยนสีของตัวชี้วัดที่พัฒนาขึ้น

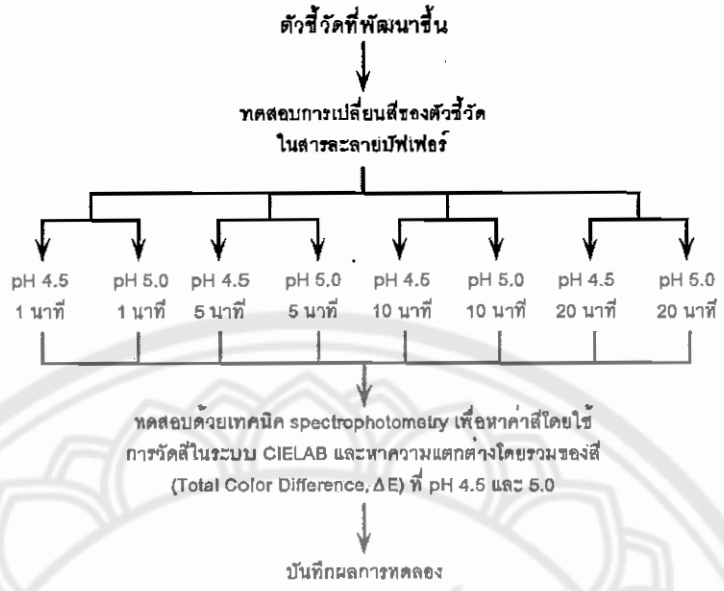
การศึกษาหาเวลาที่เหมาะสมต่อการเปลี่ยนสีของตัวชี้วัดที่พัฒนาขึ้นนั้น มีวิธีการทดลองโดยการนำตัวชี้วัดที่พัฒนาขึ้น มาทดสอบการเปลี่ยนแปลงสีในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 4.5 กับ pH 5.0 ทำการแช่ในเวลาที่แตกต่างกัน ซึ่งแบ่งการทดลองออกเป็น 2 แนวทางด้วยกัน ดังนี้

3.1 แนวทางที่ 1 นำเม็ดสารประกอบแอนโธไซยานินส์-ไคโตซานที่เตรียมได้ มาแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ pH 5.0 10 มิลลิลิตร เป็นเวลานาน 5 นาที จากนั้นนำเม็ดสารประกอบดังกล่าวไปแช่ต่อในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 4.5 10 มิลลิลิตรเป็นเวลานาน 5 นาที ทดสอบด้วยเทคนิค spectrophotometry เพื่อหาค่าสี โดยใช้การวัดสีในระบบ CIELAB เพื่อวัดค่า L*, a*, b* ซึ่งใช้โปรแกรมทางคอมพิวเตอร์ช่วยในการคำนวณ และหาความแตกต่างโดยรวมของสี ทำการทดลองซ้ำตามวิธีการข้างต้นแต่เปลี่ยนระยะเวลาในการแช่เป็น 10 และ 20 นาที ตามลำดับ



ภาพ 23 แผนผังการศึกษาเวลาที่เหมาะสมต่อการเปลี่ยนสีของตัวชี้วัดที่พัฒนาขึ้น ในแนวทางที่ 1

3.2 แนวทางที่ 2 นำเม็ดสารประกอบสารแอนโธไซยานินส์-ไคโตซานที่เตรียมได้มาแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 4.5 และ 5.0 10 มิลลิลิตร เป็นเวลา 1, 5, 10 และ 20 นาที ตามลำดับ และทดสอบด้วยเทคนิค spectrophotometry เพื่อหาค่าสี โดยใช้การวัดสีในระบบ CIELAB เพื่อวัดค่า L*, a*, b* ซึ่งใช้โปรแกรมทางคอมพิวเตอร์ช่วยในการคำนวณ และหาความแตกต่างโดยรวมของสี



ภาพ 24 แผนผังการศึกษาเวลาที่เหมาะสมต่อการเปลี่ยนสีของตัวชี้วัดที่พัฒนาขึ้น ในแนวทางที่ 2

4. การศึกษาความเสถียรของสีของตัวชี้วัดที่พัฒนาขึ้น

ภาพ 25 แผนผังการศึกษาความเสถียรของสีของตัวชี้วัดที่พัฒนาขึ้น

ขั้นตอนวิธีการทดสอบความเสถียรของสีของตัวชี้วัดที่พัฒนาขึ้นต่ออุณหภูมิและแสง ซึ่งมีวิธีการทดลองดังต่อไปนี้

นำเม็ดสารประกอบสารแอนโธไซยานินส์-ไคโตซานที่ได้ มาแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ pH 4.5 และ 5.0 10 มิลลิลิตร เป็นระยะเวลาที่เหมาะสม จากนั้นนำเม็ดไคโตซานที่ได้ไปทดสอบ ณ สภาวะต่างๆ คือ ที่อุณหภูมิ 0 °C, อุณหภูมิห้อง, อุณหภูมิ 40 °C, ภายใต้สภาวะแสงฟลูออเรสเซนต์ และไม่มีสภาวะแสงฟลูออเรสเซนต์ ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำเม็ดสารประกอบแอนโธไซยานินส์-ไคโตซานที่ผ่านการทดสอบทั้งหมดมาทดสอบด้วยเทคนิค spectrophotometry เพื่อหาค่าสี โดยใช้การวัดสีในระบบ CIELAB เพื่อวัดค่า L*, a*, b* ซึ่งใช้โปรแกรมทางคอมพิวเตอร์ช่วยในการคำนวณ และหาความแตกต่างโดยรวมของสี