

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุดิบ

ผักโขม

ผักโขมพันธุ์ผัก ชนิด *Amaranthus tricolor* แบบใบสีเขียว อายุ 15-30 วัน ปลูกบริเวณพื้นที่เขตตลิ่งชัน กทม. และจังหวัดนครปฐม โดยซื้อจากตลาดสามย่าน เขตปทุมวัน กทม. เลือกส่วนใบ, ก้านใบ และยอดอ่อน เท่านั้น มาใช้ในการผลิตเป็นผลิตภัณฑ์

เครื่องปรุง

เกลือป่น ผสมไอโอดีน ตราปรุงทิพย์ ประกอบด้วย เกลือแกง 99.9% และไอโอดีน 0.005% (บริษัท อุตสาหกรรมเกลือบริสุทธิ์ จำกัด)

ซีอิ๊วขาว สูตร 1 ตราเด็กสมบุญ ประกอบด้วย ถั่วเหลืองสกัด 62%, แป้งสาลี 22%, น้ำเกลือ 11% และน้ำตาล 4.9% ไม่ใส่สารกันบูด (บริษัท หยั่นหว่านหยุ่น จำกัด)

น้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์ ตรามิตรผล (บริษัท รวมเกษตรกรรมอุตสาหกรรม จำกัด)

น้ำมันพืช ตราอรุณ ประกอบด้วย น้ำมันถั่วเหลืองผ่านกรรมวิธี 100% ไม่ใส่สารกันหืน (บริษัท น้ำมันพืชไทย จำกัด, มหาชน)

พริกไทยป่น ตรามือที่ 1 ชนิดขาว (บริษัท ง่วนสุน จำกัด)

pre-gelatinized tapioca starch (บริษัท โพเทินเซียล มาร์เก็ตติ้ง จำกัด)

3.2 อุปกรณ์

3.2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบของผักโขม

proximate analysis

เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler-Toledo, AB204)

ชุดวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Buchi, B-324)

hot air oven (Memmert, model 600)

hot plate (E.G.O., 12670)

muffle furnace (Carbolite, CWF-1200)

การวิเคราะห์ปริมาณ calcium

กระดาษกรอง Whatman no.1

เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler-Toledo, AB204)

centrifuge (Thermo IEC, IEC multi RF)

muffle furnace (Carbolite, CWF-1200)

water bath (Memmert, W-350)

การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินเอ

เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler-Toledo, AB204)

แผ่นกรอง nylon ขนาด pore size 0.45 μm

High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ของบริษัท IQA-Norwest Labs

จำกัด ประกอบด้วย

autosampler (Waters, 717)

column ODS-3 C₁₈ 5 μm ขนาด 4.6 x 150 mm (Inertsil)

multisolvent delivery system (Waters, 600E)

UV detector (Waters)

rotary evaporator (Eyela, N-N Series)

shaker (Thermolyne)

spectrophotometer (PerkinElmer Instrument, Lambda 25)

การวิเคราะห์ปริมาณ oxalate

เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler-Toledo, AB204)

blender (SHARP, EM-11)

centrifuge (Thermo IEC, IEC multi RF)

crucible sinter glass no.4

suction pump (GAST, G21DX)

universal pH paper (MERCK)

water bath (Memmert, W-350)

การวิเคราะห์ปริมาณ nitrate

กระดาษกรอง Whatman no.1

กระดาษกรอง Whatman no.42

เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler-Toledo, AB204)

เครื่องร่อนแยกขนาด (Orto Alresa)

ชุดกลั่น Kjeldahl (Gerhardt)

ตะแกรงร่อน ความละเอียด 0.5 mm

centrifuge (Thermo IEC, IEC multi RF)
 digestion flask ขนาด 500 ml
 glass bead
 hot air oven (Memmert, model 600)
 iodine flask ขนาด 125 ml
 shaker (Thermolyne)
 spectrophotometer (PerkinElmer Instrument, Lambda 25)

3.2.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการแปรรูปผลิตภัณฑ์

เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Sartorius)
 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler-Toledo, AB204)
 เครื่องปิดผนึกถุงด้วยความร้อน (Sea Master)
 ตู้เย็น (SHARP, TH-8903)
 ภาชนะ stainless steel หนา 0.5 mm แบบมีรูพรุนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 mm
 ถุง laminate OPP 20 / PE 20 / Aluminum / PE 35 ขนาด 75 x 100 mm ระบาย seal
 จากขอบ 7 mm (บริษัท สตรองแพ็ค จำกัด, มหาชน)
 ถุง PP ขนาด 5 x 8 นิ้ว (บริษัท กรุงเทพพลาสติก จำกัด)
 พิมพ์อลูมิเนียม ขนาด 15.5 x 21 cm
 aluminum foil กว้าง 12 นิ้ว (Diamond)
 pH meter (Horiba, F-21)
 silica gel pack ขนาด 2 g
 tray dryer (บริษัท เขียวเฮง จำกัด, รุ่น HA-100S)

3.2.3 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณสมบัติของผลิตภัณฑ์

การหา adsorption isotherm
 ขวดโหลแก้วฝาเกลียว ขนาด 16 x 16 x 16 cm
 ขาตั้ง 3 ขา stainless steel
 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler-Toledo, AB204)
 ถ้วยชั่งอลูมิเนียม
 hot air oven (Memmert, model 600)
 การวัดคุณสมบัติทางกายภาพ
 เครื่องวัด a_w (Testo Precision Humidity Measuring Instrument, model 650)

colorimeter (Minolta Chroma Meter, CR 300)

probe สำหรับวัดค่า tensile strength (Tensile Grip, model ATG)

texturometer (Stable Micro System Texture Analyzer, TA-xT2i)

vernier (Kanon, LSM-150)

การวิเคราะห์คุณสมบัติทางจุลินทรีย์

เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler-Toledo, AB204)

เตาอบไมโครเวฟ (Daewoo, KOR-63D7)

autoclave (Tomy, SS-320)

blender (SHARP, EM-11)

colony counter (Gallenkamp)

hot air oven (Mettmert, model 600)

incubator (WTC Binder)

pH meter (Cyberscan, model 1000)

stomacher (AES Laboratories)

3.3 สารเคมี

3.3.1 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบของผักโขม

proximate analysis

boric acid (A.R.)

catalyst-selenium mixture (A.R.)

ethanol (A.R.)

methyl red-methylene blue indicator (A.R.)

sodium hydroxide (A.R.)

sulfuric acid (A.R.)

การวิเคราะห์ปริมาณ calcium

acetic acid (A.R.)

ammonium hydroxide (A.R.)

ammonium oxalate (A.R.)

ethanol (A.R.)

hydrochloric acid (A.R.)

methyl red (A.R.)

potassium permanganate	(A.R.)
sodium oxalate	(A.R.)
sulfuric acid	(A.R.)
การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินเอ	
acetonitrile	(HPLC grade)
β -carotene standard	(A.R.)
dichloromethane	(A.R.)
ethanol	(A.R.)
methanol	(HPLC grade)
n-hexane	(A.R.)
tetrahydrofuran	(HPLC grade)
การวิเคราะห์ปริมาณ oxalate	
acetic acid	(A.R.)
ammonium hydroxide	(A.R.)
calcium chloride	(A.R.)
calcium oxalate	(A.R.)
capryl alcohol (octanol)	(A.R.)
glacial acetic acid	(A.R.)
hydrochloric acid	(A.R.)
phosphoric acid	(A.R.)
potassium permanganate	(A.R.)
sodium acetate	(A.R.)
sodium oxalate	(A.R.)
sodium tungstate	(A.R.)
sulfuric acid	(A.R.)
การวิเคราะห์ปริมาณ nitrate	
3,4-dimethyl phenol	(A.R.)
potassium nitrate	(A.R.)
sodium hydroxide	(A.R.)
sulfuric acid	(A.R.)

3.3.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณสมบัติของผลิตภัณฑ์

การหา adsorption isotherm	
lithium chloride	(Lab grade)
magnesium chloride	(A.R.)
potassium acetate	(Lab grade)
potassium carbonate	(Lab grade)
potassium chloride	(A.R.)
potassium nitrate	(A.R.)
sodium bromide	(A.R.)
sodium chloride	(A.R.)
sodium nitrite	(A.R.)
toluene	(A.R.)

การวิเคราะห์คุณสมบัติทางจุลินทรีย์

dichloran rose bengal chloramphenical (DRBC) agar	
peptone	
plate count agar	
potassium dihydrogen phosphate	(A.R.)
sodium hydroxide	(A.R.)

3.4 วิธีทดลอง

3.4.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบของผักโขม

ทำการวิเคราะห์เฉพาะองค์ประกอบที่สำคัญ ประกอบด้วย การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น, โปรตีน, crude fiber และ calcium ตามวิธีของ AOAC (1995) (รายละเอียดในภาคผนวก ก.1 ถึง ก.4) ปริมาณวิตามินเอ (β -carotene) โดยใช้ HPLC ตามวิธีของ Schüep และ Schierle (1997) (รายละเอียดในภาคผนวก ก.5) และวิเคราะห์ปริมาณ oxalate และ nitrate ตามวิธี calcium precipitation method ของ Baker (1952) และวิธี nitroxyleneol method ของ Heisler (1973) ตามลำดับ (รายละเอียดในภาคผนวก ก.6 และ ก.7)

3.4.2 การกำจัด nitrate และ oxalate ในผักโขม

ใช้วิธีของ Pingle และ Ramasastri (1978) คือ ต้มผักโขมในน้ำ ปริมาณน้ำ 15 เท่าของน้ำหนักผักเป็นเวลา 15 นาที แล้วทิ้งน้ำที่ต้ม โดยใส่ผักลงไปเมื่อน้ำเดือดแล้ว ผักที่ต้มแล้วนำมา

วิเคราะห์ปริมาณ oxalate และ nitrate ตามวิธีของ Baker (1952) และ Heisler (1973) ตามลำดับ วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design ทำการทดลอง 2 ซ้ำ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS

3.4.3 การวิเคราะห์คุณสมบัติของผลิตภัณฑ์สาหร่ายปรุงรสอบแห้ง

เลือกผลิตภัณฑ์สาหร่ายปรุงรสอบแห้งที่มีจำหน่ายอยู่ตามท้องตลาดทั่วไปมาวิเคราะห์ โดยเลือกเฉพาะที่ใช้สำหรับบริโภคเป็นขนมขบเคี้ยว มีลักษณะเป็นแผ่นสี่เหลี่ยมผืนผ้าเท่านั้น (ไม่รวมแบบที่เป็นเส้น) เพื่อใช้เป็นตัวแทนเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ผักโขมปรุงรสอบแห้งที่จะผลิตต่อไป การวิเคราะห์ประกอบด้วย ปริมาณความชื้นตามวิธีของ AOAC (1995) วัดค่า a_w โดยใช้เครื่องวัด a_w (Testo, model 650) หา adsorption isotherm ตามวิธีของ McLaughlin และ Magee (1998) (รายละเอียดในภาคผนวก ก.8) วัดสีด้วยเครื่อง chromameter (Minolta, CR-300) ในระบบ CIE L^*a^*b วัดค่า tensile strength ด้วยเครื่อง texturometer (Stable Micro System, TA-xT2i) (รายละเอียดในภาคผนวก ก.9) และวัดความหนาของชั้นผลิตภัณฑ์ด้วย vernier (Kanon, LSM-150)

3.4.4 การพัฒนาผลิตภัณฑ์

3.4.4.1 การพัฒนาขั้นตอนการขึ้นรูปเป็นแผ่น

เพื่อหาขั้นตอนและวิธีการที่เหมาะสมในการเตรียมผักโขม ที่ผ่านการต้มมาแล้วด้วยวิธี ตามข้อ 3.4.2 ให้อยู่ในรูปของเหลวข้นหนืด (paste) ที่มีความหนืดพอเหมาะในการเกลี่ยลงบน ถาดสำหรับอบแห้ง และให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้หลังจากอบแห้งแล้ว มีลักษณะเป็นแผ่นบางยืดเกาะกันดี และมีความหนาของแผ่น ใกล้เคียงกับกับผลิตภัณฑ์สาหร่ายปรุงรสอบแห้ง

3.4.4.2 การพัฒนาขั้นตอนการอบแห้ง

การอบแห้งใช้วิธี conventional air dry ด้วย tray dryer เพื่อหาอุณหภูมิและเวลา รวมทั้ง ขั้นตอนที่เหมาะสมในการอบแห้ง ให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีปริมาณความชื้น, ค่า water activity และค่า tensile strength ใกล้เคียงกับผลิตภัณฑ์สาหร่ายปรุงรสอบแห้ง โดยปริมาณความชื้นวิเคราะห์ ตามวิธี AOAC (1995) ค่า water activity วัดด้วยเครื่องวัด a_w (Testo, model 650) และค่า tensile strength วัดด้วยเครื่อง texturometer (Stable Micro System, TA-xT2i) รวมทั้งหา drying curve สำหรับการอบแห้งผลิตภัณฑ์ผักโขม

3.4.4.3 การพัฒนาสูตรของผลิตภัณฑ์

เครื่องปรุงรสที่เลือกใช้ในผลิตภัณฑ์จะคล้ายกับในผลิตภัณฑ์สาหร่ายปรุงรสอบแห้ง ประกอบด้วยน้ำตาล, เกลือ และซีอิ๊วขาว ใช้ mixture design ในการแปรสูตรเครื่องปรุง โดยใช้ สูตรของผลิตภัณฑ์สาหร่ายปรุงรสอบแห้ง ดังตารางที่ 3.1 เป็นสูตรต้นแบบ

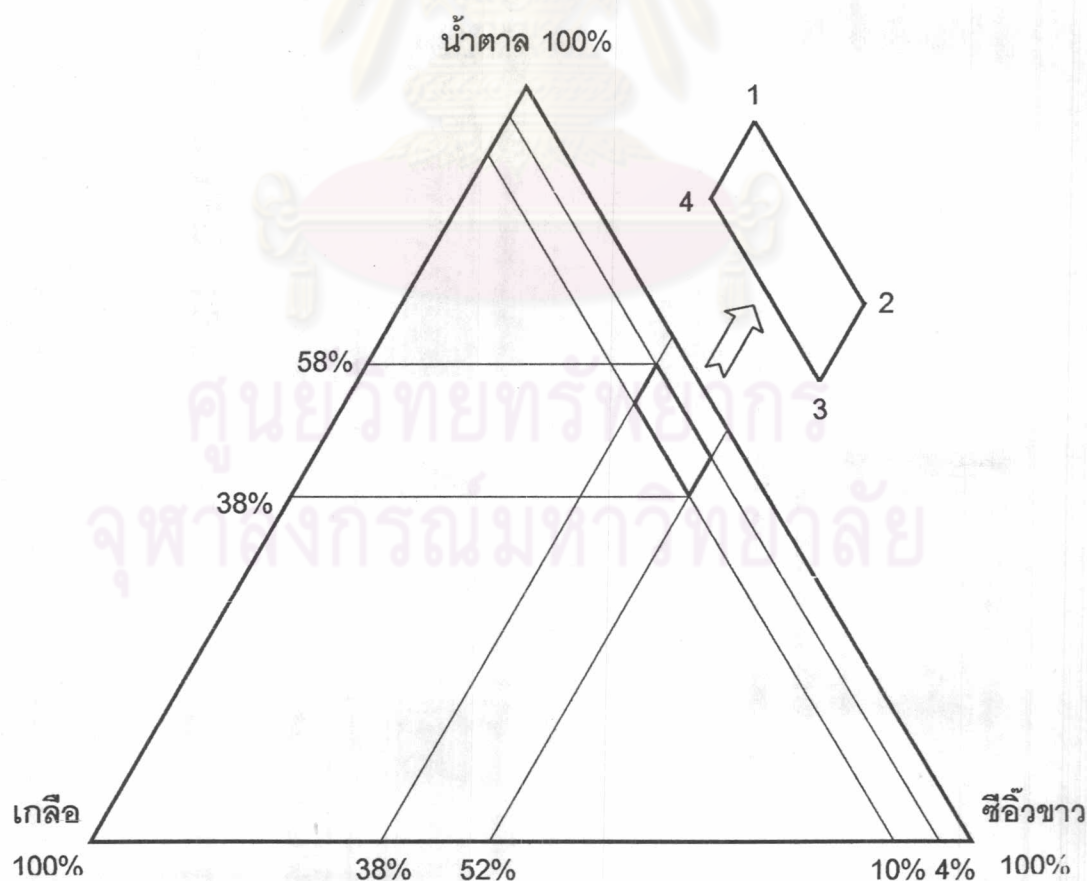
ตารางที่ 3.1 ปริมาณเครื่องปรุงรสต่างๆ ในผลิตภัณฑ์สำหรับผู้ป่วยโรคเบาหวาน

ผลิตภัณฑ์สำหรับ- ผู้ป่วยโรคเบาหวาน	เปอร์เซ็นต์ในสูตรของผลิตภัณฑ์			
	น้ำตาล	เกลือ	ซีอิ๊วขาว*	เครื่องปรุงรสอื่นๆ**
ชนิดที่ 1	10.5	1.3	13	-
ชนิดที่ 2	12	3	15	-
ชนิดที่ 3	1.5	0.1	1	0.1
ชนิดที่ 4	4.5	0.5	3	1.5

* ซีอิ๊วขาวในที่นี้รวมถึงซอสถั่วเหลืองหรือซอสปรุงรสด้วย

** เครื่องปรุงรสอื่นๆ เช่น พริกป่น, ผงชูรส

จากตารางที่ 3.1 จะเห็นว่าปริมาณเครื่องปรุงรสเฉพาะในส่วนของน้ำตาล, เกลือ และซีอิ๊วขาว ในผลิตภัณฑ์สำหรับผู้ป่วยโรคเบาหวานที่มีขายในท้องตลาด จะมีค่าอยู่ในช่วง 38-58%, 4-10% และ 38-52% ตามลำดับ เมื่อให้ปริมาณเครื่องปรุงรสทั้ง 3 ชนิดรวมกันเป็น 100% และได้ช่วงที่เป็นไปได้ของปริมาณเครื่องปรุงรสทั้ง 3 ชนิดแล้ว นำไปทำ mixture design ดังรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 mixture design สำหรับการแปรรูปเครื่องปรุงรสเพื่อเติมลงในผลิตภัณฑ์

ตารางที่ 3.2 สูตรเครื่องปรุงรสสำหรับเติมลงในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ mixture design

สูตรที่	เปอร์เซ็นต์เครื่องปรุงรสแต่ละชนิด		
	น้ำตาล	เกลือ	ซีอิ้วขาว
1	58	4	38
2	44	4	52
3	38	10	52
4	52	10	38

อย่างไรก็ดีจะต้องมีการแปรปริมาณเครื่องปรุงรสรวมที่จะเติมลงไปเป็นส่วนผสมในผัก ก่อนที่จะอบแห้งอีกครั้ง ซึ่งจากการทดลองเบื้องต้นพบว่า ปริมาณเครื่องปรุงรสรวมที่เหมาะสมจะมีค่าอยู่ในช่วง 5-10% ของน้ำหนักผักที่ต้มแล้ว ดังนั้นจะแปรปริมาณเครื่องปรุงรสรวมที่จะเติมเป็น 2 ระดับ คือ 5 และ 10% โดยที่แต่ละระดับแปรสูตรเครื่องปรุงรสเป็น 4 สูตร ตามตารางที่ 3.2

เลือกสูตรเครื่องปรุงรสและปริมาณรวมที่จะเติมลงไปที่ดีที่สุดที่สุดจากการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้วยวิธี Affective test (Meiselman, 1984) โดยใช้ hedonic scale แบบ 5-point ด้วยผู้ทดสอบทั้งฝึกฝนจำนวน 15 คน (แบบทดสอบแสดงในภาคผนวก ค.1) วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design ทำการทดลอง 2 ซ้ำ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS

ขั้นตอนต่อไปเป็นการหาปริมาณพริกไทยที่เหมาะสมสำหรับเติมลงไปในการผลิตผักเพื่อปรุงแต่งกลิ่นให้หอมน่ารับประทาน ซึ่งจากการทดลองเบื้องต้นพบว่าปริมาณพริกไทยที่เหมาะสมมีค่าอยู่ในช่วง 0.2-0.6% ของน้ำหนักผักที่ต้มแล้ว ดังนั้นจะแปรปริมาณพริกไทยที่จะเติมเป็น 3 ระดับ คือ 0.2, 0.4 และ 0.6% เลือกปริมาณพริกไทยที่ดีที่สุดจากการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้วยวิธี affective test โดยใช้ hedonic scale แบบ 5-point ด้วยผู้ทดสอบทั้งฝึกฝนจำนวน 15 คน (แบบทดสอบแสดงในภาคผนวก ค.2) วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design ทำการทดลอง 2 ซ้ำ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS

3.4.5 การวิเคราะห์คุณสมบัติของผลิตภัณฑ์

ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากข้อ 3.4.4 นำไปวิเคราะห์องค์ประกอบ คือ ปริมาณโปรตีน, crude fiber และ calcium ตามวิธีของ AOAC (1995) ปริมาณวิตามินเอโดยใช้ HPLC ตามวิธีของ Schüep และ Schierle (1997) เปรียบเทียบค่าที่วิเคราะห์ได้กับค่าของผักโขมที่เป็นวัตถุดิบ วางแผนการ

ทดลองแบบ Completely Randomized Design ทำการทดลอง 2 ซ้ำ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS

วิเคราะห์ปริมาณ oxalate และ nitrate ตามวิธีของ Baker (1952) และ Heisler (1973) ตามลำดับ เปรียบเทียบค่าที่วิเคราะห์ได้กับค่าของผักโขมที่ผ่านการต้มมาแล้วด้วยวิธีตามข้อ 3.4.2 วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design ทำการทดลอง 2 ซ้ำ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS

วิเคราะห์ปริมาณความชื้นตามวิธีของ AOAC (1995) วัดค่า a_w โดยใช้เครื่องวัด a_w (Testo, model 650) วัดสีด้วยเครื่อง chromameter (Minolta, CR-300) ในระบบ CIE L^*a^*b วัดค่า tensile strength ด้วยเครื่อง texturometer (Stable Micro System, TA-xT2i) และวัดความหนาของชั้นผลิตภัณฑ์ด้วย vernier (Kanon, LSM-150) เปรียบเทียบค่าที่วัดได้กับค่าของผลิตภัณฑ์สาหร่ายปรุงรสอบแห้ง วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design ทำการทดลอง 2 ซ้ำ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS และหา adsorption isotherm ตามวิธีของ McLaughlin และ Magee (1998) เทียบกับผลิตภัณฑ์สาหร่ายปรุงรสอบแห้ง

จากนั้นวิเคราะห์คุณสมบัติทางจุลินทรีย์ โดยวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด และปริมาณยีสต์และรา ตามวิธีของ FDA BAM (1998) (รายละเอียดในภาคผนวก ข.1 และ ข.2)

3.4.6 การศึกษาอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากข้อ 3.4.4 มาบรรจุในถุง laminate OPP 20 / PE 20 / Aluminum / PE 35 แล้วบรรจุในถุง PP เป็นชั้นที่ 2 พร้อมทั้งใส่ silica gel pack สำหรับดูดความชื้นลงไปด้วย จากนั้นเก็บที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30°C)

สุ่มตัวอย่างทุกๆ 15 วัน เป็นระยะเวลา 3 เดือน นำมาวิเคราะห์ปริมาณความชื้นตามวิธีของ AOAC (1995) วัดค่า a_w โดยใช้เครื่องวัด a_w (Testo, model 650) วัดสีด้วยเครื่อง chromameter (Minolta, CR-300) ในระบบ CIE L^*a^*b วัดค่า tensile strength ด้วยเครื่อง texturometer (Stable Micro System, TA-xT2i) วิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ตรวจหายีสต์และรา ตามวิธีของ FDA BAM (1998) วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design ทำการทดลอง 2 ซ้ำ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS

ทดสอบทางประสาทสัมผัสด้วยวิธี Affective test (Meiselman, 1984) โดยใช้ hedonic scale แบบ 5-point ด้วยผู้ทดสอบกึ่งฝึกฝนจำนวน 15 คน (แบบทดสอบแสดงในภาคผนวก ค.3) วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design ทำการทดลอง 2 ซ้ำ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS