บทที่ 3

การทดลอง

3.1 การหาวิธีที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินเอ

ตัวแปรทางจลนพลศาสตร์การสลายตัวของวิตามินเอเมื่อผ่านกระบวนการให้ความร้อนนั้น คำนวณได้จากข้อมูลปริมาณวิตามินเอเริ่มต้นและที่เหลือเมื่อตัวอย่างผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิและเวลาต่าง ๆ กัน ซึ่งการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินเอจะต้องมีความแม่นยำและเหมาะสมกับตัวอย่าง (44) วิธีวิเคราะห์ปริมาณวิตามินเอที่นำมาศึกษามี 2 วิธี คือ Carr-Price Method และเทคนิคของ HPLC

3.1.1 Carr-Price Method

ขั้นตอนการวิเคราะห์(4,27) รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ก.1

3.1.2 เทคนิคของ High Performance Liquid Chromatography

การวิเคราะห์โดยวิธีนี้ ได้แยกศึกษาเป็น 2 ขั้นตอนคือ เตรียมตัวอย่างและการหาภาวะของเครื่อง HPLC ในการแยกและหาปริมาณวิตามินเอ

3.1.2.1 การเตรียมตัวอย่าง

วิธีการเตรียมตัวอย่างสำหรับเครื่อง HPLC ที่นำมาศึกษามี 2 วิธี คือ วิธีตกตะกอน(30) และวิธีสกัด(34) รายละเอียดการวิเคราะห์แสดงในภาคผนวก ก.2 และ ก.3 ตามลำดับ

3.1.2.2 การหาภาวะที่เหมาะสมในการสกัด

ปริมาตรของไดเอทิลอีเทอร์ที่ใช้ในการสกัด วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ (triplicate analysis) ระดับที่ศึกษาได้แก่ 50, 70, 85 และ 100 มิลลิลิตร สำหรับตัวอย่างวิตามินเอ

ปาล์มิเตต (vitamin A palmitate) ปริมาตร 50 และ 100 มิลลิลิตร สำหรับตัวอย่างตับหมูสด

ความเข้มข้นของสารละลายโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ระดับที่ศึกษาได้แก่ 1 %, 3 % และ 5 % ตัวอย่างวิตามินเอปาล์มิเตต

ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมคลอไรด์ วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ระดับที่ศึกษาได้แก่ 0 %, 1 %, 5 % และ 10 % ตัวอย่างวิตามินเอปาล์มิเตต

3.1.2.3 การหาระบบ mobile phase ในการแยกวิตามินเอ

เครื่องที่ใช้เป็น High Performance Liquid Chromatography ของบริษัท Pye Unicam Ltd.; A Scientific Instrument Company of Philips ซึ่งประกอบด้วย Video Chromatography Control Centre รุ่น PU 4850, UV detector รุ่น PU 4020 ที่ความยาวคลื่น 325 นาโนเมตร, pump รุ่น PU 4010 และ LC interface รุ่น 4895 ร่วมกับคอลัมน์ Lichrospher 100 RP-18 (5μm) ของ E.Merck มีความยาว 250.00 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 4.00 มิลลิเมตร

ระบบที่ใช้ คือ เมทิลแอลกอฮอล์ และ น้ำ อัตราส่วนที่ศึกษาได้แก่ เมทิลแอลกอฮอล์ : น้ำ เท่ากับ 87 : 13, 88 : 12, 90 : 10 และ 98 : 2 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ที่อัตราการไหล (flow rate) 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที

3.2 การหาค่าตัวแปรทางจลนพลศาสตร์

3.2.1 การเตรียมตัวอย่าง

นำตับหมูสดมาแช่เย็นจนอุณหภูมิประมาณ 1 องศาเซลเซียส แยกเนื้อเยื่อเกี่ยวพันออก หั่นเป็นลูกบาศก์ขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร บรรจุด้วยระบบสุญญากาศในถุงพลาสติกชนิด OPP/PE ถุงละประมาณ 150-200 กรัม แล้วแช่แข็งด้วย plate freezer ที่ -30 องศาเซลเซียสนาน 1 ชั่วโมง ห่อด้วยอลูมินัมเปลว เก็บที่อุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียส

งานวิจัยนี้มุ่งศึกษาการสลายตัวของวิตามินเอในตับหมูสด ตับหมูสดที่ปรับปริมาณไขมัน ปริมาณความชื้น ตับหมูสดที่เติมเกลือไนเตรต และผลิตภัณฑ์ตับบด ซึ่งแต่ละตัวอย่างมีวิธีเตรียมที่แตกต่างกัน ดังนี้

ตับหมูสด นำตับหมูสดแช่แข็งมาละลายผลึกน้ำแข็งที่อุณหภูมิห้อง แล้วบดละเอียดด้วยเครื่องปั่นไฟฟ้า Moulinex type 241 ดูดฟองอากาศออกด้วยเครื่องปิดผนึกระบบสุญญากาศของบริษัท MULTIVAC รุ่น AG 500 ประเทศเยอรมันตะวันตก

ตับหมูสดที่ปรับปริมาณไขมัน นำตับหมูสดที่บดละเอียดและดูดฟองอากาศออกแล้วมาปรับปริมาณไขมันโดยผสมกับน้ำ และน้ำมันหมูตามตารางที่ 3.1 เพื่อให้ตัวอย่างมีปริมาณไขมันตามต้องการและมีปริมาณความชื้นเท่ากับในตับหมูสด ผสมให้เข้ากันและดูดฟองอากาศออก

ตับหมูสดที่ปรับปริมาณความชื้น นำตับหมูสดที่บดละเอียดและดูดฟองอากาศออกแล้วมาปรับปริมาณความชื้นโดยผสมกับน้ำ น้ำมันหมูและเคซีน (Lab Grade ของ E.Merck) ตามตารางที่ 3.2 เพื่อให้ตัวอย่างมีปริมาณความชื้นตามต้องการ และมีปริมาณไขมันเท่ากับในตับหมูสด ผสมให้เข้ากันและดูดฟองอากาศออก

ตับหมูสดที่เติมเกลือไนเตรต นำตับหมูสดที่บดละเอียดและดูดฟองอากาศออก แล้วเติมโปตัสเซียมไนเตรต (GR Grade ของ E.Merck) 250 ppm และ 500 ppm ตามลำดับ ผสมให้เข้ากันและดูดฟองอากาศออก

ผลิตภัณฑ์ตับบด นำตับหมูสดที่บดละเอียดและดูดฟองอากาศออกแล้วผสมกับส่วนผสมอื่น ๆ ตามตารางที่ 3.3 ผสมส่วนประกอบต่าง ๆ ให้เข้ากันและดูดฟองอากาศออก

ตารางที่ 3.1 ส่วนผสมของตัวอย่างที่ปรับปริมาณไขมัน

ส่วนผสม	ร้อยละของไขมัน (โดยประมาณ)	
	10	15
ตับหมูสด (กรัม)	100	100
น้ำมันหมู (กรัม)	10	25
น้ำกลั่น (กรัม)	26	64

ตารางที่ 3.2 ส่วนผสมของตัวอย่างที่ปรับปริมาณความชื้น

ส่วนผสม	ร้อยละของความชื้น (โดยประมาณ)		
	50	60	70
ตับหมูสด (กรัม)	100	100	100
เคซีน (กรัม)	52	52	52
น้ำมันหมู (กรัม)	1.9	3.5	7.0
น้ำกลั่น (กรัม)	0	40	133

แบ่งตัวอย่างออกเป็น 2 ส่วน โดยการสุ่ม

ส่วนที่ 1 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในตัวอย่างได้แก่ ปริมาณความชื้น ปริมาณไขมัน(45) และวัดพีเอชโดยใช้เครื่องวัดพีเอช ของบริษัท Radio Meter รุ่น PHM 83

ส่วนที่ 2 บรรจุในหลอดแก้ว pyrex ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 3 มิลลิเมตร หนา 1 มิลลิเมตร ยาว 100 มิลลิเมตร จนมีที่ว่างเหนือตัวอย่างประมาณ 4 เซนติเมตร ไล่อากาศในหลอดที่อยู่เหนือตัวอย่างออกโดยใช้ความร้อนเพื่อให้เกิดภาวะสุญญากาศ (4) ปิดหลอดโดยเปลวไฟ สำหรับตับหมูสดแบ่งตัวอย่างโดยการสุ่มออกเป็น 7 ชุด ชุดละ 15 หลอด ตัวอย่างอื่น ๆ แบ่งตัวอย่างโดยการสุ่มออกเป็น 3 ชุด ชุดละ 12 หลอด ห่อตัวอย่างทั้งหมดด้วยอลูมินัมเปลวและเก็บที่ -10 องศาเซลเซียสเพื่อรอการให้ความร้อน

ตารางที่ 3.3 ส่วนประกอบของตับบดตามสูตรของกรมปศุสัตว์

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (กรัม)
ตับหมูสด	100
เนื้อหมูปนมัน	100
มันหมู	50
เกลือ	4.5
พริกไทย	0.5
ขิง	0.125
ลูกจันทน์	0.125
พริกป่น	0.125
อบเชย	0.05
ผงเพรก*	0.25

* ชื่อทางการค้าของของผสมระหว่าง $NaNO_2$ และ NaCl

3.2.2 การวัดอุณหภูมิ

วัดอุณหภูมิภายในหลอดทดลองโดยใช้ Copper/Constantan Thermocouple ต่อเข้ากับเครื่องบันทึกอุณหภูมิและเวลาแบบตัวเลข (Procos VII,CHINO, Japan) เครื่องจะบันทึกอุณหภูมิและเวลาลงบนกระดาษพิมพ์ด้วยระบบอัตโนมัติตามโปรแกรมที่จัดให้

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2.3 การให้ความร้อน

ใช้อ่างน้ำมัน (oil bath) ซึ่งประกอบด้วยหน่วยให้ความร้อน (heating unit) ที่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ในช่วง $\pm$ 0.4 องศาเซลเซียส และใบพัดซึ่งจะกวนน้ำมันให้เกิดการหมุนเวียนช่วยให้ความร้อนถ่ายเทไปเท่า ๆ กันทุกจุดในอ่างน้ำมัน

ก่อนทำการทดลองต้องอบที่เสียบหลอดทดลองให้มีอุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิของน้ำมันที่ต้องการทดลองเพื่อควบคุมอุณหภูมิภายในอ่างน้ำมันให้คงที่ ตัวอย่างที่จะทดลองต้องนำมาทำให้หลอมจนถึงอุณหภูมิห้องก่อน เก็บตัวอย่างส่วนหนึ่งเข้าตู้แช่แข็งสำหรับเป็น ตัวอย่างควบคุม (control) นำส่วนที่เหลือมาให้ความร้อนในอ่างน้ำมันโดยอุณหภูมิภายในหลอดจะสูงขึ้นจนถึงอุณหภูมิที่ต้องการอย่างรวดเร็ว(4) เริ่มจับเวลาเมื่ออุณหภูมิภายในหลอดทดลองสูงถึงอุณหภูมิที่ต้องการ ซึ่งใช้เวลาประมาณ 30 ถึง 60 วินาทีขึ้นกับระดับของอุณหภูมิที่ศึกษา ตัวอย่างที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อนจนได้เวลาที่ต้องการจะถูกดึงขึ้นจากอ่างน้ำมันโดยการสุ่มคราวละ 3 หลอด และทำให้เย็นทันทีโดยการแช่น้ำแข็ง เมื่อหลอดเย็นล้างคราบไขมันออก ห่อหลอดด้วยอลูมินัมเปลวแล้วนำไปแช่แข็งที่ -10 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินเอที่เหลือต่อไป ตัวอย่างควบคุมซึ่งไม่ผ่านความร้อนก็เก็บในลักษณะเดียวกับตัวอย่างที่ผ่านความร้อน

3.2.4 อุณหภูมิและช่วงเวลาในการให้ความร้อน

อุณหภูมิและเวลาในการให้ความร้อนแก่ตัวอย่างต่าง ๆ แสดงในตารางที่ 3.4-3.9

ตารางที่ 3.4 อุณหภูมิและช่วงเวลาในการศึกษาการสลายตัวของวิตามินเอในตับหมูสด

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)		ช่วงเวลา (นาที)			
ต่ำ	70	210	420	600	900
	80	210	420	600	900
	90	180	360	540	750
	100	45	90	120	150
สูง	110	30	45	60	90
	120	10	25	40	60
	130	10	20	30	40

ตารางที่ 3.5 อุณหภูมิและช่วงเวลาในการศึกษาการสลายตัวของวิตามินเอในตับหมูสดที่ปรับปริมาณไขมัน

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ช่วงเวลา (ชั่วโมง)		
80	10	20	30
100	2	5	8
120	1	2	3

ตารางที่ 3.6 อุณหภูมิและช่วงเวลาในการศึกษาการสลายตัวของวิตามินเอในตับหมูสดที่ปรับปริมาณความชื้น

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ช่วงเวลา (นาที)		
80	300	600	900
100	40	80	120
120	10	25	40

ตารางที่ 3.7 อุณหภูมิและช่วงเวลาในการศึกษาการสลายตัวของวิตามินเอในตับหมูสดที่เติมเกลือไนเตรต 250 ppm

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ช่วงเวลา (นาที)		
80	300	660	1080
100	50	100	150
120	10	25	40

ตารางที่ 3.8 อุณหภูมิและช่วงเวลาในการศึกษาการสลายตัวของวิตามินเอในตับหมูสดที่เติมเกลือไนเตรต 500 ppm

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ช่วงเวลา (ชั่วโมง)		
80	10	20	30
100	2	5	8
120	1	2	3

ตารางที่ 3.9 อุณหภูมิและช่วงเวลาในการศึกษาการสลายตัวของวิตามินเอในผลิตภัณฑ์ตับบด

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ช่วงเวลา (ชั่วโมง)		
80	10	20	30
100	2	5	8
120	1	2	3

3.2.5 การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินเอ

วิเคราะห์ปริมาณวิตามินเอโดยใช้เทคนิค Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography ตามวิธีที่เลือกจากหัวข้อ 3.1 รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ก.4

คำนวณปริมาณวิตามินเอในรูป trans retinol โดยเทียบกับกราฟมาตราฐานของเรตินิลอะซิเตต (Biochemistry Grade ของ E.Merck)