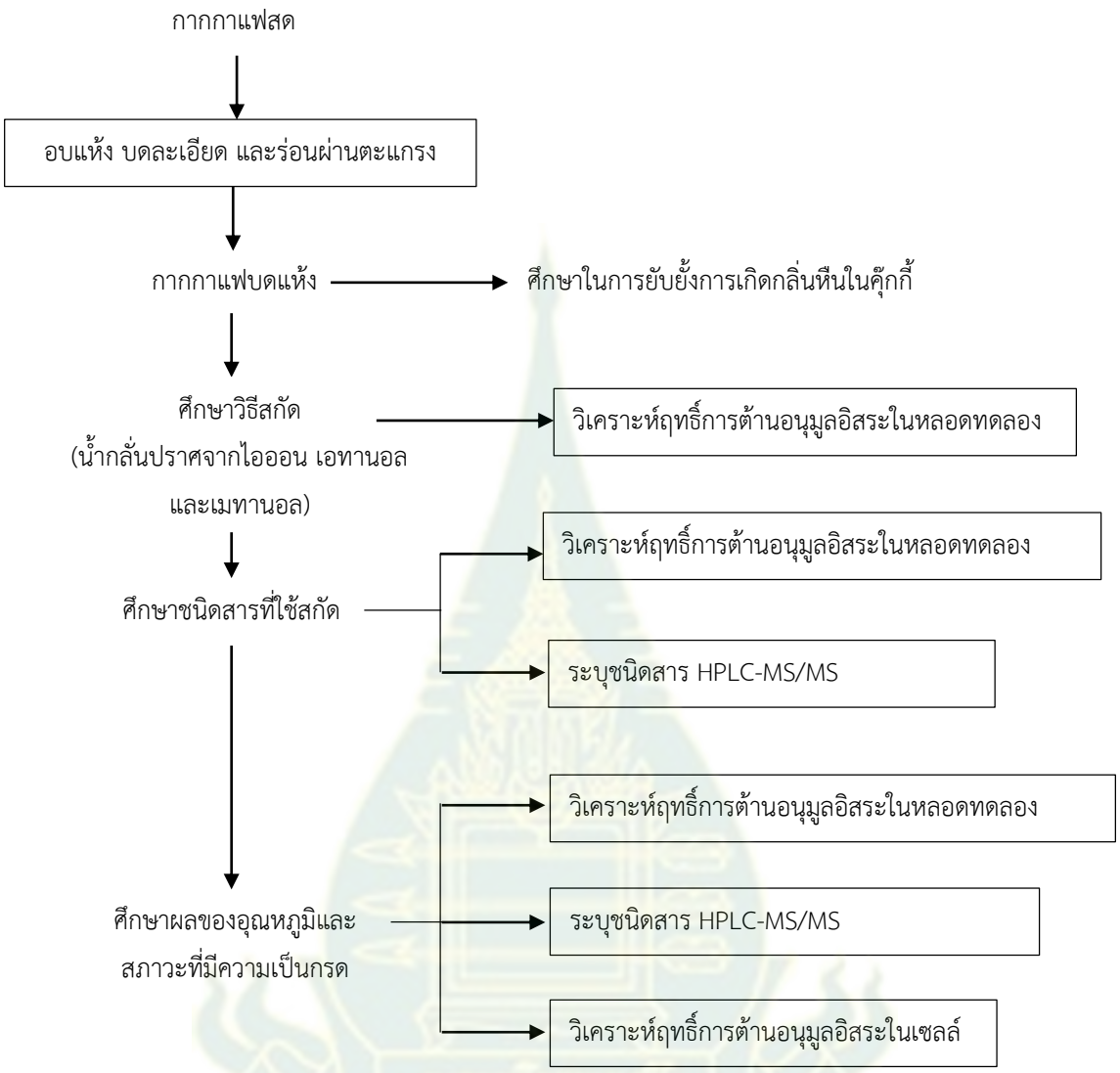
บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

การวิจัยเป็นงานวิจัยเชิงทดลองทางวิทยาศาสตร์ แบ่งการดำเนินการวิจัยออกเป็น 5 ส่วนตามวัตถุประสงค์ คือ 1) การศึกษาฤทธิ์การต้านออกซิเดชันของกากกาแฟ 2) การศึกษาผลของอุณหภูมิและวิธีการแปรรูปต่อเสถียรภาพสารต้านออกซิเดชันในกากกาแฟ 3) การระบุชนิดสารที่สำคัญที่ออกฤทธิ์การต้านออกซิเดชันในกากกาแฟ 4) การศึกษาฤทธิ์การต้านออกซิเดชันในเซลล์ของสารสกัดจากกากกาแฟ และ 5) การศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของลิพิดในอาหาร

โดยการวิจัยเริ่มต้นจากการเตรียมกากกาแฟบดแห้ง โดยนำกากกาแฟสด อบแห้ง บดละเอียด และร่อนผ่านตะแกรงได้เป็นกากกาแฟบดแห้ง นำกากกาแฟบดแห้งสกัดสารสำคัญด้วยวิธีการต่างๆ และชนิดสารสกัด (เอทานอล เมทานอล และน้ำกลั่นปราศจากไอออน) นำสารสกัดที่ได้ศึกษาฤทธิ์การต้านออกซิเดชันของกากกาแฟ นำสารสกัดที่ได้จากวิธีการสกัดที่เหมาะสมศึกษาผลของอุณหภูมิและวิธีการแปรรูปต่อเสถียรภาพสารต้านออกซิเดชันในกากกาแฟ และระบุชนิดสารที่สำคัญที่ออกฤทธิ์การต้านออกซิเดชันในกากกาแฟด้วย HPLC-MS/MS นำสารสกัดที่ผ่านและไม่ผ่านความร้อนศึกษาวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) ด้วยวิธี DCF assay และศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของลิพิดในอาหาร แสดงดังภาพภาพที่ 3.1



ภาพที่ 3.1 ภาพรวมของวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การเตรียมตัวอย่างกากกาแฟบดแห้ง

กากกาแฟสดสายพันธุ์อาราบิก้า (*Coffea arabica*) ที่เตรียมจากกาแฟคั่วระดับปานกลาง (medium roast) ผ่านการเตรียมเป็นเครื่องดื่มกาแฟด้วยเครื่องชงเอสเพรสโซ่ (espresso machine) แรงดัน 9 บาร์ ที่อุณหภูมิน้ำ 95 องศาเซลเซียส เวลา 22 วินาที นำมาทำแห้งด้วยวิธีการอบแห้ง (hot air oven) ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จนได้ค่าความชื้นน้อยกว่า 5% จากนั้นลดขนาดตัวอย่างด้วยวิธีการบดและร่อนผ่านตะแกรงร่อนขนาด 850 μm เก็บส่วนที่ผ่านตะแกรง ส่วนนี้เรียกว่า กากกาแฟบดแห้ง นำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -18

องศาเซลเซียสจนทำการวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมี-กายภาพ และใช้เป็นตัวอย่างสกัด “สารสกัดจากกากกาแฟ”

3.2 การวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมี-กายภาพของกากกาแฟบดแห้ง

นำตัวอย่างกากกาแฟบดแห้งที่เตรียมได้วิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมี-กายภาพ ดังนี้ ค่าวอเตอร์แอกติวิตี้ ปริมาณความชื้น ปริมาณโปรตีนทั้งหมด ปริมาณไขมันทั้งหมด ปริมาณใยอาหารทั้งหมดและใยอาหารที่ไม่ละลายน้ำ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณเถ้า และปริมาณคาแฟอีน (รายละเอียดในภาคผนวก)

3.3 การสารสกัดจากกากกาแฟบดแห้งด้วยวิธีการและสารสกัดชนิดต่างๆ

นำกากกาแฟบดแห้งทำการศึกษา (1) วิธีการสกัดที่เหมาะสม โดยศึกษาวิธีการที่มีรายงานวิจัยจำนวน 5 วิธีการ ซึ่งใช้สารสกัด อุณหภูมิ วิธีการให้ความร้อน ระยะเวลา และอัตราส่วนกากกาแฟบดแห้งต่อสารสกัดที่แตกต่างกัน และ (2) สารสกัดที่เหมาะสม ประกอบด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน เอทานอล และเมทานอล ด้วยวิธีการสกัดที่เหมาะสม

3.3.1 การสกัดด้วยวิธีการต่างๆ นำกากกาแฟบดแห้งสกัดสารด้วยวิธีการต่างๆ ดังนี้ **(1)** สกัดด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน (deionized water) ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที อัตราส่วนกากกาแฟบดแห้งต่อน้ำกลั่นปราศจากไอออน คือ 1 ต่อ 10 ดัดแปลงวิธีการของ Martinez-Saez et al. (2017) **(2)** สกัดด้วยสารละลายเอทานอลที่ความเข้มข้น 20% ด้วยเครื่องไมโครเวฟ (microwave) พลังงาน 300 วัตต์ เป็นเวลา 45 วินาที อัตราส่วนกากกาแฟบดแห้งต่อสารละลายคือ 1 ต่อ 6 ดัดแปลงวิธีการของ Ranic et al. (2014) **(3)** สกัดด้วยสารละลายเอทานอลที่ความเข้มข้น 60% ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เขย่าตลอดเวลาที่ 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที อัตราส่วนกากกาแฟบดแห้งต่อสารละลายคือ 1 ต่อ 10 ดัดแปลงวิธีการของ Belviso et al. (2014) **(4)** สกัดด้วยสารละลายเมทานอลที่ความเข้มข้น 60% ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เขย่าตลอดเวลาที่ 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 90 นาที อัตราส่วนกากกาแฟบดแห้งต่อสารละลายคือ 1 ต่อ 40 ดัดแปลงวิธีการของ Mussatto et al. (2011) และ **(5)** สารละลายเมทานอลที่ความเข้มข้น 70% ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เขย่าตลอดเวลาที่ 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมง อัตราส่วนกากกาแฟบดแห้งต่อสารละลายคือ 1 ต่อ 50 ดัดแปลงวิธีการของ Moon et al. (2009)

นำตัวอย่างสารที่สกัดได้จากทั้ง 5 วิธีการ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000×g, 4 องศาเซลเซียส, เป็นเวลา 30 นาที กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman no.1 ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยชนิดตัวทำละลายที่สกัด และเก็บรักษาที่ -18 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลลิกที่สกัดได้ทั้งหมด ค่าดูดกลืนคลื่นแสงที่ 280 และ 420 นาโนเมตร และวิเคราะห์ค่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

3.3.2 การสกัดด้วยสารสกัดชนิดต่างๆ นำกากกาแฟบดแห้งสกัดด้วยสารสกัดจำนวน 3 ชนิด ประกอบด้วย **(1)** น้ำกลั่นปราศจากไอออน **(2)** สารละลายเอทานอลเข้มข้น 70% และ **(3)** สารละลายเมทานอลเข้มข้น 70% ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เขย่าตลอดเวลาที่ 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 90 นาที อัตราส่วนกากกาแฟบดแห้งต่อสารละลายคือ 1 ต่อ 50 นำตัวอย่างที่สกัดได้ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000×g, 4 องศาเซลเซียส, เป็นเวลา 30 นาที กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman no.1 ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยชนิดตัวทำละลายที่สกัด และเก็บรักษาที่ -18 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลลิกที่สกัดได้ทั้งหมด ค่าดูดกลืนคลื่นแสงที่ 280 และ 420 นาโนเมตร วิเคราะห์ค่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและระบุชนิดสารสำคัญในสารสกัดจากกากกาแฟ

3.4 วิเคราะห์ปริมาณฟีนอลลิกที่สกัดได้ทั้งหมด

นำตัวอย่างสารสกัดจากกากกาแฟวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลลิกที่สกัดได้ทั้งหมด (total extractable phenol content) ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu (FTC) โดยใช้กรดแกลลิก (gallic acid) และ chlorogenic acid (CGA) เป็นสารละลายมาตรฐาน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer

3.5 วัดค่าดูดกลืนคลื่นแสงที่ 280 และ 420 นาโนเมตร

นำตัวอย่างสารสกัดจากกากกาแฟเจือจางด้วยตัวทำละลายที่ใช้สกัดแล้ววัดค่าดูดกลืนคลื่นแสงที่ 280 และ 420 นาโนเมตรด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer

3.6 วิเคราะห์ค่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

ค่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระวิเคราะห์ด้วยวิธีต่างๆ ดังนี้

3.6.1 ABTS radical scavenging assay (ABTS) ตามวิธีการของ Re et al. (1999) อนุมูลอิสระในรูปประจุบวก $ABTS^{+}$ จากปฏิกิริยา persulphate oxidation ใช้เป็นสารละลายตั้งต้น (7 mM ABTS และ 2.45 mM potassium persulphate ใน 10mM phosphate buffer, pH 7.4) จากนั้นเจือจางสารละลายตั้งต้นก่อนการวิเคราะห์ด้วย 10mM phosphate buffer (pH 7.4) ให้ได้ค่าดูดกลืนคลื่นแสงที่ค่าความยาวคลื่น 734 นาโนเมตรคือ 0.7±0.02

นำตัวอย่างสารที่สกัดได้จากกากกาแฟบดแห้งปริมาตร 20 ไมโครลิตรผสมกับสารละลาย ABTS ปริมาตร 1,980 มิลลิลิตร บ่มในสภาวะไม่มีแสงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที และวัดค่าดูดกลืนคลื่นแสงที่ 734 นาโนเมตร ตัวอย่างควบคุมใช้ 10mM phosphate buffer (pH 7.4) ที่ไม่มี ABTS

รายงานเป็นค่า Trolox equivalent antioxidant capacity (μmol Trolox equivalents per gram dry matter, μmol Trolox/g dm)

3.6.2 DPPH radical scavenging assay (DPPH) ตามวิธีการของ Brand-Williams, Cuvelier, and Berset (1995). เตรียมอนุมูลอิสระในรูป $DPPH^{\bullet}$ ในสารละลายเอทานอลทันทีก่อนการวิเคราะห์ นำตัวอย่างสารที่สกัดได้จากกากกาแฟบดแห้งปริมาตร 500 ไมโครลิตรผสมกับสารละลาย 200μM DPPH ปริมาตร 500 มิลลิลิตร บ่มในสภาวะไม่มีแสงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที และวัดค่าดูดกลืนคลื่นแสงที่ 517 นาโนเมตร ตัวอย่างควบคุมใช้เอทานอลที่ไม่มี DPPH รายงานเป็นค่า Trolox equivalent antioxidant capacity (μmol Trolox equivalents per gram dry matter, μmol Trolox/g dm)

3.6.3 Ferric reducing antioxidant power assay (FRAP) ตามวิธีการของ Benzie and Strain (1996) วัดความสามารถในการริดิวซ์เฟอริคไอออน (Fe^{3+}) เป็นเฟอริคไอออน (Fe^{2+}) ณ สภาวะที่เป็นกรดทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อน ferrous-tripyridyltriazine complex

นำตัวอย่างสารที่สกัดได้จากกากกาแฟบดแห้งปริมาตร 100 ไมโครลิตรผสมกับสารละลาย FRAP ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร (10 parts 300mM sodium acetate buffer at pH 3.6, 1 part 10 mM TPTZ in 40 mM HCl, และ 1 part 20mM $FeCl_3 \bullet 6H_2O$) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตรด้วยเครื่อง UV-Vis Spectrophotometer ตัวอย่างควบคุมวิเคราะห์เช่นเดียวกับตัวอย่างยกเว้นไม่เติมตัวอย่าง รายงานค่าเป็น μmol Fe^{2+}/g dm

3.6.4 Metal chelating ability ตามวิธีการของ Decker and Welch (1990) ปฏิกิริยาปริมาตร 2 มิลลิตรประกอบด้วยนำตัวอย่างสารที่สกัดได้จากกากกาแฟบดแห้งปริมาตร 100 ไมโครลิตร, $FeCl_2$ 100 ไมโครลิตร, 3-(2-pyridyl)-5,6-bis (4-phenyl-sulfonic acid)-1,2,4-triazine (ferro- zine) 400 ไมโครลิตร , และน้ำกลั่นปราศจากไอออน บ่มในสภาวะไม่มีแสงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที และวัดค่าดูดกลืนคลื่นแสงที่ 562 นาโนเมตร ตัวอย่างควบคุมวิเคราะห์เช่นเดียวกับตัวอย่างยกเว้นไม่เติมตัวอย่าง รายงานค่าเป็น μmol EDTA/g dm

3.7 การศึกษาวิธีการให้ความร้อนและสภาวะที่มีความเป็นกรดต่อสารต้านออกซิเดชันในกากกาแฟ

นำสารสกัดจากกากกาแฟด้วยสารละลายเอทานอลเข้มข้น 70% ระเหยของเหลวบางส่วนด้วยเครื่องกลั่นระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสแล้วทำแห้งด้วยวิธีการระเหิดแห้ง

นำตัวอย่างระเหิดแห้ง (freeze-dried sample) ให้ความร้อนด้วยวิธีการ **(1)** อบแห้ง ด้วยตู้อบลมร้อน (hot air oven) ที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที **(2)** นึ่ง โดยนำตัวอย่างระเหิดแห้งละลายในน้ำกลั่นปราศจากไอออน จากนั้นนึ่งที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที **(3)** ต้ม เตรียมตัวอย่างดังข้อ (2) แล้วต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที **(4)** หม้อนึ่งแรงดันสูง เตรียมตัวอย่างดังข้อ (2) แล้วให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที **(5)** ไมโครเวฟ เตรียมตัวอย่างดังข้อ (2) แล้วให้ความร้อนที่ 750 W เป็นเวลา 45 วินาที เมื่อครบเวลาที่กำหนดทำให้เย็นทันที และ **(6)** ค่า pH 4.0 โดยนำตัวอย่างระเหิดแห้งละลายในน้ำกลั่นปราศจากไอออน เติมสารละลายบัฟเฟอร์ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 50mM acetate buffer (pH 4.0) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นเติมสารละลายบัฟเฟอร์ที่แช่เย็นให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 50mM phosphate buffer (pH 7.0)

นำตัวอย่างทั้งหมดปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 ×g, 4 องศาเซลเซียส, เป็นเวลา 5 นาที นำสารละลายส่วนใสวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลลิกที่สกัดได้ทั้งหมดและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

3.8 การระบุชนิดสารสำคัญในสารสกัดจากกากกาแฟ

การระบุชนิดและปริมาณสารสำคัญในสารสกัดจากกากกาแฟวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Agilent 6490 triple Quad LC/MS เชื่อมกับคอลัมน์ Zorbax SB-C18 1.8 μm column (2.1 mm i.d. × 150 mm) สาร mobile phase A คือ 0.1% formic acid และสาร mobile phase B คือ acetonitrile นำสารที่แยกได้ระบุชนิดสารด้วย parent m/z และ fragment m/z เปรียบเทียบกับ parent m/z และ fragment m/z ของสารมาตรฐานประกอบด้วย 3-caffeoylqunic acid (3-CQA), 4-caffeoylqunic acid (4-CQA), 5-caffeoylqunic acid (5-CQA), 3,4-dicaffeoylqunic acid (3,4-diCQA), 3,5-dicaffeoylqunic acid (3,5-diCQA), 4,5-dicaffeoylqunic acid (4,5-diCQA), 4-hydroxybenzoic acid, caffeic acid, *p*-coumaric acid, sinapic acid, และ ferulic acid จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณสารโดยเปรียบเทียบกับสมการเส้นตรงของสารมาตรฐาน ณ ความเข้มข้นต่าง รายงานค่าที่ได้เป็น mg/l หรือ μg/l

3.9 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในเซลล์

นำตัวสารสกัดจากกากกาแฟ และสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านวิธีการอบแห้ง (180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที) และหม้อนึ่งแรงดันสูง (อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที) ทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในเซลล์ด้วยวิธี DCF (dichlorofluorescein) assay โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ HepG2 แล้วนำเซลล์ที่ได้เติมสารดังนี้ (1) control (ไม่เติมสารทดสอบ), (2) 10 mM N-acetyl-L-cysteine (สารต้านอนุมูล

อิสระ เป็น positive control), (3) สารสกัดจากกากกาแฟที่ความเข้มข้น 0.1 mg equivalent gallic acid/ml, (4) สารสกัดจากกากกาแฟที่ความเข้มข้น 0.5 mg gallic acid equivalent/ml, (5) 10 mM hydrogen peroxide (H_2O_2), (6) 10 mM H_2O_2 และ (7) 10 mM H_2O_2 บ่มตัวอย่างเป็นเวลา 30 นาที จากนำตัวอย่างที่ (6) และ (7) เติมสารสกัดจากกากกาแฟที่ความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 mg gallic acid equivalent/ml ตามลำดับ บ่มทั้ง 7 ตัวอย่างต่อเนื่องอีก 30 นาที จากนั้นทดสอบด้วย DCF assay

3.10 ความสามารถในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของลิพิดในผลิตภัณฑ์คุ๊กกี้ที่เติมกากกาแฟบดแห้ง

3.10.1 การเตรียมผลิตภัณฑ์คุ๊กกี้ ใช้ส่วนผสมแสดงดังตารางที่ 3.1 ประกอบด้วยแป้งอเนกประสงค์ เนยเค็ม นมผง ผงฟู น้ำตาลไอซิ่ง ไข่ไก่ และกลิ่นวนิลา ปริมาณ 39.20, 26.13, 3.48, 0.26, 24.39, 6.10, และ 0.44 กรัม ตามลำดับ โดยตัวอย่าง butylated hydroxyanisole (BHA) เติม BHA ปริมาณ 0.02 กรัม และตัวอย่างกากกาแฟบดแห้ง (SCG) เติม SCG ปริมาณ 4 และ 8 กรัม หรือคิดเป็น 15% และ 30% ของน้ำหนักไขมันหรือเนยเค็มในสูตรส่วนผสม ตามลำดับ ซึ่งปริมาณกากกาแฟบดแห้งที่ใช้เป็นระดับที่มีรายงานการใช้กากกาแฟในบิสกิตที่เป็นที่ยอมรับของผู้ชิม (Martinez-Saez et al., 2017) นอกจากนี้การใช้กากกาแฟยังช่วยเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการในคุ๊กกี้อีกด้วย เนื่องจากกากกาแฟมีสารอาหารหลายชนิดโดยเฉพาะใยอาหารคงเหลืออยู่

การเตรียมให้นำเนยเค็ม BHA หรือกากกาแฟบดแห้งผสมกันก่อนเติมลงส่วนผสมอื่นๆ นำก้อนโด (dough) ที่ได้ขึ้นรูปด้วยอุปกรณ์ขึ้นรูปและอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นปล่อยให้เย็นและบรรจุในแผ่นอะลูมินัมฟลอยด์ (aluminum foil) บ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วัน

ตารางที่ 3.1 ส่วนผสมสำหรับการผลิตคุ๊กกี้

ส่วนผสม	ปริมาณ (%)			
	ตัวอย่างควบคุม	Butylated hydroxyanisole (BHA)	กากกาแฟบดแห้งเข้มข้น 4% (SCG4)	กากกาแฟบดแห้งเข้มข้น 8% (SCG8)
แป้งอเนกประสงค์	39.20	39.18	35.20	31.20
เนยเค็ม	26.13	26.13	26.13	26.13

ตารางที่ 3.1 ส่วนผสมสำหรับการผลิตคุ๊กกี้ (ต่อ)

ส่วนผสม	ปริมาณ (%)			
	ตัวอย่างควบคุม	Butylated hydroxyanisole (BHA)	กากกาแฟบดแห้งเข้มข้น 4% (SCG4)	กากกาแฟบดแห้งเข้มข้น 8% (SCG8)
กากกาแฟบดแห้ง	—	—	4	8
BHA	—	0.02	—	—
นมผง	3.48	3.48	3.48	3.48
ผงฟู	0.26	0.26	0.26	0.26
น้ำตาลไอซิ่ง	24.39	24.39	24.39	24.39
ไข่ไก่	6.10	6.10	6.10	6.10
กลิ่นวนิลา	0.44	0.44	0.44	0.44
รวม	**100**	**100**	**100**	**100**

3.10.2 การสกัดไขมัน นำตัวอย่างคุ๊กกี้บดละเอียดสกัดไขมันด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ (petroleum ether) โดยใช้สัดส่วนของตัวอย่างต่อปิโตรเลียมอีเทอร์ คือ 1 : 2.5 เขย่าตลอดเวลาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.4 นำส่วนใสที่กรองได้กำจัดสารปิโตรเลียมอีเทอร์ออกด้วยเครื่องกลั่นระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส น้ำมันที่ได้ใช้วิเคราะห์ค่า acid value และ peroxide value (รายละเอียดในภาคผนวก)

3.11 วิเคราะห์ผลทางสถิติ

ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วางแผนการวิจัยแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD) และ การทดลองแบบแฟคทอเรียล (Factorial experiment in CRD) นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan’s New Multiple Range Test (DMRT)