บทที่ 3
ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 การวางแผนการทดลอง

ใช้การวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design) โดยมีปัจจัยที่ศึกษาและจำนวนซ้ำดังแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 การวางแผนการทดลอง

ปัจจัยที่ศึกษา	ปัจจัยที่ 1 : พันธุ์ข้าว มี 9 สายพันธุ์ ได้แก่ ข้าวหอมกัญญา ข้าวสินเหล็ก ข้าวหอมมะลิแดง ข้าวหอมอุบล ข้าวหอมมะลิ 105 ข้าวสังข์หยดอุบล ข้าวหอมนิล ข้าวเหนียวดำอุบล และข้าวเหนียวเล้าแตก
	ปัจจัยที่ 2 : การหุงต้ม 1. ไม่ผ่านการหุงต้ม 2. ผ่านการหุงต้ม
จำนวนซ้ำ/ทรีทเมนต์	ทรีทเมนต์ละ 2 ซ้ำ (ทั้งหมด 9 × 2 = 18 ทรีทเมนต์)

3.2 วัตถุดิบ

วัตถุดิบ : ข้าว 9 สายพันธุ์จากโครงการข้าว 1 ไร่ 1 แสนในจังหวัดอุบลราชธานี ผลิตโดยเครือข่ายวิสาหกิจชุมชนเกษตรอินทรีย์อุบลราชธานี 52 ซึ่งได้รับการรับรองมาตรฐานการผลิตข้าวอินทรีย์ พศ. 2553 ได้แก่ ข้าวหอมกัญญา ข้าวสินเหล็ก ข้าวหอมมะลิแดง ข้าวหอมอุบล ข้าวหอมมะลิ 105 ข้าวสังข์หยดอุบล ข้าวหอมนิล ข้าวเหนียวดำอุบล และข้าวเหนียวเล้าแตก ดังแสดงในรูปที่ 3.1 ซึ่งจากลักษณะปรากฏจะสามารถแบ่งตามลักษณะเมล็ดข้าวได้เป็น 3 กลุ่ม คือ

กลุ่มเมล็ดข้าวสีดำ ได้แก่ ข้าวเหนียวดำ ข้าวหอมกัญญา และข้าวหอมนิล

กลุ่มเมล็ดข้าวสีแดง ได้แก่ ข้าวสังข์หยด และ ข้าวหอมมะลิแดง

กลุ่มเมล็ดข้าวกล้อง (ข้าวสีน้ำตาลอ่อน) ได้แก่ ข้าวหอมมะลิ 105 ข้าวเล้าแตก ข้าวสินเหล็ก และข้าวหอมอุบล

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

รูปที่ 3.1 ลักษณะปรากฏของข้าวข้าวหอมกัญญา ข้าวสินเหล็ก ข้าวหอมมะลิแดง ข้าวหอมอุบล ข้าวหอมมะลิ 105 ข้าวสังข์หยดอุบล ข้าวหอมนิล ข้าวเหนียวดำอุบล และข้าวเหนียวเล้าแตก

ข้าว 9 สายพันธุ์ของไทย ได้แก่ ข้าวหอมกัญญา ข้าวสินเหล็ก ข้าวหอมมะลิแดง ข้าวหอมอุบล ข้าวหอมมะลิ 105 ข้าวสังข์หยดอุบล ข้าวหอมนิล ข้าวเหนียวดำอุบล และข้าวเหนียวเล้าแตก ถูกนำมาบรรจุในถุงพลาสติกแบบสุญญากาศจากนั้นเก็บไว้ในที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อควบคุมไม่ให้คุณภาพเปลี่ยนแปลงก่อนการนำไปวิเคราะห์ เมื่อจะนำไปวิเคราะห์ ข้าวแต่ละสายพันธุ์จะถูกสุ่มตัวอย่างมาหาความชื้นเริ่มต้นโดย Oven Method (AOAC, 2000)

ในการวิเคราะห์ข้าวที่ไม่ผ่านการหุงต้ม ข้าวจะถูกนำไปบดด้วยเครื่องโม่และนำมาร่อนผ่านตะแกรงขนาด 50 mesh ข้าวหลังการบดจะถูกนำไปวิเคราะห์ในขั้นตอนถัดไป ส่วนข้าวที่ต้องผ่านการหุงต้ม ข้าวจะถูกนำไปเติมน้ำตามอัตราส่วนของข้าวต่อน้ำ ดังแสดงในตารางที่ 3.2 จากนั้นข้าวจะถูกนำไปให้ความร้อนจนกระทั่งสุกก่อนนำไปวิเคราะห์ในขั้นตอนถัดไป

ตารางที่ 3.2 อัตราส่วนของข้าว (กรัม) ต่อน้ำ (มิลลิลิตร) ในการทำให้ข้าวสุก

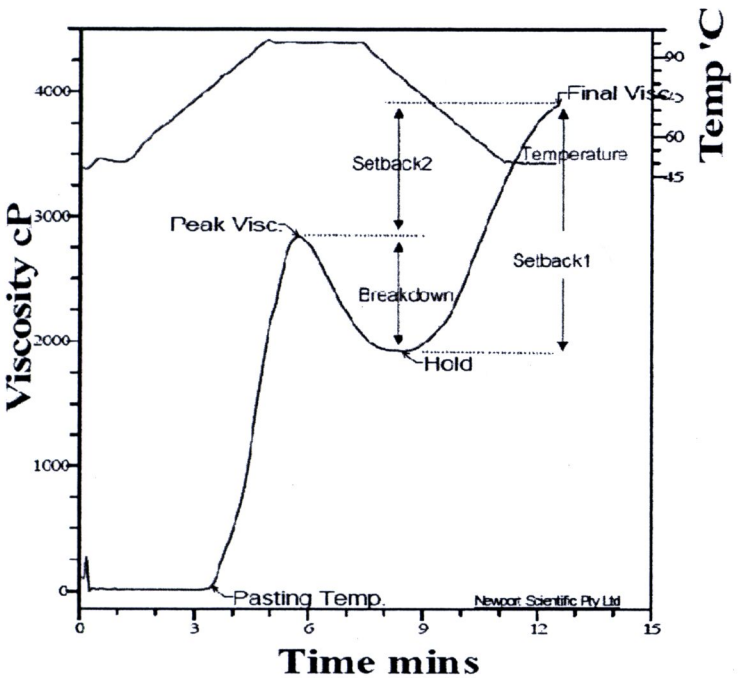
No	Sample Name	น้ำหนักข้าว (กรัม)	ปริมาตรน้ำ (มิลลิลิตร)
1	M1 : ข้าวหอมกัญญา	2	2.5
2	M2 : ข้าวสินเหล็ก	2	2.5
3	M3 : ข้าวมะลิแดง	2	3.0
4	M4 : ข้าวหอมอุบล	2	2.5
5	M5 : ข้าวหอมมะลิ 105	2	3.0
6	M6 : ข้าวสังข์หยดอุบล	2	3.0
7	M7 : ข้าวหอมนิล	2	2.5
8	M8 : ข้าวเหนียวดำอุบล	2	3.0
9	M9 : ข้าวเหนียวเล้าแตก	2	3.0

3.3 การวิเคราะห์ปริมาณแอมิโลส

ข้าวที่ไม่ผ่านการหุงต้มและผ่านขั้นตอนการบดจนเป็นผงแล้วจะถูกนำมาการวิเคราะห์หาปริมาณแอมิโลส ซึ่งสามารถตรวจวิเคราะห์จากปฏิกิริยาทางเคมีระหว่างแป้งที่ละลายในสารละลายโดยปรับสภาพความเป็นกรด – ด่างพอเหมาะ แอมิโลสเมื่อทำปฏิกิริยากับไอโอดีนจะได้สารละลายสีน้ำเงินซึ่งสามารถหาปริมาณแอมิโลสในแป้งได้โดยการวัดโดย colorimetric method ด้วยเครื่อง Spectrophotometer (SHIMADZU รุ่น UV-1601) ที่ช่วงคลื่นแสง 610-620 นาโนมิเตอร์และเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานแอมิโลส (Amylose Type III from Potato, Sigma-Aldrich) ที่แปรปริมาณแอมิโลสที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ (Juliano, 1984) ดังแสดงในภาคผนวก

3.4 การวิเคราะห์สมบัติด้านความหนืด (pasting characteristics)

ข้าวที่ไม่ผ่านการหุงต้มและผ่านขั้นตอนการบดจนเป็นผงแล้วจะถูกนำมาวิเคราะห์สมบัติด้านความหนืดด้วยเครื่อง Rapid Visco Analyser (RVA Model Super 3)โดยแป้งข้าวจะถูกนำมาละลายในน้ำกลั่นแล้วนำมาวิเคราะห์สมบัติด้านความหนืด โดยการวัดความหนืดของแป้งข้าวด้วยเครื่องวัดความหนืดอย่างเร็ว (Rapid visco analyzer : RVA) ตามวิธีการของ AACC (2000) ดังแสดงในภาคผนวก เพื่อวิเคราะห์ค่าต่างๆ คือ gelatinization temperature, peak viscosity, final viscosity, setback, consistency และ breakdown ดังแสดงในรูปที่ 3.2



RVA Pasting Curve Definition

Peak Viscosity = ความหนืดสูงสุดในช่วงการให้ความร้อน เป็นจุดที่เกิดเจลาติไนเซชันสมบูรณ์ แป้งจะสุกทั้งหมด บ่งบอกความหนืดของแป้งที่อุณหภูมิร้อน สัมพันธ์กับค่าความเหนียว (stickiness) ของข้าวสุก (cP)

Hold หรือ Trough = ความหนืดต่ำที่สุดระหว่างการทำให้เย็น (cP)

Breakdown = ความแตกต่างของความหนืดสูงสุดและความหนืดต่ำสุด (Trough) ถ้า Breakcown มีค่าน้อย แสดงว่าเม็ดแป้งมีความคงทนต่ออุณหภูมิมาก (cP) หรือเม็ดแป้งมีความคงทนต่ออุณหภูมิ อัตราการกวน แรงที่ใช้ในการกวน หลังการเกิดเจลาติไนเซชันได้ดี

Final Viscosity = ความหนืดสุดท้ายของการทดลอง ใช้บ่งชี้ลักษณะของผลิตภัณฑ์สุดท้ายหรือเจลที่เกิดขึ้น สัมพันธ์กับค่าความแข็งของข้าวสุก คือถ้า Final Viscosity มาก แสดงว่า เป็นข้าวแข็งหรือมีปริมาณอะไมโลสสูงนั่นเอง ปกติพิจารณาร่วมกับค่าSetback (cP)

Setback 1 (*Setback from Trough*) = ผลต่างของความหนืดสุดท้ายกับความหนืดต่ำสุด แสดงถึง ความสามารถในการจัดเรียงตัวใหม่ของอะไมโลสและอะไมโลเพคติน หรือเรียกว่า retrogradation ถ้า Setback มีค่ามาก แสดงว่าแป้งมีความสามารถในการจัดเรียงตัวใหม่ได้ดี (cP)

Setback 2 (*Setback from Peak*) = ผลต่างของความหนืดสุดท้ายกับความหนืดสูงสุด แสดงถึงความแข็งของเจลผลิตภัณฑ์ โดยทั่วไป ถ้า Setback 2 มีค่า + มากจะให้เจลที่มีความแข็ง หรือเป็นข้าวแข็ง แต่ถ้าค่าเป็น – มาก ๆ ผลิตภัณฑ์นั้นอาจไม่สามารถเกิดเจลแข็งได้ หรือเป็นข้าวอ่อน พิจารณาร่วมกับค่า Final Viscosity

Peak Time = เวลาที่เกิด peak viscosity เป็นเวลาที่แป้งสุกทั้งหมด (นาที)

Pasting Temp = อุณหภูมิที่เริ่มเปลี่ยนค่าความหนืด เมื่อมีการให้ความร้อนเม็ดแป้งเริ่มดูดซึมน้ำเข้าไปทำให้เกิดการพองตัวออกและมีความหนืดเพิ่มขึ้น หรือเป็นอุณหภูมิที่ข้าวเริ่มสุก (°C)

รูปที่ 3.2 RVA Pasting curve definition

3.5 การสกัดสารเพื่อนำไปวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารประกอบให้กลิ่นในข้าว

การสกัดใช้วิธีที่ดัดแปลงจาก Sarreal et al. (1997) และ Bergman et al. (2000) โดยข้าวที่ไม่ผ่านการหุงต้มและผ่านขั้นตอนการบดจนเป็นผงแล้ว จะถูกนำมาชั่งน้ำหนัก 3.0 กรัมใส่ลงในขวด vial แบบ screw cap ขนาด 20 มิลลิลิตร เติม stock solution (stock solution เตรียมจากสาร-2,4,6 trimethyl-pyridine (TMP: Collidine, Sigma-Aldrich) (Laksanalamai and Ilangantileke, 1993; Laohakunjit and Noomhorm, 2004) ซึ่งเป็น สาร internal standard ละลายด้วย Methylene Chloride ($MeCl_2$) : Sigma-Aldrich) ความเข้มข้น 500.0 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ปิดฝา นำขวดตัวอย่างไปให้ความร้อนใน water bath ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส นาน 2.5 ชม จากนั้นนำมาวางไว้จนอุณหภูมิลดลงถึงอุณหภูมิห้อง นำไปกรองด้วยกระดาษกรองที่มีขนาด 0.45 ไมครอน นำส่วนใสที่สกัดได้ปริมาณ 2 ไมโครลิตร ฉีดลงในเครื่อง GC-MS

กรณีที่ใช้ข้าวที่ผ่านการหุงต้มแล้ว ทำได้โดยนำข้าวที่ผ่านขั้นตอนการบดจนเป็นผงแล้ว มาชั่งน้ำหนัก 2.0 กรัมใส่ลงในขวด vial แบบ screw cap ขนาด 20 มิลลิลิตร เติมน้ำตามอัตราส่วนดังแสดงในตารางที่ 3.2 นำขวดตัวอย่างไปให้ความร้อนใน water bath ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นเติม stock solution (stock solution เตรียมจากสาร-2,4,6 trimethyl-pyridine (TMP: Collidine) ซึ่งเป็น สาร internal standard ละลายด้วย Methylene Chloride ($MeCl_2$)) ความเข้มข้น 500.0 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ปิดฝา นำขวดตัวอย่างไปให้ความร้อนใน water bath ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส นาน 2.5 ชม จากนั้นนำมาวางไว้จนอุณหภูมิลดลงถึงอุณหภูมิห้อง นำไปกรองด้วยกระดาษกรองที่มีขนาด 0.45 ไมครอน นำส่วนใสที่สกัดได้ปริมาณ 2 ไมโครลิตร ฉีดลงในเครื่อง GC-MS

3.6 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารประกอบให้กลิ่นในข้าว (2-acetyl-1-pyrroline และ *n*-hexanal)

รายละเอียดของเครื่อง GC-MS และสภาวะที่ใช้สำหรับเครื่อง GC-MS:

Gas chromatography

: Agilent technologies made in Germany

: Model 6890 N

: Oven 50 °C hold 2 min, 7 °C/min to 200°C hold 5 min.

: He carrier gas flow 0.6 mL/min

: Column DB-Wax Agilent technologies made in USA. 0.25 mm x 30m x 0.25 micron of film.

: Inlet split 10:1 volume of injection 2 uL

: Inlet temperature 170 °C

: Auxiliary temperature 200 °C

Mass spectrometer detector

: Agilent technologies made in USA.

: Model 5973 inert

: Scan 50 – 400 m/z

: MS Quadrupole temperature 150 °C

: MS Source temperature 230 °C

อุปกรณ์อื่นๆ

1. Vortex mixer : Genie 2 G-560E from Scientific Industry USA.
2. Shaker : 3589-1CE Barnstead Lab-Line Multi wrist shaker USA.

   Homogenizer : T-2513 IKA Malaysia.

สภาวะที่ใช้สำหรับเครื่อง GC-MS (ดัดแปลงจาก Laohakunjit and Kerdchoechuen, 2007) ใช้การฉีดด้วยระบบ split ratio 10:1 ในส่วนของคอลัมน์ใช้อัตราการไหลของก๊าซฮีเลียมเข้าคอลัมน์เท่ากับ 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที ส่วนอุณหภูมิคอลัมน์จะตั้งแบบ temperature program คือ อุณหภูมิ injector 170 องศาเซลเซียส อุณหภูมิ oven เริ่มที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที แล้วเพิ่มขึ้นในอัตรา 7 องศาเซลเซียสต่อนาที จนมีอุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียสคงอุณหภูมินี้ไว้ 5 นาที ใช้คอลัมน์ DB-wax (30 m length × 0.25 mm I.D. × 0.25 m film thickness 0.25)

ส่วนของ MS เป็นแบบ quadrupole ที่ต่อเข้ากับ GC โดยตรง โดยผ่านส่วนเชื่อมต่อ (transfer line) ที่ตั้งอุณหภูมิไว้ 150 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิของ ion source เป็น 230 องศาเซลเซียส ในระบบ electron impact ionization (EI) โดยมีพลังงานเฉลี่ยของอิเล็กตรอนเท่ากับ 70 eV โดยให้ผลการแยกองค์ประกอบของสารระเหยเป็น total ion chromatogram (TIC) ในระบบ scan mode ใช้ช่วง m/z 50 ถึง 400 โดยตั้ง solvent delay เป็น 6.5 นาที การพิสูจน์เอกลักษณ์ใช้การเปรียบเทียบสเปกตรัมกับสเปกตรัมมาตรฐาน

ทำการวิเคราะห์ปริมาณ ACPY เปรียบเทียบกับ TMP ตามวิธีการดังนี้

$$\text{ACPY Concentration (ng/g)} = \frac{\text{area of ACPY} \times \text{conc. of TMP (ng/}\mu\text{L)} \times \text{vol. of injection (}\mu\text{L)}}{\text{area of TMP} \times \text{wt. of sample (g)}}$$

ในการวิเคราะห์ปริมาณ n-hexanal ทำได้โดยการเปรียบเทียบข้อมูลจาก GC–MS data และ GC retention time ของสารมาตรฐาน โดยปริมาณ n-hexanal คำนวณได้จาก peak areas ของ standard

curve ที่ได้จากการใช้ standard solution ที่แปรความเข้มข้นของ n-hexanal (Sigma-Aldrich) ตั้งแต่ 0.1 ถึง 0.7 μg

3.7 การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยทำการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างตัวอย่างโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance-ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และวิเคราะห์ค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของข้อมูลด้วยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ

การหาความสัมพันธ์ของตัวแปรต่างๆ จากการทดลองใช้ Pearson Correlation และวิธีการหาสมการที่เหมาะสมโดยวิธีการคัดเลือกตัวแปรอิสระ ใช้วิธี Backward Elimination หรือวิธีการคัดออก เป็นวิธีการคัดเลือกตัวแปรอิสระออก จากตัวแบบของสมการถดถอยทีละตัวแปร เริ่มต้นจะนำเอาตัวแปรอิสระทุกตัวมาพิจารณาในตัว แบบของสมการถดถอย แล้วคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เชิงส่วน ซึ่งเป็นการพิจารณาว่า เมื่อตัวแปรใดมีค่า R น้อยก็จะถูกคัดออก แล้วทำการทดสอบตัวแบบใหม่โดยไม่มีตัวแปรอิสระที่ถูกตัดออกไป ทำเช่นนี้ต่อไปจนกระทั่งได้สมการถดถอยที่ไม่สามารถตัดตัวแปรใดๆ ออกจากตัวแบบได้อีก