บทที่ 3
วิธีดำเนินงานวิจัย

1. วัตถุดิบ สารเคมี อุปกรณ์และเครื่องมือ

1.1 วัตถุดิบ

ข้าวเปลือกขาวดอกมะลิ 105 ผลิตในปี 2552-2553 ได้จากบริษัท อาร์ซีเค อะกริ มาร์เกตติ้ง จำกัด จังหวัดกาฬสินธุ์

1.2 สารเคมี

1.2.1 สารเคมีที่ใช้เป็นมาตรฐาน

1) GABA (AR-Grade) ผลิตโดยบริษัท Fluka ประเทศเยอรมัน
2) α, γ, δ-tocopherol ผลิตโดยบริษัทCalbiochem ประเทศเยอรมัน
3) γ-oryzanol ผลิตโดยบริษัท Woko ประเทศญี่ปุ่น
4) Glutamate (AR-Grade) ผลิตโดยบริษัท Fluka ประเทศเยอรมัน
5) Leucine (AR-Grade) ผลิตโดยบริษัท Sigma ประเทศเยอรมัน
6) Arginine (AR-Grade) ผลิตโดยบริษัท Sigma ประเทศเยอรมัน
7) Alanine (AR-Grade) ผลิตโดยบริษัท Fluka ประเทศเยอรมัน
8) Proline (AR-Grade) ผลิตโดยบริษัท Fluka ประเทศเยอรมัน
9) Histidine (AR-Grade) ผลิตโดยบริษัท Himedia ประเทศอินเดีย
10) Valine (AR-Grade) ผลิตโดยบริษัท Himedia ประเทศอินเดีย
11) Glutamine (AR-Grade) ผลิตโดยบริษัท Himedia ประเทศอินเดีย
12) Serine (AR-Grade) ผลิตโดยบริษัท Himedia ประเทศอินเดีย

1.2.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

1) Di-sodium tetraborate (AR-Grade) ผลิตโดยบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน
2) 9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOC) (AR-Grade) ผลิตโดยบริษัท ACROS ประเทศเยอรมัน
3) Trifluoroacetic acid (TFA) (AR-Grade) ผลิตโดยบริษัท ACROS ประเทศเยอรมัน
4) Acetonitrile (ACN) (HPLC-Grade) ผลิตโดยบริษัท BDH ประเทศอังกฤษ
5) Methanol (MEOH) (HPLC-Grade) ผลิตโดยบริษัท BDH ประเทศอังกฤษ
6) Ethanol (ETOH) (AR-Grade) ผลิตโดยบริษัท RCI Labscan ประเทศไทย
7) 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) ผลิตโดยบริษัท Sigma ประเทศเยอรมัน
8) 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid 97% (Trolox) ผลิตโดยบริษัท Sigma ประเทศเยอรมัน

1.2.3 อุปกรณ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์

1) บีกเกอร์ขนาด 50, 100 และ 250 มิลลิลิตร

2) กระบอกตวงขนาด 50 และ 100 มิลลิลิตร

3) ขวดปรับปริมาตร (Volumetric flask) ขนาด 5, 10, 25, 50 และ 100 มิลลิลิตร

4) หลอดทดลอง

5) หลอดพลาสติกสำหรับปั่นเหวี่ยง

6) ถ้วยหาความชื้น (Moisture can)

7) ปิเปต ขนาด 1, 5, 10 20 และ 25 มิลลิลิตร

8) เครื่องกะเทาะเปลือกข้าว SATAKE รุ่น THU 35A

9) เครื่องปิดผนึกด้วยสุญญากาศ รุ่น 021-336 บริษัท Busch ประเทศเยอรมัน

10) เครื่องชั่งละเอียด (Analytical Balance) รุ่น BP 210 S ทศนิยม 4 ตำแหน่งบริษัท Sartorious ประเทศเยอรมัน

11) เครื่องชั่งละเอียด (Analytical Balance) รุ่น BP 210 S ทศนิยม 2 ตำแหน่งบริษัท Sartorious ประเทศเยอรมัน

12) โถดูดความชื้น (Desiccator)

13) อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) รุ่น Haake D10 บริษัท United instrument ประเทศเยอรมัน

14) เครื่องอบแห้ง (Hot air oven) รุ่น U 30 บริษัท Memmert ประเทศเยอรมัน

15) เครื่องบดข้าว (Laboratory mill) รุ่น 3100 บริษัท Perton ประเทศสวีเดน

16) เตาให้ความร้อน (Hotplate) รุ่น KI 24 บริษัท Gerhardt Bonn ประเทศเยอรมัน

17) อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิเย็น (Cooling bath)รุ่น CA 1100 บริษัท Eyela ประเทศเยอรมัน

18) เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH Meter) รุ่น F1079712 บริษัท Hanna ประเทศเยอรมัน

19) ตู้อบลมร้อน (Cabinet Dryer) รุ่น F1079712 บริษัท Kentcleaway ประเทศเยอรมัน

20) เครื่อง Millipore ผลิตน้ำขจัดอิออน (Double deionized water) รุ่น Mili 0-185 บริษัท Molsheim ประเทศฝรั่งเศส

21) เครื่องสูบอากาศ (Vacuum Pump) รุ่น B-169 บริษัท Buchi ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

22) เครื่องปั่นเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง ยี่ห้อ Sorvall รุ่นID 200579168 บริษัท Thermo Scientific ประเทศเยอรมัน

23) เครื่อง Ultrasonic degasser รุ่น 1875D บริษัท Tru-Sweep ประเทศสหรัฐอเมริกา

24) เครื่องแยกของเหลวสมรรถนะสูง(High Performance Liquid Chromatography :HPLC) ประกอบด้วยปั๊ม(Water ™ controller) รุ่น 600 เครื่องฟลูออเรสเซนต์เพื่อตรวจวัดสาร (Jasco) รุ่น FP 920 และเครื่องควบคุมการทำงานเครื่องวิเคราะห์สาร (Auto sample) รุ่น 717 Pulse บริษัท Water ประเทศสหรัฐอเมริกา

25) คอลัมน์วิเคราะห์สารชนิด C18 รุ่น Symmetry Reverse-Phase C18 3.9 x150 mm บริษัท Water ประเทศสหรัฐอเมริกา

2. วิธีการดำเนินงานวิจัย

2.1 การเตรียมตัวอย่างข้าวกล้องขาวดอกมะลิ 105 และข้าวกล้องงอกควบคุม

2.1.1 การเตรียมตัวอย่างข้าวกล้องขาวดอกมะลิ 105

เก็บข้าวเปลือกขาวดอกมะลิ 105 ฤดูการผลิต 2552/2553 ในกระสอบป่านและเก็บไว้ที่อุณหภูมิตู้เย็น (13±2°ซ) เมื่อจะนำมาวิเคราะห์เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 วัน นำมากะเทาะเปลือกด้วยเครื่อง SATAKE แล้วบดด้วยเครื่อง Laboratory mill ได้ผงข้าวกล้องขาวดอกมะลิ 105 เก็บในขวดแก้วที่ปิดสนิท

2.1.2 การเตรียมข้าวกล้องงอกควบคุม

เก็บข้าวเปลือกขาวดอกมะลิ 105 ฤดูการผลิต 2552/2553 ในกระสอบป่านและเก็บไว้ที่อุณหภูมิตู้เย็น (13±2°ซ) จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 วัน นำข้าวเปลือกขาวดอกมะลิ 105 จำนวน 100 กรัม (น้ำหนักแห้ง)ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร แช่ด้วยน้ำ Reverse osmosis ที่อุณหภูมิ 35 °ซ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง โดยใช้อัตราส่วนข้าวต่อน้ำคือ 1:2 จากนั้นเกลี่ยข้าวเปลือกที่ผ่านการแช่ลงบนผ้าขาวบางเปียกที่วางจนตะแกรงเหล็ก นำไปเพาะงอกที่อุณหภูมิ 40 °ซ เป็นเวลา 25 ชั่วโมง ได้ข้าวกล้องงอก นำมาอบแห้งแบบถาดความเร็วลมร้อน 0.8 เมตร/วินาที ใช้อุณหภูมิ 50°ซ เป็นเวลา 15 ชั่วโมง (วรนุช ศรีเจษฎารักษ์ และเทพฤทธิ์ ปิติฤทธิ์ 2551) นำมากะเทาะเปลือกด้วยเครื่อง SATAKE แล้วบดด้วยเครื่อง Laboratory mill ได้ผงข้าวกล้องงอกควบคุม เก็บในขวดแก้วที่ปิดสนิท หากยังไม่วิเคราะห์ให้เก็บในถุง Al foil/LDPE บรรจุแบบสุญญากาศเก็บที่อุณหภูมิตู้เย็น (6±2°ซ) เมื่อจะนำมาวิเคราะห์ต้องนำมาเก็บไว้อุณหภูมิห้อง 1 วัน

นำตัวอย่างข้าวกล้อง และข้าวกล้องงอกควบคุมมาวิเคราะห์ปริมาณความชื้น สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและคุณภาพข้าว ดังต่อไปนี้

2.1.3 การวิเคราะห์ความชื้น ตามวิธี AOAC 1995 (ภาคผนวก ก 1)

2.1.4 การวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

1) ปริมาณ GABA ดัดแปลงจากวิธีการสกัดของ Ohtsubo and others (2005) และดัดแปลงวิธีวัดของ Patita and others (2007) (ภาคผนวก ก 2)

2) ปริมาณ γ-oryzanol ดัดแปลงจาก Chen and Bergman (2005) และ Azrina and others (2008) (ภาคผนวก ก 3)

3) ปริมาณ α-tocopherol, δ-tocopherol และ γ-tocopherol ดัดแปลงจาก Chen and Bergman (2005) และ Azrina and others (2008) (ภาคผนวก ก 3)

4) ปริมาณกิจกรรมสารต้านออกซิเดชั่นด้วยวิธี ABTS (Re and others 1999) และวิธี DPPH (Brand-Williams and others 1995) (ภาคผนวก ก 4)

2.1.5 การวิเคราะห์คุณภาพของข้าว ภายหลังจากการกะเทาะเปลือก

1) ร้อยละต้นข้าว ดัดแปลงจาก Aquerreta and others (2007) (ภาคผนวก ก 5)

2) ค่าความขาวดัดแปลงจาก Jaiboon and others (2009) (ภาคผนวก ก 6)

2.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิและเวลาในการอบแห้งแบบถาดของข้าวกล้องงอกต่อปริมาณความชื้น สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และคุณภาพข้าว

2.2.1 การเตรียมตัวอย่างข้าวกล้องงอกขาวดอกมะลิ 105

เก็บข้าวเปลือกขาวดอกมะลิ 105 ฤดูการผลิต 2552/2553 ในกระสอบป่านและเก็บไว้ที่อุณหภูมิตู้เย็น (13±2°ซ) จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 วัน นำข้าวเปลือกขาวดอกมะลิ 105 จำนวน 100 กรัม (น้ำหนักแห้ง)ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร แช่ด้วยน้ำ Reverse osmosis ที่อุณหภูมิ 35 °ซ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง โดยใช้อัตราส่วนข้าวต่อน้ำคือ 1:2 จากนั้นเกลี่ยข้าวเปลือกที่ผ่านการแช่ลงบนผ้าขาวบางเปียกที่วางจนตะแกรงเหล็ก นำไปเพาะงอกที่อุณหภูมิ 40 °ซ เป็นเวลา 25 ชั่วโมง (วรนุช ศรีเจษฎารักข์และเทพฤทธิ์ ปิติฤทธิ์ 2551) ได้ข้าวกล้องงอก

2.2.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิและเวลาในการอบแห้งแบบถาดของข้าวกล้องงอกต่อปริมาณความชื้น สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และคุณภาพข้าว

นำตัวอย่างข้าวกล้องงอก จากข้อ 2.2.1 มาอบแห้งด้วยเครื่องอบแห้งแบบถาด ที่ความเร็วลมร้อน 0.8 เมตร/วินาที โดยใช้อุณหภูมิการอบแห้งเท่ากับ 40, 50 และ 60°ซ เวลาที่ใช้ในการอบแห้งแต่ละอุณหภูมิคือ 10, 12 และ14 ชั่วโมง แล้วนำตัวอย่างมากะเทาะเปลือกด้วยเครื่อง SATAKE แล้วบดด้วยเครื่อง Laboratory mill ได้ผงข้าวกล้องงอก นำไปเก็บรักษาไว้ในขวดแก้วที่ปิดสนิท จากนั้นนำไปวิเคราะห์ปริมาณความชื้น สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและคุณภาพข้าวเหมือนข้อ 2.1

วางแผนการทดลองแบบ 3x3 Factorial in CRD วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมทางสถิติ SPSS for Windows Version 16 โดยวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยที่ได้โดยใช้ Duncan's New Multiple Range Test (ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%) ทำการทดลอง 2 ซ้ำ คัดเลือกสภาวะการอบแห้งแบบถาดที่ทำให้ข้าวกล้องงอกขาวดอกมะลิ 105 คงสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและคุณภาพข้าวในด้านร้อยละต้นข้าวปริมาณสูง

2.3 การศึกษาผลของการอบแห้งแบบถาดร่วมกับการเก็บในที่อับอากาศของข้าวกล้องงอกต่อปริมาณความชื้น สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และคุณภาพของข้าว

2.3.1 การศึกษาการลดลงของความชื้นของข้าวกล้องงอกเพื่อหาระยะเวลาในการอบแห้งที่ให้ได้ความชื้นของข้าวกล้องงอกร้อยละ14, 16 และ 18

นำข้าวเปลือกงอกข้อ 2.2.1 มาอบแห้งแบบถาดโดยทำการทดลอง 3 อุณหภูมิ คือ 40, 50 และ 60°ซ โดยทำการสุ่มตัวอย่างเพื่อวัดปริมาณความชื้นทุกๆ 1 ชั่วโมง เป็นเวลา 0 ถึง 15 ชั่วโมง จากนั้นคัดเลือกอุณหภูมิ 1 อุณหภูมิที่อบแห้งข้าวกล้องงอกแล้วมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสูง เพื่อนำไปอบแห้งข้าวกล้องงอกให้ได้ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ14, 16 และ 18 ก่อนนำไปเก็บในที่อับอากาศ

2.3.2 การศึกษาผลของการอบแห้งแบบถาดร่วมกับการเก็บในที่อับอากาศของข้าวกล้องงอก ที่มีต่อความชื้น ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และคุณภาพทางของข้าว

นำข้าวกล้องงอกที่มีความชื้นร้อยละ 14, 16 และ 18 มาศึกษาการอบแห้งร่วมกับการเก็บในที่อับอากาศ โดยนำข้าวภายหลังจากการอบแห้งแบบถาดมาเก็บในที่อับอากาศที่อุณหภูมิ 40 และ 50°ซ เป็นเวลา

0, 30, 60, 90 และ 120 นาที แล้วนำตัวอย่างมากะเทาะเปลือกด้วยเครื่อง SATAKE แล้วบดด้วยเครื่อง Laboratory mill ได้ผงข้าวกล้องงอก นำไปเก็บรักษาไว้ในขวดแก้วที่ปิดสนิท จากนั้นนำไปวิเคราะห์ปริมาณความชื้น สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและคุณภาพข้าวเหมือนข้อ 2.1

วางแผนการทดลองแบบ 3x2x5 Factorial in CRD วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมทางสถิติ SPSS for windows Version 16 โดยวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยที่ได้โดยใช้ Duncan's New Multiple Range Test (ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%) ทำการทดลอง 2 ซ้ำ

คัดเลือกข้าวกล้องงอกที่ผ่านการอบแห้งแบบถาดร่วมกับการเก็บในที่อับอากาศจากข้อ 2.3.2 ซึ่งพิจารณาปริมาณ GABA สูงเป็นหลัก 5 สภาวะ นำมาวิเคราะห์ความแตกต่างเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's New Multiple Range Test (ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%) โดยเปรียบเทียบปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และคุณภาพของข้าวกล้องงอกแล้วคัดเลือกข้าวกล้องงอกเพียง 1 สภาวะ

2.4 เปรียบเทียบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและคุณภาพข้าวของข้าวกล้องงอกที่ผ่านการอบแห้งแบบถาดแบบถาดร่วมกับการเก็บในที่อับอากาศที่ผ่านการคัดเลือก ข้าวกล้องและข้าวกล้องงอกควบคุม

นำข้าวกล้องงอกที่ผ่านการอบแห้งแบบถาดที่คัดเลือกจากข้อ 2.2 ข้าวกล้องงอกที่ผ่านการอบแห้งแบบถาดร่วมกับการเก็บในที่อับอากาศที่คัดเลือกจากข้อ 2.3 ข้าวกล้องและข้าวกล้องงอกควบคุมจากข้อ 2.1 รวมทั้งหมด 4 ตัวอย่าง มาวิเคราะห์ความแตกต่างของปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและคุณภาพข้าวเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's New Multiple Range Test (ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%)

2.5 การศึกษาคุณภาพหุงสุกของข้าวกล้องงอกที่ผ่านการอบแห้งแบบถาด แบบถาดร่วมกับการเก็บในที่อับอากาศที่คัดเลือก ข้าวกล้องงอกควบคุมและข้าวกล้อง

นำข้าวกล้องงอกที่ผ่านการอบแห้งแบบถาดที่คัดเลือกจากข้อ 2.2 ข้าวกล้องงอกที่ผ่านการอบแห้งแบบถาดร่วมกับการเก็บในที่อับอากาศที่คัดเลือกจากข้อ 2.3 ข้าวกล้องและข้าวกล้องงอกควบคุมจากข้อ 2.1 รวมทั้งหมด 4 ตัวอย่าง มาเปรียบเทียบคุณภาพหุงสุกโดยการประเมินคุณภาพทางกายภาพและทางเคมี

2.5.1 การประเมินคุณภาพทางกายภาพ

1) วัดระยะเวลาในการหุงสุก ตามวิธีของ Singh and others (2005) (ภาคผนวก ก 7)

2) อัตราส่วนการอุ้มน้ำของข้าวในการหุงสุก ตามวิธีของ Singh and others (2005) (ภาคผนวก ก 8)

3) อัตราการขยายปริมาตรของเมล็ดข้าว ตามวิธีของงามชื่น คงเสรี(2542) (ภาคผนวก ก 9)

4) การสูญเสียของแข็งระหว่างการหุงสุกของข้าว ตามวิธีของ Singh and others (2005) (ภาคผนวก ก 10)

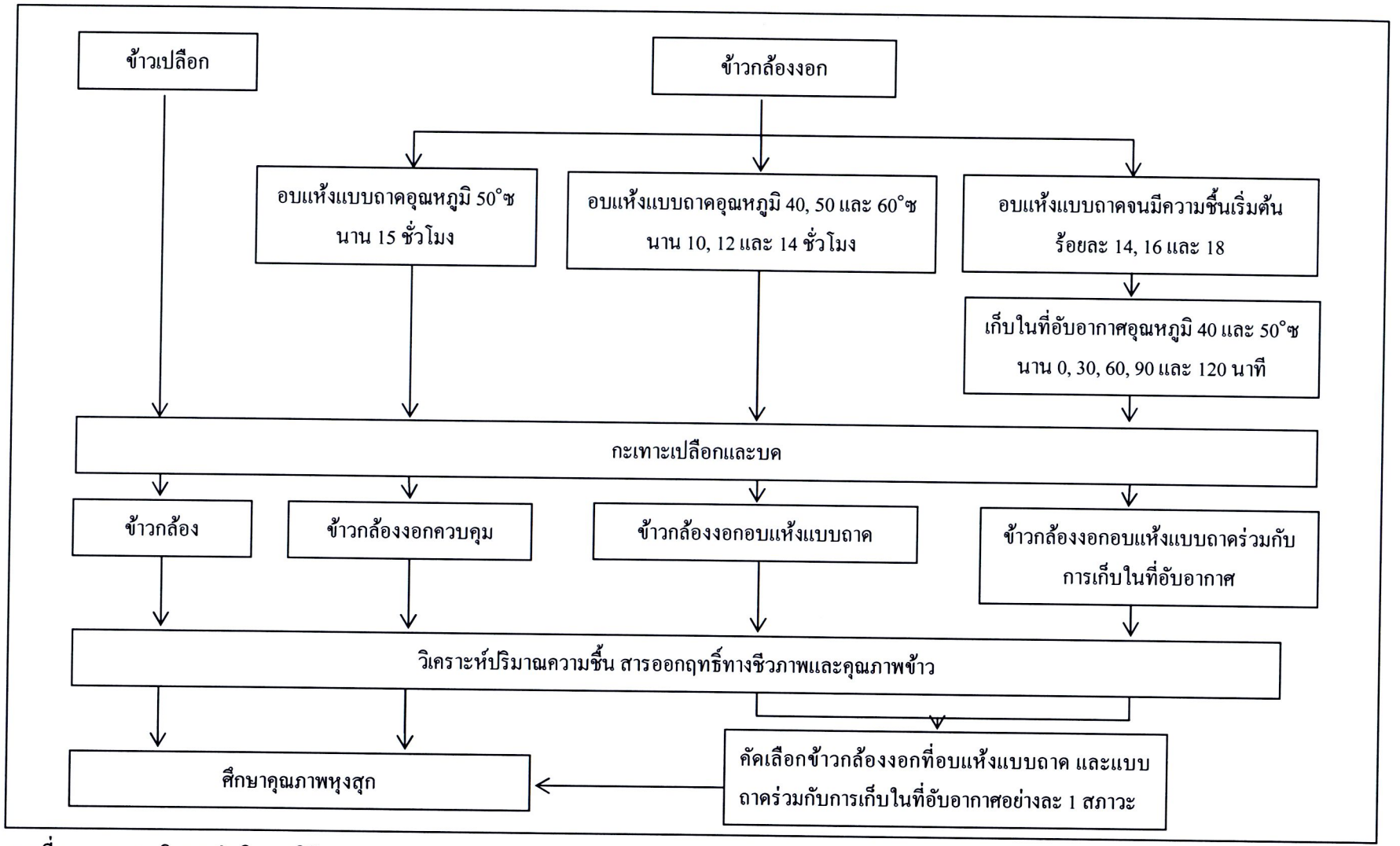
5) อัตรายืดตัวของเมล็ดข้าว ตามวิธีของงามชื่น คงเสรี(2542) (ภาคผนวก ก 11)

6) วัดลักษณะเนื้อสัมผัส TA–XT2 Texture Analyzer ตามวิธีของ Perdon and others (1999) (ภาคผนวก ก 12)

2.5.2 การประเมินคุณภาพทางเคมี ภายกลังการหุงสุกนำข้าวทั้ง 4 ตัวอย่าง มาอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 °ซ นาน 15 ชั่วโมง แล้วนำไปบดด้วยเครื่อง Laboratory mill ได้ผงข้าวหลังหุงสุกนำไปวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเหมือนข้อ 2.1

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมทางสถิติ SPSS for Windows Version 16 โดยวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยที่ได้โดยใช้ Duncan's New Multiple Range Test (ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%) ทำการทดลอง 2 ซ้ำ

การดำเนินการวิจัยมีกรอบแนวคิดดังแสดงในภาพที่ 6



ภาพที่ 6 กรอบแนวคิดการดำเนินการวิจัย