

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุและเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

3.1.1 วัตถุดิบหลัก

3.1.1.1 เมล็ดมะม่วง

จัดหาเมล็ดมะม่วงสายพันธุ์ 4 สายพันธุ์ คือ พันธุ์เขียวมรกต ที่มีอายุการเก็บเกี่ยว 110–120 วัน มีลักษณะที่กิ่งสูงกิ่งดัด (ห้าม) พันธุ์เขียวเสวยที่มีอายุการเก็บเกี่ยว 105–110 วัน มีลักษณะที่กิ่งสูงกิ่งดัด (ห้าม) พันธุ์อกร่องที่มีอายุการเก็บเกี่ยว 110–120 วัน มีลักษณะสูง จากร้านจำหน่ายผลไม้ จังหวัดนครปฐม และพันธุ์น้ำดอกไม้ ที่มีอายุการเก็บเกี่ยว 110–120 วัน มีลักษณะสูง จากบริษัท ฟู้ดเอดจ์ กั๋วเมท (ไทยแลนด์) จำกัด จังหวัดนนทบุรี โดยเมล็ดมะม่วงทั้ง 4 สายพันธุ์ จะนำเมล็ดมาเป็นชุด ชุดละประมาณ 5–10 กิโลกรัม จำนวน 3 ชุด โดยให้แต่ละชุดจะรับมาระยะเวลาห่างกันไม่เกิน 1 เดือน และแต่ละชุดจะใช้เป็นซ้ำในการทดลอง และหลังจากได้เมล็ดมะม่วงแล้ว นำมาแกะเอาส่วนเปลือกแข็งออกให้เหลือแต่ส่วนเมล็ดภายในที่มีลักษณะเป็นสีขาวเรียกว่า เมล็ดในของมะม่วง (mango kernel หรือ mango seed almond) นำมาเก็บในถุงพลาสติกโพลีเอทิลีนและปิดปากถุงให้สนิทนำไปเก็บที่ตู้แช่เย็นที่อุณหภูมิ -5°C เพื่อบรรจุการนำไปสกัดน้ำมัน

3.1.1.2 กรดไขมันมาตรฐาน จากบริษัท ซิกม่า จำกัด (Sigma Co.,Ltd.)

3.1.1.3 ไตรกลีเซอไรด์มาตรฐาน จากบริษัท ซิกม่า จำกัด (Sigma Co.,Ltd.)

3.1.2 สารเคมี

3.1.2.1 เฮกเซน (Hexanes, Maillinckrodt chemical, UN 1208)

3.1.2.2 ปีโตรเลียมอีเทอร์ (Petroleum ether, Maillinckrodt chemical, UN 1268)

3.1.2.3 โพรพานอล (2-propanol, Merck, UN 1219)

3.1.2.4 โทลูอีน (Toluene, Panreac quimica sua, UN 1294)

3.1.2.5 เมทานอล (Methanol (Died) $\geq 99.9\%$ assay, Ajax finechem, UN 1230)

3.1.2.6 เอ็น-เฮปเทน (n-Heptane $\geq 99.9\%$ assay, Ajax finechem, UN 1206)

3.1.2.7 สารละลายวิจส์ (Wijs solution, $c(\text{I}_2) = 0.1 \text{ mol/l}$, Merck, UN 2789)

3.1.2.8 เอทานอล (Ethanol 95% (v/v))

3.1.2.9 โบรอนไตรฟลูออไรด์ในเมทานอล ความเข้มข้นประมาณ 1.3 โมลาร์ (Boron trifluoride ($\sim 1.3 \text{ M}$) in methanol, Fluka 15715)

3.1.2.10 กรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.5 นอร์มอล (Hydrochloric acid, c(HCl) = 0.5 N, Merck

3.1.2.11 โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (Potassium hydroxide $\geq$ 85% assay, Merck, UN 1813)

3.1.2.12 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide $\geq$ 99% assay, Merck, UN 1823)

3.1.2.13 โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride $\geq$ 99.5% assay, Merck)

3.1.2.14 โซเดียมไธโอซัลเฟต (Sodium thiosulphate $\geq$ 99.5% assay, Ajax finechem)

3.1.2.15 ฟีนอล์ฟทาลีน อินดิเคเตอร์ (Phenolphthalein indicator, Labchem, Asia pacific specialty chemicals limited.)

3.1.2.16 ไซโครเฮกเซน (Cyclohexane)

3.1.2.17 กรดอะซิติก (Acetic acid)

3.1.2.18 น้ำแป้ง

3.1.2.19 โพแทสเซียมไอโอไดด์ (Potassium iodide)

3.1.2.20 แอนไฮดรัส โซเดียมไดซัลเฟต (anhydrous Sodium sulphate $\geq$ 99% assay, Ajax finechem)

3.1.3 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

3.1.3.1 ชุดสกัดน้ำมัน (Soxhlet)

3.1.3.2 ตู้อบสูญญากาศ (Vacuum oven VOS-300SD, Eyela)

3.1.3.3 อ่างน้ำ (water bath) ควบคุมอุณหภูมิได้

3.1.3.4 เครื่อง Gas Chromatography-Flame Ionization Detector (GC-FID, Shimadzu GC-2010)

3.1.3.5 เครื่อง High Performance Liquid Chromatography- Diode Array Detector (HPLC, Shimadzu SPD- M20A)

3.1.3.6 เครื่อง pulse-Nuclear Magnetic Resonance (p-NMR) ของบริษัท BRUKER รุ่น the minispec mq20

3.1.3.7 เครื่อง Polarized Light Microscopy (PLM) (Olympus CH-2, Japan)

3.1.3.8 กล้องถ่ายรูปแบบดิจิทัลพร้อมชุด adapter สำหรับเชื่อมต่อเข้ากับ PLM Olympus CAMEDIA digital camera (model NO. C-7070 Wide Zoom, 7.1 Megapixel, Japan)

3.1.3.9 เครื่องวัดสี (Color-view TM Spectrophotometer, (D65), Gardner)

3.1.3.10 เครื่อง X-ray Powder Diffractometer (XRD)

3.1.3.11 ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated incubators with microprocessor program controller RD3, Binder)

3.1.3.12 เครื่องควบคุมอุณหภูมิ FP90 Central Processor และ FP82 Microscope Hot Stage (Mettler Toledo FP900 Thermosystem, Mettler-Toledo AG, Switzerland)

3.1.3.13 เครื่อง Brookfield รุ่น DVLVII+

3.1.3.14 เครื่อง Differential Scanning Calorimeter (DSC) รุ่น DSC 8000 PerkinElmer

3.2 การสกัดน้ำมันมะเล็ดมะม่วง

ทำการสกัดน้ำมันจากเมล็ดมะม่วงโดยประยุกต์จากกรรมวิธีของ Solís-Fuentes และ Durán-de-Bazúa (2004) ดังนี้

3.2.1 นำเนื้อในเมล็ดมะม่วงแต่ละสายพันธุ์ไปทำการอบด้วยตู้อบสุญญากาศที่อุณหภูมิ 65 °C จนกว่าจะมีความชื้นไม่เกิน 10%

3.2.2 นำเมล็ดที่อบแห้งแล้วมาบดให้ละเอียดและเก็บในถุง polyethylene ที่อุณหภูมิ 5 °C เพื่อรอกการนำไปใช้

3.2.3 นำผงเมล็ดมะม่วงจากแต่ละสายพันธุ์ที่บดไว้มาสกัดน้ำมันด้วยวิธี Soxhlet extraction โดยใช้ตัวทำละลายเป็นเฮกเซน (n-Hexane) ด้วยอัตราส่วน 1:3 (ผงเมล็ดมะม่วง:เฮกเซน) ที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นกำจัดตัวทำละลายออกโดยใช้ rotary evaporator

3.2.4 นำน้ำมันที่สกัดได้ไปทำให้บริสุทธิ์โดยประยุกต์ตามกรรมวิธีของ Wesson method ดังแสดงไว้ในภาคผนวก ก จากนั้นนำไปกรองที่อุณหภูมิ 65 °C ด้วยกระดาษกรอง (Whatman No.1 ขนาดของรูกรองเท่ากับ 11 µm) จำนวน 2 ชั้น เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ ~5 °C

3.2.5 หาปริมาณ (โดยน้ำหนัก) น้ำมันที่สกัดได้เพื่อหาเปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนัก) ของน้ำมันที่สกัดได้เทียบกับปริมาณของเมล็ดมะม่วงตั้งต้น

3.3 ชนิดและปริมาณของกรดไขมันและไตรกลีเซอไรด์ของน้ำมันเมล็ดมะม่วง

3.3.1 ชนิดและปริมาณของกรดไขมันของน้ำมันเมล็ดมะม่วงที่สกัดได้

ทำการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดไขมันของน้ำมันเมล็ดมะม่วงที่สกัดได้ด้วยเครื่อง GC-FID โดยใช้ Column VertiBondTM wax (stationary phase คือ 100% polyethyleneglycol ความยาว 50 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตร ความหนาของฟิล์ม 0.20 ไมโครเมตร) โดย

ปริมาณของกรดไขมันแต่ละชนิดที่วิเคราะห์ได้แสดงผลเป็นร้อยละของพื้นที่ใต้กราฟ เมื่อคิดเทียบให้ร้อยละของพื้นที่ใต้กราฟทั้งหมดเป็นร้อยละ 100 ซึ่งมีขั้นตอนการดำเนินงานดังนี้

3.3.1.1 เตรียมตัวอย่างเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน (fatty acid methyl ester) ตามกรรมวิธีของ AOAC (2000) ดังแสดงในภาคผนวก ข

3.3.1.2 ใช้สภาวะในการวิเคราะห์ คือ อุณหภูมิ injector เท่ากับ 210°C อุณหภูมิ FID เท่ากับ 280°C อุณหภูมิ oven เริ่มต้นที่ 120°C คงไว้ 3 นาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิขึ้นด้วยอัตรา $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ จนถึง 220°C คงไว้ 30 นาที และเพิ่มอุณหภูมิอีกครั้งด้วยอัตรา $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ จนถึง 240°C คงไว้ 30 นาที ใช้ฮีเลียม (He) เป็น carrier gas

3.3.1.3 วิเคราะห์ค่า retention time ของเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันมาตรฐานซึ่งใช้เป็น external standard ในการวิเคราะห์ชนิดของกรดไขมันที่พบในน้ำมันเมล็ดมะม่วงแต่ละสายพันธุ์ โดยใช้กรดไขมันมาตรฐาน ได้แก่ กรดลอริก (Lauric acid; $\text{C}_{12:0}$) กรดไมริสติก (Myristic acid; $\text{C}_{14:0}$) กรดปาล์มมิติก (Palmitic acid; $\text{C}_{16:0}$) กรดสเตียริก (Stearic acid; $\text{C}_{18:0}$) กรดโอเลอิก (Oleic acid; $\text{C}_{18:1}$) กรดลิโนเลอิก (Linoleic acid; $\text{C}_{18:2}$) กรดลิโนเลนิก (Linolenic acid; $\text{C}_{18:3}$) กรดอาราคิดิก (Arachidic acid; $\text{C}_{20:0}$) กรดบีฮีนิก (Behenic acid; $\text{C}_{22:0}$) กรดลิกโนเซริก (Lignoceric acid; $\text{C}_{24:0}$) ตามสภาวะในข้อ 3.3.1.2

3.3.1.4 หาดังประกอบและปริมาณเป็นร้อยละของพื้นที่ใต้กราฟของกรดไขมันที่เตรียมเป็นเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันตามข้อ 3.3.1.1 โดยเปรียบเทียบค่า retention time กับเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันมาตรฐานในข้อ 3.3.1.3

3.3.2 ชนิดและปริมาณของไตรกลีเซอไรด์ในน้ำมันเมล็ดมะม่วงที่สกัดได้

ทำการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของไตรกลีเซอไรด์ในน้ำมันเมล็ดมะม่วงด้วย HPLC-DAD โดยประยุกต์ใช้ตามกรรมวิธีของ Buchgraber และคณะ (2004) โดยใช้ Column เป็นแบบ reverse phase Inertsil[®] ODS-3 (5 ไมโครเมตร ขนาด 4.6×250 มิลลิเมตร จำนวน 2 column) Mobile phase คือ acetone : acetonitrile (75:25) diode array detector มีความยาวคลื่นเท่ากับ 210 นาโนเมตร Flow rate 0.75 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิคอลัมน์ที่ใช้เท่ากับ 30°C Injection volume 20 ไมโครลิตร โดยใช้ความเข้มข้นของตัวอย่างเท่ากับ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งอยู่ละลายใน acetone ทำการวิเคราะห์โดยเทียบค่า retention time กับไตรกลีเซอไรด์มาตรฐาน โดยปริมาณของไตรกลีเซอไรด์แต่ละชนิดที่วิเคราะห์จะแสดงผลเป็นร้อยละของพื้นที่ใต้กราฟ เมื่อคิดเทียบให้ร้อยละของพื้นที่ใต้กราฟทั้งหมดเป็นร้อยละ 100

3.4 การวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของน้ำมันเมล็ดมะม่วง

ทำการวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของน้ำมันเมล็ดมะม่วง 4 สายพันธุ์ โดยศึกษาคุณสมบัติต่างๆ โดยมีวิธีการและขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

3.4.1 วิเคราะห์ค่าสaponification value; Spv) ตามกรรมวิธีของ PORIM test method no. p3.1 (1995) ดังแสดงในภาคผนวก ค โดยกลีเซอรไรด์ทั้งหมดจะถูกไฮโดรไลซ์เป็นกรดไขมัน และกลีเซอรอลด้วยแอลกอฮอล์อัลคาไลน์ (alcoholic alkali; KOH in ethanol) และกรดไขมันอิสระจะถูกทำให้เป็นกลางและเกิดสบู่ จากนั้นอัลคาไลน์ส่วนเกินจะถูกไทเทรตกลับด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) โดยใช้ 1% ฟีนอล์ฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ แล้วคำนวณค่า Spv ตามสมการดังนี้

$$Spv = \frac{(B - A)}{W} \times N \times 56.1$$

เมื่อ A = ปริมาณของ 0.5 N HCl ที่ใช้ในการไทเทรตตัวอย่าง (ml)

B = ปริมาณของ 0.5 N HCl ที่ใช้ในการไทเทรต Blank (ml)

W = น้ำหนักของตัวอย่าง (g)

N = ความเข้มข้นของ HCl (N)

56.1 = น้ำหนักโมเลกุลของ KOH

Saponification Value หน่วยเป็น mg/g KOH

3.4.2 วิเคราะห์ค่าไอโอดีน (Iodine value; Iv) ตามกรรมวิธีของ AOCS Recommended Practice Cd 1b -87 (1997) ดังแสดงในภาคผนวก ง

3.4.3 วิเคราะห์ค่าความเป็นกรด (Acid value; A.V.) โดยประยุกต์ตามวิธีของ AOCS (1989) ดังแสดงในภาคผนวก จ โดยกรดไขมันอิสระจะถูกทำให้เป็นกลางหรือทำให้เกิดสบู่ด้วยการไทเทรตกับสารละลายมาตรฐาน 0.1 N โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) โดยใช้ 1% ฟีนอล์ฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ แล้วคำนวณค่า A.V. ตามสมการดังนี้

$$Acid\ Value = \frac{V \times 5.61}{W}$$

เมื่อ V = ปริมาณของ 0.1 M KOH ที่ใช้ในการไทเทรตตัวอย่าง (ml)

W = น้ำหนักของตัวอย่าง (g)

1 ml ของ 0.1 M KOH = 5.61 mg KOH

3.4.4 วิเคราะห์ค่าความหนืด (viscosity) โดยเครื่อง Brookfield ที่อุณหภูมิตัวอย่าง 30°C ด้วยความเร็ว 50 rpm ด้วยหัววัดชนิด S34 โดยนำน้ำมันตัวอย่างมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60°C นาน 10 นาที จากนั้นลดอุณหภูมิจนถึง 30°C โดยการปล่อยให้เย็นลงตามสภาวะปกติ

3.4.5 วิเคราะห์ค่าสี (color) โดยใช้ Colormeter Color-view™ Spectrophotometer Model:9000 D65 ซึ่งจะวัดค่า L^* , a^* และ b^* โดยวัดตัวอย่างที่อุณหภูมิของตัวอย่าง 20°C ทำได้โดยนำน้ำมันตัวอย่างไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60°C นาน 10 นาที จากนั้นเทใส่ plate ที่มีพื้นราบเรียบโดยเทให้น้ำมันมีความสูงประมาณ 5 มิลลิเมตร จากนั้นนำไปเก็บในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 20°C นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวัดค่าสี และการวัดตัวอย่างที่อุณหภูมิตัวอย่าง 30°C ทำได้โดยนำน้ำมันตัวอย่างมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60°C นาน 10 นาที จากนั้นลดอุณหภูมิจนถึง 30°C โดยการปล่อยให้เย็นลงตามสภาวะปกติ จากนั้นนำมาวัดค่าสี

3.4.6 วิเคราะห์จุดหลอมเหลวแบบ slip melting point ตามกรรมวิธีของ PORIM test method no. p4.2, 1995 ดังแสดงในภาคผนวก ฉ

3.4.7 วิเคราะห์ปริมาณไขมันที่เป็นของแข็ง (% solid fat content; SFC) และพฤติกรรมการหลอมเหลวด้วยเครื่อง pulsed-Nuclear Magnetic Resonance (p-NMR) ประยุกต์ตามวิธีของ AOCS: direct method (2000) ที่อุณหภูมิตั้งแต่ $15-40^{\circ}\text{C}$ ด้วยกรรมวิธีดังแสดงในภาคผนวก ช ซึ่งจะได้กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง SFC (%; แกน y) กับอุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$; แกน x)

3.4.8 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิของการตกผลึกและการหลอมเหลวของน้ำมันจากมะม่วงแต่ละสายพันธุ์ที่สกัดได้ โดยใช้เครื่อง differential scanning calorimeter (DSC) รุ่น DSC 8000 PerkinElmer ตามกรรมวิธีของ AOCS (2000) ด้วยกรรมวิธีดังแสดงในภาคผนวก ซ

3.5 การศึกษาพฤติกรรมการตกผลึกของน้ำมันเมล็ดมะม่วง

3.5.1 ศึกษารูปร่างผลึก การเปลี่ยนแปลงรูปร่างผลึก จำนวนและขนาดเฉลี่ยของผลึกตามเวลาโดยใช้เครื่อง Polarized Light Microscopy (PLM) ร่วมกับกล้องถ่ายภาพดิจิทัลและกำลังขยายของเลนส์วัตถุเท่ากับ 40x

ในขั้นตอนแรกของการทดลองจะมีการให้ความร้อนกับน้ำมันเมล็ดมะม่วงที่อุณหภูมิ 60°C นาน 10 นาที เพื่อทำลายโครงสร้างผลึกส่วนที่เป็นของแข็ง (memory effect) ให้หมดไป จากนั้นลดอุณหภูมิลงมาเพื่อให้เกิดการตกผลึกที่อุณหภูมิ 20°C ในสภาวะนิ่ง (ไม่มีการปั่นกววน) โดยเก็บในตู้บ่มที่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ เริ่มจับเวลาและให้เวลาที่ใช้ในการตกผลึกเป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยจะถ่ายภาพที่อุณหภูมิ 20°C ทุกๆ 5 นาที จนถึงนาฬิกาที่ 60 จากนั้นถ่ายภาพทุกๆ 10 นาที จนครบ 120 นาที ทั้งในระหว่างการทดลองต้องมีการควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ตลอดเวลา ($\pm 0.2^{\circ}\text{C}$) เพื่อไม่ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของรูปร่าง จำนวนและขนาดของผลึก นำภาพที่ได้มาประมวลผลด้วยโปรแกรม Adobe® Photoshop เพื่อนับจำนวนและวัดขนาดเฉลี่ยของผลึก

นอกจากนี้ยังศึกษารูปร่างผลึก จำนวนและขนาดเฉลี่ยของผลึกเมื่อเก็บตัวอย่างไว้ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 20 และ 25°C หลังจากบ่ม 24 และ 48 ชั่วโมง (ทั้ง 2 อุณหภูมิ) นำมาส่องดูผลึกด้วย PLM ร่วมกับกล้องถ่ายภาพดิจิทัลและกำลังขยายของเลนส์วัตถุเท่ากับ x4 นำภาพที่ได้มาประมวลผลด้วยโปรแกรม Adobe® Photoshop เพื่อนับจำนวนและขนาดเฉลี่ยของผลึก

3.5.2 ศึกษาอัตราการตกผลึกและการเปลี่ยนแปลงของระดับการตกผลึกตามเวลา โดยใช้เครื่อง p-NMR ประยุกต์ใช้กรรมวิธีของ AOCS (2000) เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงของปริมาณไขมันที่เป็นของแข็ง (Solid Fat Content; SFC) ที่อุณหภูมิ 20°C ตลอดระยะเวลา 2 ชั่วโมง เตรียมตัวอย่างน้ำมันใส่หลอดโดยให้ความร้อนกับตัวอย่างเพื่อให้เกิดหลอมเหลว (~60°C) จากนั้นบรรจุตัวอย่างขณะหลอมเหลวหลอด p-NMR (เส้นผ่านศูนย์กลาง 10 มิลลิเมตร) สูงประมาณ 4 เซนติเมตร จากนั้นนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปใส่ในเครื่อง p-NMR ที่มีการควบคุมอุณหภูมิของช่องใส่ตัวอย่างให้มีอุณหภูมิ 20°C เริ่มจับเวลาและทำการวัดค่า SFC ที่เวลาต่างๆ โดยวัดค่า SFC ทุกๆ 1 นาทีสำหรับ 20 นาทีแรก จากนั้นวัดทุกๆ 2 นาที จนครบ 2 ชั่วโมง เพื่อศึกษาระยะเวลาก่อนการเริ่มตกผลึก ความเร็วในการตกผลึกและระดับการตกผลึกสูงสุดจากค่า SFC ที่วัดได้ของน้ำมันเมล็ดมะม่วงแต่ละสายพันธุ์ โดยการสร้าง crystallization curve ซึ่งเป็นกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า %SCF (แกน y) กับเวลา (แกน x)

3.5.3 ศึกษาลักษณะโครงสร้างผลึกและการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างผลึกตามเวลาโดยใช้เครื่อง XRD โดยเก็บข้อมูลในช่วง 2θ เท่ากับ 18–26 องศา (step width เท่ากับ 0.02 องศา อัตราเร็ว เท่ากับ 4.5 องศา/นาที) ทำการติดตามการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างผลึกโดยให้ความร้อนกับน้ำมันที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นลดอุณหภูมิลงและคงไว้ที่อุณหภูมิ 20°C ทำการวิเคราะห์จนครบ 2 ชั่วโมง แล้วคำนวณค่า d-short spacing จากสมการแบรกก์ (1) ซึ่งมีค่าความยาวคลื่น (λ) ที่ใช้ในการคำนวณค่า d-short spacing เท่ากับ 1.5418 Å (Cu/K-alpha)

$$2d \sin \theta = n \lambda \quad (2)$$

3.6 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

การวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติแบบ Least Significant Difference (LSD) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($\alpha = 0.05$) โดยจำนวนซ้ำเท่ากับ 3