

บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

1. วัสดุ

- 1.1 เมล็ดลูกเดือยดิบ ตราไรท์พี จากร้านฮั่วเฟ่งพาณิชย์ ตลาดพริชาน อำเภอเมือง จังหวัดปทุมธานี
- 1.2 ซองเยื่อกระดาษ ขนาด 7.5 x 5 เซนติเมตรหนา 0.05 มิลลิเมตร
- 1.3 ถุงพลาสติกชนิดโพลีเอทิลีนความหนาแน่นสูง (HDPE) ขนาด 7.5 x 4 นิ้ว หนา 0.075 มิลลิเมตร

2. สารเคมี

- 2.1 อะซิโตน (Acetone) A.R. Grade
- 2.2 ปิโตรเลียมอีเทอร์ (Petroleum ether) A.R. Grade
- 2.3 ไดเอทิลอีเทอร์ (Diethyl ether) A.R. Grade
- 2.4 โซเดียมซัลเฟต (Sodium sulfate)
- 2.5 กรดซัลฟิวริก (Sulfuric acid) เข้มข้น 2 โมลต่อลิตร
- 2.6 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide) เข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร
- 2.7 กรดไขมันโอเลอิกมาตรฐาน ความบริสุทธิ์ 99.5%
- 2.8 กรดไขมันลิโนเลอิกมาตรฐาน ความบริสุทธิ์ 99.5%
- 2.9 กรดไขมันสเตียริก ความบริสุทธิ์ 99.5%
- 2.10 กรดไขมันปาล์มติก ความบริสุทธิ์ 97.0%
- 2.11 Diazomethane (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) ความบริสุทธิ์ 97%
- 2.12 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์โปรตีน
- 2.13 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ไขมัน
- 2.14 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์อาหาร

3. เครื่องมือและอุปกรณ์

- 3.1 อุปกรณ์สำหรับการผลิตชาลูกเดือยบรรจุในซองกระดาษและลูกเดือยอบแก้ว
- 3.2 เครื่องปั่นแห้ง
- 3.3 ตะแกรงร่อนขนาด 60 mesh
- 3.4 เครื่องวัดปริมาณน้ำตาลในอาหาร (Hand refractometer)

3.5 หม้อนึ่งความดัน

3.6 ถังถึงนึ่งอาหาร

3.7 เครื่องปิดผนึกถุงพลาสติก

4. เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์

4.1 ชุดกลั่น (Evaporator)

4.2 เครื่องกรองแบบลดความดัน (Suction)

4.3 กรวยแยก (Separatory Funnel) ขนาด 500 มิลลิลิตร

4.4 เครื่องบดละเอียด Retrach รุ่น SM 100

4.5 ตู้อบความชื้น

4.6 เครื่องปั่นของแข็ง (Blender)

4.7 เตาไฟฟ้าแบบ hot plate

4.8 เตาไฟฟ้าแบบหตุ้ม

4.9 เครื่องชั่งน้ำหนัก ทศนิยม 3 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Ohaus รุ่น GT 410

4.10 เครื่อง HP5890 Gas Chromatograph/HP5972 Mass Spectrometer ยี่ห้อ Hewlett-Packard

5. วิธีการทดลอง

5.1 ศึกษาผลของการให้ความร้อนและการคั่วในการผลิตชาลูกเดือย

5.1.1 การเตรียมวัตถุดิบ

แยกสิ่งสกปรกหรือเศษวัสดุที่ปนมากับลูกเดือย รวมทั้งเมล็ดที่เสียหรือมีตำหนิ ออกให้หมด ล้างทำความสะอาด 2-3 ครั้ง และพักให้สะเด็ดน้ำ

5.1.2 นำลูกเดือยดิบที่ได้ไปผ่านกรรมวิธีการให้ความร้อน เพื่อให้ลูกเดือยเกิดการพองตัว ก่อนนำไปทำการบดเป็นผง โดยวิธีการให้ความร้อนที่ศึกษา คือ

ก. การแช่น้ำร้อนและคั่วกับน้ำตาลทราย

นำลูกเดือยดิบ 100 กรัม แช่น้ำร้อนที่อุณหภูมิ 95+2 องศาเซลเซียส โดยใช้เวลาในการแช่น้ำร้อนและคั่วกับน้ำตาลทราย แบ่งเป็น 4 ชุดการทดลอง ได้แก่

1. ลูกเดือยดิบแช่น้ำร้อนนาน 15 นาที คั่วนาน 5 นาที
2. ลูกเดือยดิบแช่น้ำร้อนนาน 15 นาที คั่วนาน 15 นาที
3. ลูกเดือยดิบแช่น้ำร้อนนาน 30 นาที คั่วนาน 5 นาที
4. ลูกเดือยดิบแช่น้ำร้อนนาน 30 นาที คั่วนาน 15 นาที

ข. การต้มกับน้ำตาล

นำลูกเดือยดิบต้มกับน้ำเชื่อมความเข้มข้น 30 องศาบริกซ์ โดยใช้ น้ำหนักลูกเดือย: น้ำตาลทราย: น้ำ เท่ากับ 50:50:100 กรัม แล้วจึงนำไปคั่ว โดยแบ่งการทอดลงเป็น 4 ชุด คือ

1. ลูกเดือยดิบต้มนาน 15 นาที คั่วนาน 5 นาที
2. ลูกเดือยดิบต้มนาน 15 นาที คั่วนาน 15 นาที
3. ลูกเดือยดิบต้มนาน 30 นาที คั่วนาน 5 นาที
4. ลูกเดือยดิบต้มนาน 30 นาที คั่วนาน 15 นาที

5.1.3 นำลูกเดือยที่ผ่านกรรมวิธีให้ความร้อนด้วยวิธีการต่างๆ ไปอบให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นไฟฟ้า นาน 30 วินาที แล้วนำลูกเดือยผงที่ได้แต่ละตัวอย่างไปร่อนผ่านตะแกรงขนาด 60 mesh

5.1.4 นำลูกเดือยผงที่ได้นำบรรจุลงในซองเยื่อกระดาษ จำนวน 4 กรัม ต่อซอง เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ชาลูกเดือยบรรจุในซองเยื่อกระดาษ

5.1.5 ประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสด้านสี กลิ่น รสชาติ และความชอบรวมของผลิตภัณฑ์โดยใช้วิธี 9-point hedonic scale ซึ่งแสดงรายละเอียดของแบบประเมินในภาคผนวกที่ 1 มีผู้ประเมินคุณภาพ 14 คน วางแผนการทดลองแบบ Randomized complete block design (RCBD) เพื่อคัดเลือกผลิตภัณฑ์ชาลูกเดือยที่ให้ผลการยอมรับทางประสาทสัมผัสมากที่สุดไปทำการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

5.2 ศึกษากรรมวิธีการผลิตลูกเดือยฉาบแก้ว

5.2.1 การเตรียมวัตถุดิบ

แยกสิ่งสกปรกหรือเศษวัสดุที่ปนมากับลูกเดือย รวมทั้งเมล็ดที่เสียหรือมีตำหนิ ออกให้หมด ล้างทำความสะอาด 2-3 ครั้ง และพักให้สะเด็ดน้ำ

5.2.2 นำลูกเดือยดิบที่ได้มาผ่านขั้นตอนการให้ความร้อนโดยวิธีที่แตกต่างกัน เพื่อให้โครงสร้างโปรตีนของสตาร์ชในลูกเดือยถูกทำลายและเกิดลักษณะโปร่งพรุน ก่อนนำไปทำการฉาบน้ำตาล ดังนี้

ก. การนึ่งธรรมดา

นำลูกเดือยดิบ มานึ่งด้วยหม้อนึ่งที่อุณหภูมิ 95 ± 2 องศาเซลเซียส โดยใช้เวลาในการนึ่งนานแตกต่างกัน แบ่งเป็น 3 ชุดการทดลอง ได้แก่

1. ใช้เวลานึ่งนาน 20 นาที
2. ใช้เวลานึ่งนาน 25 นาที
3. ใช้เวลานึ่งนาน 30 นาที

แล้วจึงนำไปทำการฉาบน้ำตาลทราย โดยใช้ น้ำหนักของลูกเดือย: น้ำตาลทราย: น้ำ เท่ากับ 50:30:150 เพื่อให้ น้ำตาลละลายขณะให้ความร้อนและเกิดการตกผลึกเคลือบลูกเดือย

ข. การนึ่งในหม้อนึ่งความดันไอล

นำลูกเดี๋ยดิบมานึ่งในหม้อนึ่งความดันไอลที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 30 นาที โดยใช้เวลาในการนึ่งนานต่างกัน แบ่งเป็น 3 ชุดการทดลอง ได้แก่

1. ใช้เวลานึ่งนาน 20 นาที
2. ใช้เวลานึ่งนาน 25 นาที
3. ใช้เวลานึ่งนาน 30 นาที

แล้วจึงนำไปทำการนึ่งด้วยน้ำตาลทรายโดยใช้น้ำหนักของลูกเดี๋ย:น้ำตาลทราย:น้ำ เท่ากับ 50:30:150 เพื่อให้ น้ำตาลละลายขณะให้ความร้อนและเกิดการตกผลึกเคลือบลูกเดี๋ย

5.2.3 นำลูกเดี๋ยที่ได้มาทำการเคลือบน้ำตาลทราย โดยวิธีการเคลือบน้ำตาลแบบสองระยะตามวิธีของวัฒนา (2534) และเก็บในถุงพลาสติกโพลีเอทิลีนชนิดหนา ปิดผนึกให้สนิท

5.2.4 ทำการทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัส

5.3 ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในตัวอย่างลูกเดี๋ยดิบ ขาลูกเดี๋ยและลูกเดี๋ยนึ่งแล้ว

5.3.1 การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น โดยวิธี A.O.A.C. (2000)

5.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน โดยวิธี A.O.A.C. (2000)

5.3.3 การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน โดยวิธี A.O.A.C. (2000)

5.3.4 การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า โดยวิธี A.O.A.C. (2000)

5.3.5 การวิเคราะห์ปริมาณเยื่อใย โดยวิธี A.O.A.C. (2000)

5.3.6 การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรต โดยการคำนวณ

5.4. การศึกษาผลของสภาวะการสกัดน้ำมันจากลูกเดี๋ย

5.4.1 ศึกษาชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสม

สกัดน้ำมันจากลูกเดี๋ยบดละเอียดด้วยวิธีรีฟลักซ์ (reflux) ใช้ตัวทำละลาย

อินทรีย์ 3 ชนิดคือ อะซิโตน บีโตรเลียมอีเทอร์ และไดเอทิลอีเทอร์ ใช้อัตราส่วนวัตถุดิบ 100 กรัม ต่อตัวทำละลาย 300 มิลลิลิตร ระยะเวลาสกัดนาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ระเหยตัวทำละลาย แล้วเก็บตัวอย่างน้ำมันดิบที่สกัดได้เพื่อนำไปหาปริมาณน้ำมันโดยการชั่งน้ำหนัก วางแผนการทดลองแบบ CRD แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ การวิเคราะห์ข้อมูลใช้ Analysis of variance และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างชุดการทดลอง

5.4.2 ศึกษาอัตราส่วนของวัตถุดิบต่อตัวทำละลาย

สกัดน้ำมันจากลูกเดี๋ย โดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่คัดเลือกจากข้อ 5.4.1 มา

ศึกษาอัตราส่วนของวัตถุดิบต่อตัวทำละลาย (กรัมต่อมิลลิลิตร) ดังนี้คือ 100:200, 100:300 และ 100:400 ระยะเวลาสกัดนาน 5 นาที ระเหยตัวทำละลาย แล้วเก็บตัวอย่างน้ำมันดิบที่สกัดได้เพื่อนำไปหาปริมาณน้ำมันโดยการชั่งน้ำหนัก

วางแผนการทดลองแบบ CRD แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ การวิเคราะห์ข้อมูลทำเช่นเดียวกับข้อ 5.4.1

5.4.3 ศึกษาระยะเวลาในการสกัดที่เหมาะสม

ศึกษาระยะเวลาการสกัดน้ำมันจากลูกเคียวโดยใช้ตัวทำละลายที่ดีที่สุดที่คัดเลือกจากข้อ 5.4.1 และใช้อัตราส่วนวัตถุดิบต่อตัวทำละลายที่คัดเลือกได้จากข้อ 5.4.2 กำหนดระยะเวลาการสกัดนาน 5, 10, 30 และ 60 นาทีตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างน้ำมันดิบมาวิเคราะห์เพื่อเลือกระยะเวลาสกัดที่เหมาะสมโดยการหาปริมาณน้ำมันโดยการชั่งน้ำหนัก วางแผนการทดลองแบบ CRD แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ การวิเคราะห์ข้อมูลทำเช่นเดียวกับข้อ 5.4.1

5.4.4 ศึกษาจำนวนครั้งในการสกัดไขมันจากลูกเคียว

ศึกษาระยะเวลาการสกัดน้ำมันจากลูกเคียว โดยใช้ตัวทำละลายที่ดีที่สุดที่คัดเลือกจากข้อ 5.4.1 โดยใช้อัตราส่วนวัตถุดิบต่อตัวทำละลายที่คัดเลือกได้จากข้อ 5.4.2 และใช้ระยะเวลาที่ดีที่สุดในการสกัดตามข้อ 5.4.3 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส กำหนดจำนวนครั้งในการสกัดเป็น 1, 2 และ 3 ครั้ง ตามลำดับ เก็บตัวอย่างน้ำมันดิบมาหาปริมาณโดยการชั่งน้ำหนัก เพื่อเลือกระยะเวลาสกัดที่เหมาะสม วางแผนการทดลองแบบ CRD แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ การวิเคราะห์ข้อมูลทำเช่นเดียวกับข้อ 5.4.1

5.5. ศึกษาชนิดและปริมาณกรดไขมันในผลิตภัณฑ์เทียบกับลูกเคียวดิบ

5.5.1 ศึกษาชนิดและปริมาณกรดไขมันในลูกเคียว

นำตัวอย่างลูกเคียวหนัก 100 กรัม ทำการสกัดด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมจากข้อ 5.4.1 โดยใช้อัตราส่วนวัตถุดิบต่อตัวทำละลายที่คัดเลือกได้จากข้อ 5.4.2 และใช้ระยะเวลาที่ดีที่สุดในการสกัดตามข้อ 5.4.3 และจำนวนครั้งที่เหมาะสมในการสกัดจากข้อ 5.4.4 เก็บน้ำมันดิบที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณและชนิดกรดไขมันอิสระ ด้วยเทคนิค Gas Chromatography – Mass Spectrometry

5.5.2 ศึกษาชนิดและปริมาณกรดไขมันในลูกเคียวฉาบแก้วและชาลูกเคียว

นำลูกเคียวฉาบแก้วและชาลูกเคียวมาทำการสกัดตามวิธีในข้อ 3.5.4 โดยใช้ตัวอย่างเป็นลูกเคียวฉาบแก้วและชาลูกเคียวแทนเมล็ดลูกเคียวดิบ เก็บน้ำมันที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณและชนิดกรดไขมันอิสระ ด้วยเทคนิค Gas-Chromatography – Mass Spectrometry

ในการเตรียมตัวอย่างลูกเคียวฉาบแก้ว ทำโดยการนำลูกเคียวฉาบแก้วมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นไฟฟ้า เป็นเวลา 30 วินาที ส่วนชาลูกเคียวเตรียมในรูปของเหลว โดยการนำชาลูกเคียวบรรจุของ 4 กรัม ชงในน้ำร้อนปริมาตร 200 มิลลิลิตร นำไปประหย่น้ำบางส่วนออกใน water bath ที่อุณหภูมิ 60 องศา

เซลเซียส จนกระทั่งปริมาตรลดลงเหลือประมาณ 100 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งเย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงนำไปทำการสกัดน้ำมัน

ตัวอย่างน้ำมันที่สกัดได้จากลูกเดือยดิบและผลิตภัณฑ์จะถูกนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gas Chromatography-Mass Spectrometer (GC/MS) ณ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ เพื่อวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดไขมันที่มีอยู่ใน ลูกเดือยดิบและผลิตภัณฑ์ดังกล่าว

วิธีการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Gas Chromatography - Mass Spectrometer

ฉีดสารตัวอย่างที่ได้จากการสกัด ซึ่งอยู่ในรูปของสารละลายเมทิลเอสเทอร์ ปริมาณ 1 ไมโครลิตร เข้าเครื่อง Gass Chromatography - Mass Spectrometer (GC/MS) ผ่านคอลัมน์ HP-INNOWAX โดยมีสภาวะการวิเคราะห์ ดังนี้คือ

Column : HP-INNOWAX (INNOphaseTM - bondable Polyethylene Glycol)

Inlet temp: 250⁰ C

Oven temp: innitial temp. 70⁰C

ramp temp. 10⁰C/min

final temp. 240⁰ C 7 min

Mass Spectrometer :

Solvent delay: 4 min

Low mass: 50 m/z

High mass: 700 m/z

Scan rate: 1.15 scans/sec

Acquistion mode: Scan

เครื่องจะรายงานผลออกมาเป็น Peak ของกรดไขมันแต่ละชนิด ซึ่งสามารถหาชนิดของกรดไขมันดังกล่าว โดยเทียบจาก Peak ของกรดไขมันมาตรฐาน และหาปริมาณของกรดไขมันเป็นค่าความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร) จากการคำนวณพื้นที่ใต้ Peak ของกรดไขมันแต่ละชนิดเทียบกับกราฟของกรดไขมันมาตรฐาน (standard curve)