

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบ

แก่นตะวันสดสายพันธุ์ #2 จากร้านแก่นตะวันทอง จังหวัดนครราชสีมา อายุการเพาะปลูก 12 สัปดาห์

3.2 สารเคมี

- 3.2.1 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Merck, ประเทศเยอรมนี)
- 3.2.2 กรดซัลฟูริกเข้มข้น (Merck, ประเทศเยอรมนี)
- 3.2.3 แอนไฮดรัสโซเดียมซัลไฟต์ (Merck, ประเทศเยอรมนี)
- 3.2.4 โซเดียมคาร์บอเนต (Ajax Finechem, ประเทศออสเตรเลีย)
- 3.2.5 โซเดียมโพแทสเซียมทาเทต (Carlo Erba, ประเทศอิตาลี)
- 3.2.6 โซเดียมอะซิเตต (Ajax Finechem, ประเทศออสเตรเลีย)
- 3.2.7 ฟีนอล (Panreac Sintesis, ประเทศสเปน)
- 3.2.8 3,5-Dinitrosalicylic acid (Sigma-Aldrich, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- 3.2.9 น้ำตาลดี-ฟรุคโตส (Fluka, ประเทศเยอรมนี)
- 3.2.10 น้ำตาลกลูโคส (Fluka, ประเทศเยอรมนี)
- 3.2.11 น้ำกลั่น

3.3 อุปกรณ์

- 3.3.1 เครื่องอัลตราซาวด์โพรบ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของหัวโพรบ 13 มิลลิเมตร กำลังของคลื่นอัลตราซาวด์ 750 วัตต์และความถี่ของคลื่น 20 กิโลเฮิรซ์ (รุ่น VC750 บริษัท Sonics & Materials, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- 3.3.2 เครื่อง High performance anion exchange chromatography (HPAEC, (Dionex ICS-3000, ประเทศเยอรมนี)
- 3.3.3 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Genesys-10, Thermo Spectronic, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- 3.3.4 เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (รุ่น RC6 supertspeed, Sorvall, Thermo Scientific, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- 3.3.5 เครื่อง Karl Fischer titration (KF Titrino รุ่น 787 KF Titrino, 703 Ti Stand บริษัท Metrohm, ประเทศสวิตเซอร์แลนด์)
- 3.3.6 เครื่องชั่งน้ำหนัก ทศนิยม 4 ตำแหน่ง (BP 221S, Sartorius, ประเทศเยอรมนี)
- 3.3.7 ตู้บลมร้อน (รุ่น FD115, Binder, ประเทศเยอรมนี)
- 3.3.8 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (รุ่น D91126, Memmert, ประเทศเยอรมนี)
- 3.3.9 Aspirator pump พร้อมชุดกรอง
- 3.3.10 ตัวกรอง cellulose acetate ขนาด 0.2 ไมครอนเมตร
- 3.3.11 เครื่องแก้ว (ผลิตภัณฑ์ Schott Duran และ Kima)

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างหัวแค้นตะวันที่จัดซื้อไปล้างให้สะอาด ปอกเปลือก หั่นให้มีความหนา 3-5 มิลลิเมตร หลังจากนั้นนำไปอบเพื่อลดปริมาณความชื้นด้วยตู้อบลมร้อนแบบถาดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ จากนั้นนำมาบดด้วยเครื่องโม่บดแบบค้อน ร่อนผ่านตะแกรงร่อนให้มีขนาดอนุภาคไม่เกิน 100 ไมโครเมตร ปริมาณความชื้นของตัวอย่างแค้นตะวันผงที่วิเคราะห์ด้วยวิธี Karl Fischer มีค่าเท่ากับร้อยละ 6.87

3.4.2 การสกัดแค้นตะวันด้วยน้ำร้อน

3.4.2.1 ชั่งตัวอย่างแค้นตะวันผง 2 กรัม ใส่ลงขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร

3.4.2.2 นำมาวางในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เขย่าตลอดเวลา

3.4.2.3 นำของผสมที่ได้จากการสกัดมากรองเพื่อแยกของแข็งขนาดใหญ่ด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปเหวี่ยงแยกตะกอนที่ 12,000×g อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

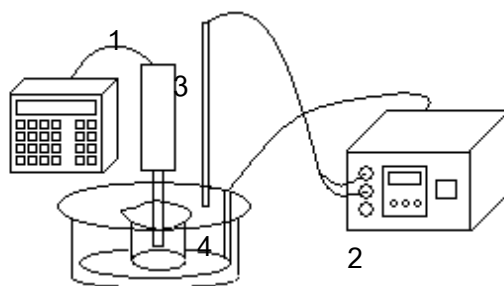
3.4.2.4 เก็บสารละลายตัวอย่างในขวดสีชาที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์

3.4.3 การพรีทรีตแค้นตะวันด้วยคลื่นอัลตราซาวด์ (Ultrasound Pretreatment)

3.4.3.1 ชั่งตัวอย่างแค้นตะวันผง 2 กรัม ใส่ลงขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร

3.4.3.2 นำหัวโพรบจุ่มลงในบีกเกอร์ลึกประมาณ ½ ของปริมาตรตัวอย่าง

3.4.3.3 ตั้งเวลา (1, 5 และ 10 นาที), แอมพลิจูด (20, 40, 60, 80 และ 100%) และอุณหภูมิ (25 และ 80 องศาเซลเซียส) ดังแสดงในภาพที่ 4



ภาพที่ 4 อุปกรณ์การสกัดอินนูลินที่ใช้ในการทดลอง

(1) อัลตราซาวด์โพรบ (2) เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (3) เทอร์โมคัปเปิล (4) อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

3.4.3.4 จากนั้นทำการทดลองตามข้อ 3.4.2.2, 3.4.2.3 และ 3.4.2.4

3.4.4 การสกัดแค้นตะวันด้วยอัลตราซาวด์ (Ultrasound-assisted Extraction)

3.4.4.1 ชั่งตัวอย่างแค้นตะวันผง 2 กรัม ใส่ลงขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร

- 3.4.4.2 นำหัวโพรบจุ่มลงในปิกเกอร์ลิคประมาณ 1/2 ของปริมาตรตัวอย่าง
- 3.4.4.3 ตั้งเวลา (10, 20 และ 30 นาที), แอมพลิฟาย (20, 40, 60, 80 และ 100%) และ อุณหภูมิ (25, 35 และ 45 องศาเซลเซียส)
- 3.4.4.4 จากนั้นทำการทดลองตามข้อ 3.4.2.3 และ 3.4.2.4
- 3.4.5 การวิเคราะห์ทางเคมี
 - 3.4.5.1 วิเคราะห์ปริมาณร้อยละของผลผลิตจากน้ำหนักรับได้ที่หลังการอบแห้งสารละลาย ที่ได้จากการสกัด
 - 3.4.5.2 วิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดด้วยวิธี Phenol-sulfuric ดังแสดงใน ภาพผนวก ก
 - 3.4.5.3 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid ดังแสดงในภาพผนวก ก
 - 3.4.5.3 วิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu Colorimetric ดังแสดง ในภาพผนวก ก
 - 3.4.5.4 วิเคราะห์ความยาวสายของคาร์โบไฮเดรตที่สกัดได้ด้วยวิธี HPAEC ดังแสดงใน ภาพผนวก ก
- 3.4.6 การวิเคราะห์ทางผลทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) เพื่อทดสอบอิทธิพลของอุณหภูมิ เวลา และ แอมพลิฟายที่ใช้ในการพรีทรีทและการสกัดด้วยอัลตราซาวด์ โดยวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของข้อมูลผล การศึกษาด้วยวิธี Tukey ที่ค่า $\alpha = 0.05$