

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมตัวอย่างและสกัดแยกแป้งจากเมล็ดทุเรียน

งานวิจัยจัดซื้อเมล็ดทุเรียนจากโรงงานแปรรูปในเขตจังหวัดในภาคตะวันออก หลังจากขนส่งมาที่ห้องปฏิบัติการ มาปอกเอาเมล็ดออก จากนั้นนำเมล็ดมาล้างทำความสะอาดภายนอกอย่างรวดเร็วด้วยน้ำกลั่น ปอกเปลือกทั้งชั้นนอกและลอกเยื่อหุ้มชั้นในออก และนำมาผ่านกระบวนการสกัดแยกแป้ง โดยดัดแปลงมาจากวิธีการของ Bobio et al. (1978) เพื่อให้เหมาะสมกับตัวอย่างเมล็ดทุเรียน โดยนำเมล็ดทุเรียนที่ปอกเปลือกออกแล้วมาปั่นผสมกับสารละลาย 0.5% NaHSO₃ ในสัดส่วน 1:1 โดยน้ำหนักเป็นเวลา 2 นาที ของเหลวแขวนลอย (slurry) ที่ได้จะนำมาแยกเยื่อใยที่ไม่ละลายน้ำที่เป็นองค์ประกอบในเมล็ดทุเรียนออกโดยบีบผ่านผ้าขาวบาง นำของเหลวสีขาวนมที่ได้มาวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อให้เกิดการแยกชั้นของเหลวออกจากของแข็ง กรองของแข็งออกโดยวิธีการ decantation ล้างด้วยน้ำกลั่นและ 80% เอทานอล ทำให้แห้งที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งของแข็งที่ได้มีค่าความชื้นน้อยกว่าร้อยละ 13 โดยน้ำหนัก หลังจากทำให้แห้งแล้วเก็บไว้ในถุงพลาสติกที่ปิดสนิทจนกว่าจะนำมาใช้งานต่อไป

การวิเคราะห์สมบัติของแป้งเมล็ดทุเรียน

1. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี (chemical analysis) ปริมาณความชื้น (moisture content) วิเคราะห์โดยหาน้ำหนักที่สูญเสียน้ำ (weight loss) โดยใช้แป้งตัวอย่าง 2 กรัม นำมาอบที่อุณหภูมิ 100 °C จนได้น้ำหนักคงที่ (Amiza et al., 2007) ปริมาณเถ้าทั้งหมด (total ash content) วิเคราะห์ตามวิธีการของ AOAC Official Method 923.03 (AOAC, 1990) ปริมาณโปรตีน และไขมัน วิเคราะห์ตามวิธีการของ AACC method 46-13 และ 30-25 ตามลำดับ (AACC, 1983)
2. สี (color) วิเคราะห์โดยใช้ Hunter Lab colorimeter รุ่น DP 9000 และใช้ standard plate no C2-38460 ที่มีค่า Y_{CIE} 83.21 X_{CIE} 81.26 และ Z_{CIE} 98.77 สำหรับ calibration เครื่องมือ บันทึกผลด้วยค่าพารามิเตอร์สี (color parameter) เป็น L* (degree of the lightness), a* (greenness/redness) และ b* (blueness/yellowness) คำนวณและรายงานผลด้วยค่า Hue angle ($H^\circ = \tan^{-1}(b^*/a^*)$) และ Chroma ($C = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$)

3. ปริมาณอะไมโลส (amylase content) วิเคราะห์โดยใช้ colorimetric method ตามวิธีการของ Juliano (1971) โดยใช้สารละลายมาตรฐานของอะไมโลสของมันฝรั่ง (potato amylase, type III) ในการเตรียมกราฟมาตรฐาน และอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร
4. ความหนืด (viscosity) วิเคราะห์ด้วยเครื่อง Rapid Visco Analyzer (RVA, model 3D; Newport Scientific Pty., New South Wales, Australia) โดยใช้แป้ง 3 กรัม (ความชื้น 14%) ในน้ำ 25 กรัม เป็นสารมาตรฐาน การวิเคราะห์ความหนืดจะให้ความร้อนกับสารละลายแป้งจนถึงอุณหภูมิ 95 °C จากนั้นจึงทำให้เย็นอุณหภูมิ 25 °C ในสภาวะที่อุณหภูมิห้อง และรายงานผลในรูปของ peak time (°C), pasting temperature (°C), peak viscosity, holding strength และ viscosity after holding at 95 °C และ final viscosity at the end of the test (RVU) และคำนวณหาค่า set back และ breakdown โดยใช้ RVA software version 2.1
5. มอร์ฟอโลยีของเม็ดแป้ง (starch granular morphology) วิเคราะห์โดยใช้เทคนิค scanning electron microscope (SEM) ด้วยเครื่อง LEO/1455 Vp โดยเคลือบด้วยทองที่ความหนา 50 นาโนเมตร และตรวจวัดในสภาวะ acceleration voltage 10 kV
6. เจลาติไนเซชัน (Gelatinization) วิเคราะห์โดยใช้เทคนิค DSC (differential scanning calorimeter) ด้วยเครื่อง PERKIN ELMER DSC7 ตามวิธีของ Kim (1995) และรายงานผลในรูปของ T_0 = onset temperature, T_p = peak temperature, T_c = conclusion temperature, R = gelatinization range $2(T_p - T_0)$, ΔH_{get} = enthalpy of gelatinization (dwb, based on starch weight), PHI = peak height index $\Delta H_{\text{get}} / (T_p - T_0)$
7. ความเสถียรและความโปร่งใส (stability and clarity) วิเคราะห์ตามวิธีของ Sanchez-Hernandez et al. (2002) โดยละลายแป้ง 5 กรัมในน้ำ 5 มล. ในหลอดทดลองที่มีฝาปิด ให้ความร้อนในอ่างน้ำเดือด 60 นาที โดยเขย่าขวดทุก 5 นาที หลังจากทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง (15 นาที) นำไปวัด % Transmittance (%T) ที่ 650 นาโนเมตร จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 °C) และที่ 4 °C และนำมาตรวจวัดค่า %T ที่เวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง
8. ประสิทธิภาพในการอุ้มน้ำ (water retention capacity) วิเคราะห์ตามวิธีการของ Bryant and Hamaker (1997) โดยเติมน้ำลงในแป้งที่ชั่งน้ำหนักที่แน่นอนพร้อมหลอดเซ็นตริฟิวจ์ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปให้ความร้อนที่ 60, 70, 80 และ 90 °C เป็นเวลา 15 นาที โดยเขย่าทุก 5 นาที จากนั้นจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1000x g เป็นเวลา 15 นาที เทน้ำใสออกและตั้งหลอดให้ท่ามุม 45 องศาทิ้งไว้เพื่อกำจัดน้ำที่หลงเหลืออีก 10 นาที จากนั้นชั่งน้ำหนักหลอดอีกครั้ง น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นจะถูกใช้เพื่อคำนวณหาค่าประสิทธิภาพในการอุ้มน้ำ

9. การพองตัว (swelling capacity) วิเคราะห์ตามวิธีการของ Sanchez-Hernandez et al. (2002) โดยใช้สารละลายแป้งที่ความเข้มข้น 1% (w/w) ในขวดรูปชมพู่ (flask) ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 50, 60, 70 80 และ 90 °C เป็นเวลา 30 นาที โดยเขย่าทุก 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5000 x g เป็นเวลา 10 นาที รินน้ำใสออกและนำไปอบแห้งจนตะกอนที่ได้มีน้ำหนักคงที่ ทำให้เย็น ชั่งน้ำหนักตะกอนแล้วนำไปคำนวณหาค่าการพองตัว

การเตรียมสารละลายแป้งจากเมล็ดทุเรียนและการขึ้นรูปฟิล์ม

สารละลายแป้งที่ใช้สำหรับการเตรียมฟิล์มสามารถเตรียมได้โดยดัดแปลงจากวิธีการเตรียมของ Bae et al. (2008) โดยใช้แป้งเม็ดทุเรียนที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ผสมกับกลีเซอรอลซึ่งใช้เป็นพลาสติกไซเซอร์ (ในช่วงความเข้มข้นร้อยละ 20, 30, 40 และ 50 โดยน้ำหนักของแป้งเม็ดทุเรียน) ในสารละลาย 10% citric acid และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 ± 5 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมงในอ่างน้ำร้อน (water bath) นำมาทำให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้อง (25 ± 2 °C, $50 \pm 5\%$ RH) จากนั้นจึงนำมาขึ้นรูปตามวิธีการของ Pimpa and Pongkhongkaew (2008) หลังจากลอกฟิล์มออกแล้วนำมาเก็บที่อุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ที่คงที่เป็นเวลา 48 ชั่วโมงก่อนนำไปวิเคราะห์หาสมบัติต่อไป

สำหรับการศึกษาเพื่อเพิ่มความแข็งแรงและความยืดหยุ่นของฟิล์มโดยการเตรียมเป็นฟิล์มคอมโพสิต (composite film) ในงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้โดยใช้คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (carboxymethylcellulose; CMC) เจลาติน (gelatin) คาราจีแนน (caragenan) และเพคติน (pectin) ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 5 และ 10 โดยน้ำหนักของแป้งเม็ดทุเรียน

การวิเคราะห์สมบัติของฟิล์ม

1. ความหนาของฟิล์ม (Film thickness) วิเคราะห์ได้โดยใช้ caliper micrometer โดยเลือกวัดที่ 10 ตำแหน่งของฟิล์มรอบ ๆ แผ่นฟิล์ม
2. สี (color) ของฟิล์มรายงานผลด้วยค่าพารามิเตอร์สี L-a-b scale โดยตรวจวัดด้วยเครื่อง Hunter colorimeter และ standardize เครื่องก่อนใช้ด้วย white plate (No. C6664) และ grey plate (No. C6664G) (Bae et al., 2008)
3. การต้านทานแรงดึงขาด (Tensile strength) และการยืดตัว (elongation-at-break) ของฟิล์มตรวจวัดโดยใช้เครื่อง Instron Model 4414 (Canton, MA, USA) โดยใช้ชิ้นฟิล์มที่มีขนาด 2.5×10 เซนติเมตร ใช้หัวทดสอบแบบ tension ซึ่งเป็นหัวทดสอบที่มีลักษณะเป็นหัวหนีบ 2 หัว ตามวิธีการมาตรฐานในการวัด tensile properties ของ พลาสติกแผ่นบาง (thin plastic sheeting) ASTM method D882-95; ASTM 1995) โดยใช้ระยะห่างระหว่างหัววัด (initial grip distance) 80

มิลลิเมตร และ ความเร็วของหัววัด (crosshead speed) 10 มม./นาที ค่า tensile strength at maximum (TS) และ percentage elongation at break (%E) ได้จากการวัดทั้งหมด 6 ซ้ำของแผ่นฟิล์มเดียวกัน ถ้าชิ้นตัวอย่างเลื่อนหรือขาดตรงขอบที่ยึดขณะทดสอบ แสดงว่ามีแรงตามแนวกว้างของชิ้นตัวอย่างไม่สม่ำเสมอ ให้ตัดค่าที่อ่านได้ทิ้งไป

4. ความโปร่งแสง (Transparency) ของฟิล์ม ตรวจวัดได้โดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ตามวิธีการของ Han and Floros (1997) ซึ่งปรับปรุงมาจากวิธีการของ ASTM method D1746-92 ซึ่งเป็นวิธีการมาตรฐานสำหรับการวัดความโปร่งแสงของแผ่นพลาสติกบาง และสามารถคำนวณหาค่าการโปร่งแสงของฟิล์มได้หลังจากการวัดค่าความหนาของฟิล์ม และค่าร้อยละของการส่งผ่าน (% transmittance) หรือค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (T600 or A600) และคำนวณโดยใช้สมการดังนี้

$$\text{Transparency} = A_{600} / b \text{ or } (\log T_{600}) / b$$

เมื่อ T600 = ค่าการส่งผ่านที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร A600 = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และ b เป็นความยาวทางเดินแสงผ่านสารตัวอย่าง (ความหนาของฟิล์ม)

5. การแพร่ผ่านของไอน้ำ (Water vapor permeability) วิเคราะห์โดยวิธีการที่ปรับปรุงมาจาก ASTM E 96-80 procedure desiccant method (ASTM, 1998) และของ Perez-Gago et al. (1999) โดยใช้ฟิล์มที่ขึ้นรูปแห้งดีแล้ว ตัดแผ่นฟิล์มให้เป็นวงกลมเส้นผ่าศูนย์กลาง 70 มิลลิเมตร โดยตัวอย่างต้องปราศจากรอยพับ ซีด รุ่ยที่มองเห็นได้ ออกนำมาปิดปากถ้วยที่บรรจุน้ำกลั่น จากนั้นนำไปวางไว้ในโถดูดความชื้น (desiccator) ที่บรรจุซิลิกาเจลเพื่อทำหน้าที่ควบคุมค่า RH ภายในโถดูดความชื้นให้มีค่าเท่ากับ 0%RH และอุณหภูมิ 25 ± 5 องศาเซลเซียส ทำการชั่งน้ำหนักของถ้วย บันทึกการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาคำนวณหาการแพร่ผ่านของไอน้ำ

$$\text{Water transmission rate (WVTR)} = \frac{(G/t)}{A}$$

$$\text{Water vapor permeability (WVP)} = \text{Permanence} \times \text{thickness of film}$$

$$\text{Permanence} = \frac{WVTR}{\Delta P} = \frac{WVTR}{S(R_1 - R_2)}$$

เมื่อ WVTR = อัตราการแพร่ผ่านของไอน้ำ (กรัมต่อตารางเมตร . ชั่วโมง) G/T = อัตราการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักต่อเวลา A = พื้นที่ตัวอย่าง (ตารางเมตร) WVP = การแพร่ผ่านของไอน้ำ (กรัม . มิลลิเมตรต่อตารางเมตร . ชั่วโมง . กิโลปาสคาล) S = ความดันไอของไอน้ำที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส = 23.73 มิลลิเมตรปรอท (1.333×10^2 ปาสคาล = 1 มิลลิเมตรปรอท) $R_1 =$

ความชื้นสัมพัทธ์ของบรรยากาศในเดซิกเคเตอร์ = 0%RH และ R_2 = ความชื้นสัมพัทธ์ภายในถ้วยทดสอบ = 100%RH

6. การละลายได้ (Solubility) วิเคราะห์โดยตัดฟิล์มเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้าขนาด 7.5 มม. x 15 มม. นำมาทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 100°C จนได้น้ำหนักคงที่ ซึ่งน้ำหนักเริ่มต้นที่แน่นอน นำมาใส่ในหลอดทดลองที่บรรจุน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง นำชิ้นฟิล์มที่เหลือนำมาทำให้แห้งอีกครั้งโดยอบที่อุณหภูมิ 70 °C จนกว่าน้ำหนักคงที่ รายงานค่าการละลายได้ของฟิล์มโดยคำนวณหาค่าร้อยละขององค์ประกอบที่ละลายได้ทั้งหมดในฟิล์ม (total soluble matter; SM) ในฟิล์มหาได้จากสมการดังนี้

$$\%SM = \left[\frac{(Initial\ dry\ wt - Final\ dry\ wt)}{Initial\ dry\ wt} \right] \times 100$$

การเตรียมแคปซูลยาแบบแข็ง

การเตรียมแคปซูลยาแบบแข็งอย่างง่าย ทำได้โดยใช้วิธีการ dip-coating โดยดัดแปลงมาจากวิธีการของ Bae et al. (2008) โดยเตรียมสารละลายแป้งเม็ดทุเรียนที่มีองค์ประกอบและสภาวะที่ใช้เช่นเดียวกับการเตรียมฟิล์มดังกล่าวข้างต้น (ยกเว้นมีแป้งเม็ดทุเรียนเป็นองค์ประกอบที่ร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ทำให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง และลอกออกจากแม่แบบ (template) เพื่อนำไปทดสอบการละลาย (dissolving test) เพื่อทราบสมบัติการละลายของแคปซูลว่าสามารถละลายได้ดีในสารละลายที่เป็นกลางหรือเป็นกรดเล็กน้อยภายในเวลา 10 นาที โดยดัดแปลงมาจากวิธีการวิเคราะห์ของ Korea Pharmacopoeia (2002)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวางแผนการวิจัยเป็นแบบ completely randomized design (CRD) โดยทำการทดลองทำ 3 ซ้ำ และรายงานผลเป็นค่าเฉลี่ย (mean) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) ของแต่ละชุดข้อมูล ทุกการทดลองใช้สารเคมีที่มีความบริสุทธิ์สูง (Analytical grade) วิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธีการแปรปรวนทางเดียว (One way analysis of variance) โดยใช้โปรแกรม SPSS กรณีที่ผลทดสอบทางสถิติพบนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 จะใช้การเปรียบเทียบความแตกต่างรายคู่ด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) เพื่อวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ย สำหรับข้อมูลที่มีความสำคัญจะทำการทดลองซ้ำเพื่อยืนยันผลการทดลองที่ได้