



บทที่ 3

การดำเนินงานวิจัย

3.1 ขอบเขตงานวิจัย

งานวิจัยแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ได้แก่

3.1.1 ศึกษาการวิเคราะห์สาร 2AP และ n-hexanal ด้วยเทคนิค SPME-GC-MS

ก. ศึกษาการหาภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณสาร 2AP และ n-hexanal ด้วยเทคนิค GC-MS

งานวิจัยในส่วนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณสาร 2AP และ n-hexanal ด้วยเทคนิค GC-MS และนำภาวะที่ได้ไปใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสาร 2AP และ n-hexanal ด้วยเทคนิค SPME-GC-MS ต่อไป

ข. ศึกษาการสกัดสาร 2AP และ n-hexanal จากข้าวด้วย SPME และการวิเคราะห์ปริมาณสาร 2AP และ n-hexanal ด้วยเทคนิค SPME-GC-MS

งานวิจัยในส่วนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการสกัดสาร 2AP และ n-hexanal จากข้าวด้วย SPME และการวิเคราะห์ปริมาณสาร 2AP และ n-hexanal ด้วยเทคนิค SPME-GC-MS

3.1.2 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและทางกายภาพของข้าวกล้องหอมสุพรรณบุรี เคลือบเจลแป้งข้าวร่วมกับการใช้บรรจุภัณฑ์

ก. ศึกษาผลของการเคลือบข้าวด้วยเจลแป้งข้าวและการใช้บรรจุภัณฑ์ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและทางกายภาพของข้าวกล้องหอมสุพรรณบุรี ในระหว่างการเก็บ

งานวิจัยในส่วนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณความชื้น ค่า water activity ปริมาณสาร 2AP ปริมาณสาร n-hexanal ค่าสีเหลือง (b) และดัชนีความขาวของข้าวกล้องหอมสุพรรณบุรีเคลือบเจลแป้งข้าวในบรรจุภัณฑ์ต่างชนิดในระหว่างการเก็บรักษา

ข. การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของข้าวกล้องเคลือบ

งานวิจัยในส่วนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสทางด้านสีและกลิ่นของข้าวกล้องเคลือบในระหว่างการเก็บรักษา

3.2 ขั้นตอนและวิธีดำเนินงานวิจัย

3.2.1 ศึกษาการวิเคราะห์สาร 2AP และ n-hexanal ด้วยเทคนิค SPME-GC-MS

ก. ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณสาร 2AP และ n-hexanal ด้วยเทคนิค GC-MS

การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS นั้น GC-MS เป็นส่วนสำคัญที่จะทำการแยกและวิเคราะห์สารตัวอย่าง ดังนั้นจึงจำเป็นต้องศึกษาภาวะที่เหมาะสมของการแยกสารระเหยจากตัวอย่างด้วย GC-MS โดยการทดลองใช้เครื่อง GC รุ่น TraceGC Ultra และ detector เป็นเครื่อง MS รุ่น Polaris Q ของบริษัท Thermo Finnigan ใช้คอลัมน์แบบ capillary ชนิด AT™-WAX (polyethylene glycol) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.25 mm ความยาว 60 m ความหนาของ liquid phase 0.25 μm และใช้ก๊าซฮีเลียมเป็น carrier gas แบ่งเป็น 4 การทดลองดังนี้

(1) การศึกษาโปรแกรมอุณหภูมิ (Temperature programming) ที่เหมาะสมในการแยกสาร 2AP n-hexanal และ 2,4,6-trimethylpyridine (TMP) ซึ่งสาร TMP เป็นสารมาตรฐานภายในที่ใช้ในการสกัดสารด้วย SPME

การทดลองใช้สารมาตรฐานผสมของ n-hexanal (2.5 ppm) TMP (5 ppm) และ 2AP (2AP เป็นสาร บริสุทธิ์ที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมีแต่ไม่ทราบความเข้มข้นเริ่มต้นที่แน่นอน) ในตัวทำละลาย iso-propanol (วิธีการเตรียมสารละลายแสดงในภาคผนวก ข.1) ฉีดสารมาตรฐานผสมปริมาณ 1 μl ลงเครื่อง GC-MS ด้วย syringe ขนาด 10 μl โดยภาวะของเครื่องที่ใช้ทดลองมี 4 แบบและโปรแกรมอุณหภูมิที่ใช้ในการแยกสารแบ่งออกเป็น 3 ramps ดังแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ภาวะของเครื่อง GC-MS 4 แบบสำหรับใช้ในการแยกสาร 2AP n-hexanal และ TMP

parameter	แบบที่ 1	แบบที่ 2	แบบที่ 3	แบบที่ 4
เครื่อง GC				
- อุณหภูมิของตัวนำสารเข้า	200°C	200°C	200°C	200°C
- โปรแกรมอุณหภูมิของคอลัมน์				
<u>ramp ที่ 1</u>				
อุณหภูมิเริ่มต้น	35°C	45°C	45°C	45°C
อุณหภูมิสุดท้าย	50°C	80°C	80°C	80°C
อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ	2°C/min	3°C/min	3°C/min	3°C/min
<u>ramp ที่ 2</u>				
อุณหภูมิเริ่มต้น	50°C	80°C	80°C	80°C
อุณหภูมิสุดท้าย	100°C	120°C	120°C	120°C
อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ	3°C/min	4°C/min	5°C/min	5°C/min
<u>ramp ที่ 3</u>				
อุณหภูมิเริ่มต้น	100°C	120°C	120°C	120°C
อุณหภูมิสุดท้าย	180°C	180°C	180°C	180°C
อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ	5°C/min	5°C/min	10°C/min	20°C/min
- อัตราการไหลของก๊าซฮีเลียม	1ml/min	1ml/min	1ml/min	1ml/min
- mode ที่ใช้ในการฉีด	splitless	splitless	splitless	splitless
เครื่อง MS				
- อุณหภูมิของส่วนเชื่อมต่อ	280°C	280°C	280°C	280°C
- พลังงานเฉลี่ยของอิเล็กตรอน	70 eV	70 eV	70 eV	70 eV
- อุณหภูมิของแหล่งผลิตไอออน	230°C	230°C	230°C	230°C
- scan mode	full scan	full scan	full scan	full scan
	โดยมีช่วงมวล	โดยมีช่วงมวล	โดยมีช่วงมวล	โดยมีช่วงมวล
	ต่อประจุ	ต่อประจุ	ต่อประจุ	ต่อประจุ
	เท่ากับ 35-	เท่ากับ 35-	เท่ากับ 35-	เท่ากับ 35-
	200 amu*	200 amu	200 amu	200 amu

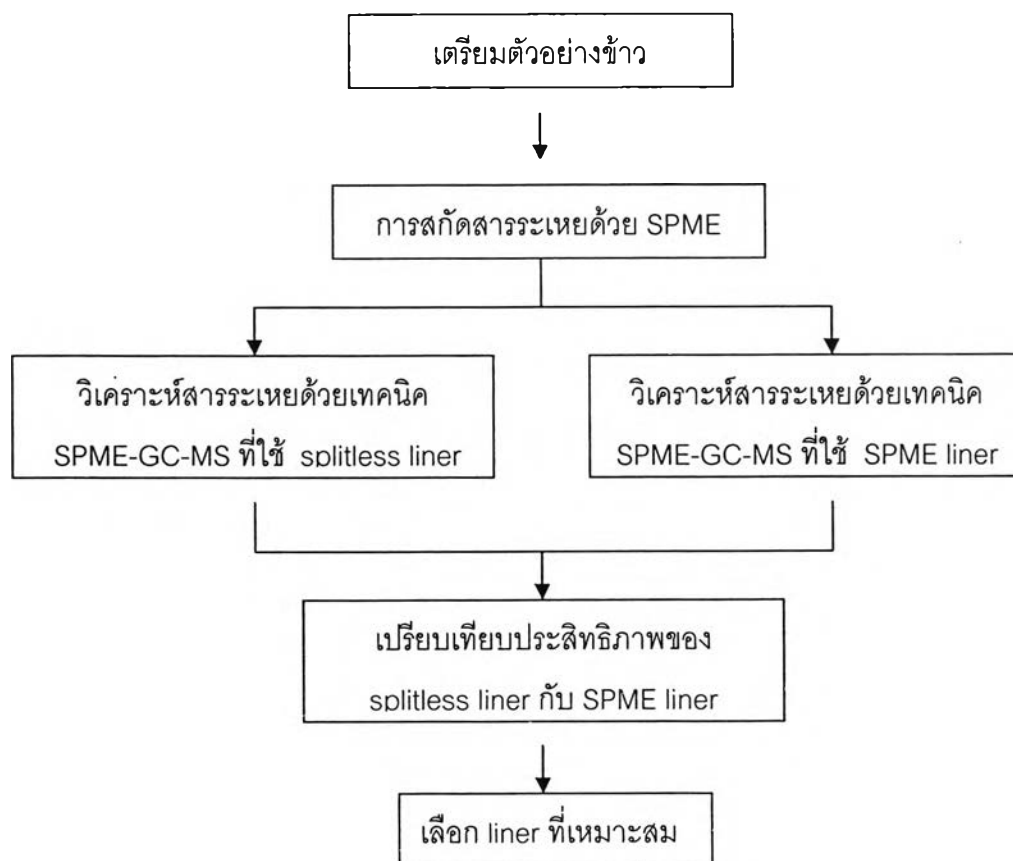
*amu = atomic mass units

(2) การเลือกช่วงมวลต่อประจุ (mass range) ที่เหมาะสม

การทดลองใช้สารมาตรฐาน 2AP ที่ความเข้มข้นแน่นอนในตัวทำละลาย iso-propanol (วิธีการเตรียมสารละลายแสดงในภาคผนวก ข.1) ฉีดสารมาตรฐาน 2AP ปริมาณ 1 μl ลงเครื่อง GC-MS ด้วย syringe ขนาด 10 μl โดยใช้ภาวะของเครื่อง GC-MS ที่ดีที่สุดจากการทดลองในข้อ (1) โดยทดลองช่วงมวลต่อประจุ 2 ช่วง คือ 35-200 amu และ 35-600 amu ซึ่งช่วงมวลต่อประจุ 35-200 amu เป็นช่วงมวลต่อประจุที่ครอบคลุมมวลของสาร 2AP แต่ช่วงมวลต่อประจุ 35-600 amu เป็นช่วงมวลต่อประจุที่ครอบคลุมมวลของสาร 2AP และสารปนเปื้อนที่มาจากตัวทำละลาย column และ liner

(3) การเลือก liner ที่เหมาะสม

ในงานวิจัยนี้ต้องการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ splitless liner (มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 5 mm) กับ SPME liner (มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.8 mm) เพื่อใช้ในการเลือก liner ที่จะนำมาใช้ในการทดลองต่อไปโดยมีขั้นตอนการเลือก liner แสดงในรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 ขั้นตอนการเลือก liner ที่เหมาะสม

การเตรียมตัวอย่างข้าวและการสกัดสารระเหยจากข้าวใช้วิธีของ Wongpornchai และคณะ (2004) ซึ่งใช้ SPME fiber ชนิด polydimethylsiloxane (PDMS) ความหนา 100 μm แต่งานวิจัยนี้ดัดแปลงเป็น SPME fiber ชนิด 50 μm divinylbenzene(DVB)/30 μm carboxen /polydimethyl- siloxane (PDMS) stable flex รายละเอียดขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างข้าวและการสกัดสารระเหยจากข้าวมีดังนี้

- บดข้าวสารพันธุ์ชัยนาท 2 ให้ละเอียด ร่อนข้าวผ่านตะแกรงขนาด 45 mesh แล้วชั่งข้าว 5.000 กรัมใส่ขวด headspace (HS) ขนาด 27 ml ปิดเต็สารละลายของสารมาตรฐาน TMP ความเข้มข้น 5 ppm ปริมาณ 1 μl ด้วย syringe ลงไปบนผิวข้าว จากนั้นปิดฝาขวด HS ด้วย silicone/PTFE septum และฝาอลูมิเนียม โดยใช้ crimper อัดฝาให้สนิท
- ตั้งขวด HS ไว้ในอุณหภูมิห้องนาน 30 นาที
- นำขวด HS ที่มีตัวอย่างข้าวไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 140°C เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นดูดซับสารระเหยจากข้าวด้วย SPME fiber ชนิด 50 μm divinylbenzene(DVB)/30 μm carboxen /polydimethylsiloxane(PDMS) stable flex เป็นเวลา 10 นาที ภายใต้อุณหภูมิ 140°C
- นำ SPME fiber ที่ดูดซับสารระเหยเรียบร้อยแล้วไปวิเคราะห์ต่อกับ GC-MS โดยทำ desorption เป็นเวลา 5 นาที

ใช้ภาวะของเครื่อง GC-MS ที่ดีที่สุดจากการทดลองข้อ (2) แต่แบ่งการ scan ของเครื่อง MS ใน segment เดียวกันเป็น 2 scan events คือ scan event 1 ใช้ full scan mode มีช่วงมวลต่อประจุ 35-200 amu และ scan event 2 ใช้ SIM mode โดยเลือกมวล 79 และ 121 (มวลที่เป็นเอกลักษณ์ของ TMP) ประเมิน sensitivity ของเครื่องเพื่อหา liner ที่เหมาะสม

(4) การศึกษา scan mode ที่เหมาะสม

เตรียมตัวอย่างข้าว การสกัดและการวิเคราะห์สารระเหยด้วย SPME-GC-MS เหมือนกับวิธีข้อ (3) แต่เปลี่ยนพันธุ์ข้าวเป็นข้าวพันธุ์หอมสุพรรณบุรี และเปลี่ยนสารมาตรฐานที่ใช้เป็นสารละลาย TMP เข้มข้น 1,000 ppm โดยใช้ภาวะของเครื่อง GC-MS ที่ดีที่สุดจากข้อ (3) แต่เพิ่มการ scan ของเครื่อง MS เป็น 3 segment แต่ละ segment มี 2 scan event ดังแสดงในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 การ scan ของเครื่อง MS

	segment 1		segment 2		segment 3	
	scan event 1	scan event 2	scan event 1	scan event 2	scan event 1	scan event 2
scan mode	full scan	SIM	full scan	SIM	full scan	SIM
มวลต่อประจุ (amu)	35-200	40 ^a และ 67 ^a	35-200	68 ^b และ 83 ^b	35-200	79 ^c และ 121 ^c

^aมวลที่เป็นเอกลักษณ์ของสาร n-hexanal

^bมวลที่เป็นเอกลักษณ์ของสาร 2AP

^cมวลที่เป็นเอกลักษณ์ของสาร TMP

ข. ศึกษาการสกัดสาร 2AP และ n-hexanal จากข้าวด้วย SPME และการวิเคราะห์ปริมาณสาร 2AP และ n-hexanal ด้วยเทคนิค GC-MS

การสกัดสาร 2AP และ n-hexanal จากข้าวด้วย SPME ทำเหมือนกับวิธีการศึกษา scan mode ที่เหมาะสมในข้อ ก(4) และวิเคราะห์สารระเหยด้วยเทคนิค GC-MS โดยใช้ภาวะของเครื่อง GC-MS ที่เหมาะสมตามที่ได้ศึกษามาแล้วในหัวข้อ ก

3.2.1 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและทางกายภาพของข้าวกล้องหอมสุพรรณบุรี เคลือบเจลแป้งข้าวร่วมกับการใช้บรรจุภัณฑ์

ก. ศึกษาผลของการเคลือบข้าวด้วยเจลแป้งข้าวและการใช้บรรจุภัณฑ์ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและทางกายภาพของข้าวกล้องหอมสุพรรณบุรีในระหว่างการเก็บ

(1) วิธีการเตรียมเจลแป้งข้าวหอมสุพรรณบุรีและการเคลือบข้าว (ดัดแปลงจากวิธีของ ทิตติگان เมฆจรัสกุล, 2545)

นำข้าวสารพันธุ์หอมสุพรรณบุรี (ข้าวใหม่) มาไม่แบบ wet milling (วิธีการไม่แสดงในภาคผนวก ข.2) และร่อนแป้งข้าวที่ได้ผ่านตะแกรงขนาด 70 mesh จากนั้นนำ flour ที่ได้มาเตรียมเป็นสารละลายแป้งเข้มข้นร้อยละ 3 นำสารละลายมาให้ความร้อนและคนอย่างต่อเนื่องจนสารละลายมีอุณหภูมิ 90-95°C ให้ความร้อนต่อเป็นเวลา 10 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำ

ข้าวกล้องพันธุ์หอมสุพรรณบุรี (ข้าวกล้องใหม่) ผสมกับสารละลายพอลิเมอร์ที่เตรียมไว้ (อัตราส่วน เจลพอลิเมอร์ต่อข้าวเป็น 1:20 (w/w)) ในหม้อเคลือบ (coating pan) ที่หมุนด้วยความเร็วรอบ 40 รอบต่อนาที ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเป่าลมที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 2 นาที แล้วนำมาผึ่งไว้ข้างนอกจนมีความชื้นต่ำกว่า 14%

(2) ศึกษาผลการเคลือบข้าวด้วยเจลแป้งข้าวร่วมกับการใช้บรรจุภัณฑ์ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและทางกายภาพของข้าวกล้องหอมสุพรรณบุรีในระหว่างการเก็บ ออกแบบการทดลองแบบ Asymmetric Factorial Experiment ขนาด 6x2x3 โดยมี ปัจจัยในการทดลอง 3 ปัจจัย ซึ่งได้แก่ ระยะเวลาการเก็บ การเคลือบข้าวและบรรจุภัณฑ์ โดยปัจจัย แรกแบ่งออกเป็น 6 ระดับ ปัจจัยที่สองแบ่งออกเป็น 2 ระดับ และปัจจัยที่สามแบ่งเป็น 3 ระดับ ดังนี้

ปัจจัย	ระดับ
ระยะเวลาการเก็บ	1 2 3 4 5 และ 6 เดือน
การเคลือบข้าว	-ไม่เคลือบ -เคลือบ *
บรรจุภัณฑ์	- ถุงผ้าดิบขนาด 5 x 6 นิ้ว - ถุง polypropylene (PP) หนา 30 µm ขนาด 5 x 6 นิ้ว - ถุง laminated ชนิด oriented polypropylene (OPP) / aluminum (Al) / linear low density polyethylene (LLDPE) หนา 100 µm ขนาด 5 x 6 นิ้ว และทำให้อยู่ในสภาวะสุญญากาศ

* การเคลือบข้าวใช้วิธีในข้อ (1)

ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (Analysis of variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's New Multiple Range test ด้วยโปรแกรม SPSS 13.0 โดยใส่ตัวอย่างข้าวในบรรจุภัณฑ์ ถุงละ 200 กรัม เก็บข้าวในอุณหภูมิ 27-32°C ความชื้นสัมพัทธ์ 54-62% เป็นระยะเวลา 6 เดือน และสุ่มตัวอย่างมาทำการวิเคราะห์ทุก 1 เดือน การวิเคราะห์ข้าวระหว่างเก็บมีดังนี้

1. วิเคราะห์ปริมาณความชื้น โดยวิธีอบแห้งในตู้อบร้อน ตามวิธีของ AACC 44-19 (1995) ดังแสดงในภาคผนวก ข.3

2. วิเคราะห์ปริมาณสารหอม 2AP โดยการสกัดด้วยเทคนิค SPME-GC-MS (จากงานวิจัยใน ส่วนที่ 1)
3. วิเคราะห์ปริมาณสารหื่น n-hexanal โดยการสกัดด้วยเทคนิค SPME-GC-MS (จากงานวิจัยใน ส่วนที่ 1)
4. วัดค่าสีในระบบ Hunter Lab ด้วยเครื่องวัดสี (Minolta-CR300, Japan) ในแต่ละซ้ำจะวัดสี 15 จุด แล้วคำนวณดัชนีความขาว (White index) ตามวิธีของ Chen, Lu และ Lii (1999) ดังนี้

$$\text{ดัชนีความขาว} = 100 - \sqrt{(100-L)^2 + a^2 + b^2}$$
5. วัด water activity (a_w) ด้วยเครื่องวัด a_w (Testo650, Japan)

(3) ทดสอบสมบัติของบรรจุภัณฑ์ที่ใช้

โดยบรรจุภัณฑ์ที่ใช้ทดสอบ คือ ถุง PP หนา 30 μm และ ถุง laminated ชนิด OPP / AI / LLDPE หนา 100 μm การทดสอบแบ่งเป็น

- ทดสอบอัตราการซึมผ่านของก๊าซออกซิเจน (oxygen transmission rate) หรือ OTR มีหน่วยเป็น $\text{cc}/\text{m}^2/\text{day}$ ที่ 23°C 0%RH ด้วยเครื่อง oxygen permeation analyser (ILLINOIS MODEL 8000, USA) และ
- ทดสอบอัตราการซึมผ่านของไอน้ำ (water vapor transmission rate) หรือ WVTR มีหน่วยเป็น $\text{g}/\text{m}^2/\text{day}$ ที่ 23°C 95%RH ด้วยเครื่อง water vapour permeability tester (Lyssy L800-4000, Switzerland)

ข. การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของข้าวกล้องเคลือบ

ประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสทางด้านสี กลิ่นและความชอบโดยรวมของข้าวกล้องเคลือบเจลแบ่งข้าวและข้าวกล้องที่ไม่ได้เคลือบ (ข้าว control) ที่บรรจุในถุง PP เก็บเป็นเวลา 0 3 และ 6 เดือน โดยนำข้าวมาหุงสุกก่อนการทดสอบ (วิธีการหุงแสดงในภาคผนวก ข.4) ใช้ผู้ทดสอบ 20 คน และใช้แบบทดสอบชนิด Quantitative Descriptive Analysis (รายละเอียดคะแนนของแต่ละคุณลักษณะแสดงในภาคผนวก ข.5)

ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วางแผนการทดลองแบบ Asymmetric Factorial with CRD ขนาด 3×2 วิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (Analysis of variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's New Multiple Range test ด้วยโปรแกรม SPSS 13.0