บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบ

ข้าวสารขัดขาวพันธุ์ต่างๆ ดังนี้ หอมมะลิ105, กข23, กข13, ชัยนาท1, สุพรรณบุรี1, เหลืองประทิว123, หอมปทุมธานี1, ขาวตาแห้ง17

3.2 สารเคมี

1. สารละลายไอโอดีน (I_2 0.2 กรัม + KI 2.0 กรัม ปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร)
2. กรดอะซิติก 1 N (Acetic acid : BDH, England)
3. โซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 N (Sodium hydroxide : J.T Baker, USA)
4. อมิโลสบริสุทธิ์จากมันฝรั่ง (Potato amylose : Fluka, Switzerland)
5. เอทธิลแอลกอฮอล์ 95% (Ethyl alcohol : Merck, Germany)
6. กรดไฮโดรคลอริก 0.1 M (Hydrochloric acid: Merck, Germany)

3.3 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณอมิโลส

1. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer ; Unicam : model helios ∝, England)
2. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Analytical balance ; Sartorius : model A120S, Germany)
3. เครื่องบดตัวอย่าง (Blender : National, Japan)
4. ตะแกรงร่อน ขนาด 80 mesh

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการสร้างชุดทดสอบ

อุปกรณ์ที่ใช้ในการสร้างชุดทดสอบจากร้านโปลีอีเลคทรอนิก ซัพพลาย อ.เมือง จ.เชียงใหม่ มีดังนี้

1. หลอด LED ขนาด 5 มิลลิเมตร สีขาว แบบ super bright รุ่น 503 WC
2. ตัวต้านทาน
3. พลาสติกสีเหลืองใส
4. สายไฟขนาดเล็ก (ขนาด 0.5 มิลลิเมตร)
5. แผ่นพลาสติกลูกฟูกสีดำ
6. กล่องอินทรูเมนท์สีดำ ขนาด 215x168x77 มิลลิเมตร
7. โซลาเซลล์ ขนาด 30x10 มิลลิเมตร
8. มัลติมิเตอร์ แบบดิจิตอล (Mutimeter : Zukito,Japan)
9. ถ่าน 9 โวลต์ พร้อมขั้วถ่าน
10. ถ่าน 1.5 โวลต์ จำนวน 10 ก้อน พร้อมรางใส่ถ่าน
11. AC ADAPTOR MODEL : M112
12. สวิตซ์ไฟฟ้า
13. หัวแร้ง
14. ตะกั่วบัดกรี
15. แผ่นปริ้นส์อเนกประสงค์
16. เซลล์ที่ใส่ตัวอย่างพลาสติกขนาด 3 มิลลิลิตร

3.3.3 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่างสำหรับใช้กับชุดทดสอบ

1. เตาไฟฟ้า (Hot plate)
2. หลอดทดลองพร้อมฝาเกรียว (Test tube with skew cap)
3. บีกเกอร์ (Beaker)
4. ปิเปต (Pipette)
5. กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 42 (filter paper)
6. กรวยกรอง (Glass funnel)

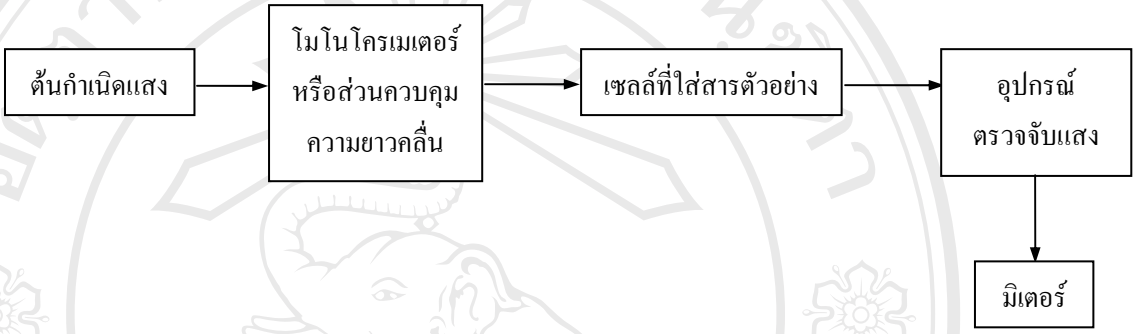
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การสร้างชุดทดสอบหาปริมาณอมิโลสในข้าวสาร

ขั้นตอนการสร้างเครื่องมือ

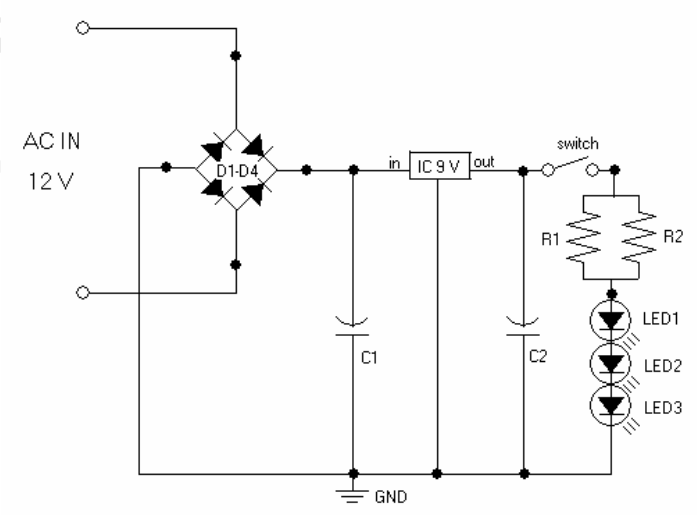
1. ออกแบบเครื่องวัดความเข้มแสงอย่างคร่าว ๆ ดังภาพ 3.1



ภาพ 3.1 องค์ประกอบของเครื่องวัดความเข้มแสง

2. เขียนวงจรไฟฟ้า

- วงจรไฟฟ้าในส่วนของต้นกำเนิดแสง



ภาพ 3.1 วงจรไฟฟ้าในส่วนของต้นกำเนิดแสง

กำหนดให้

D คือ ไดโอด (Diode) ซึ่ง D1-D4 ใช้เบอร์ 1N4001

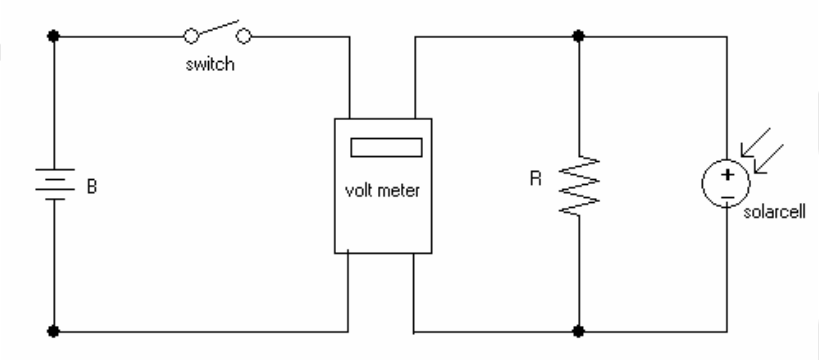
C คือ ตัวเก็บประจุ (Capacitor) ซึ่ง C1 = 470 MF 35 V และ C2 = 470 MF 25 V

R คือ ตัวต้านทาน (resistor) ซึ่ง R1+R2 = 150 โอห์ม

IC คือ Integrated circuit (series 7809)

LED คือ หลอดไฟ ชนิด Light Emitting Diode ขนาด 5 มิลลิเมตร สีขาว

- วงจรไฟฟ้าในส่วนของการวัดความเข้มแสง



ภาพ 3.2 วงจรไฟฟ้าในส่วนของการวัดความเข้มแสง

กำหนดให้

B คือ Battery 9 Volt

R คือ ตัวต้านทาน (resistor) 1 กิโลโอห์ม

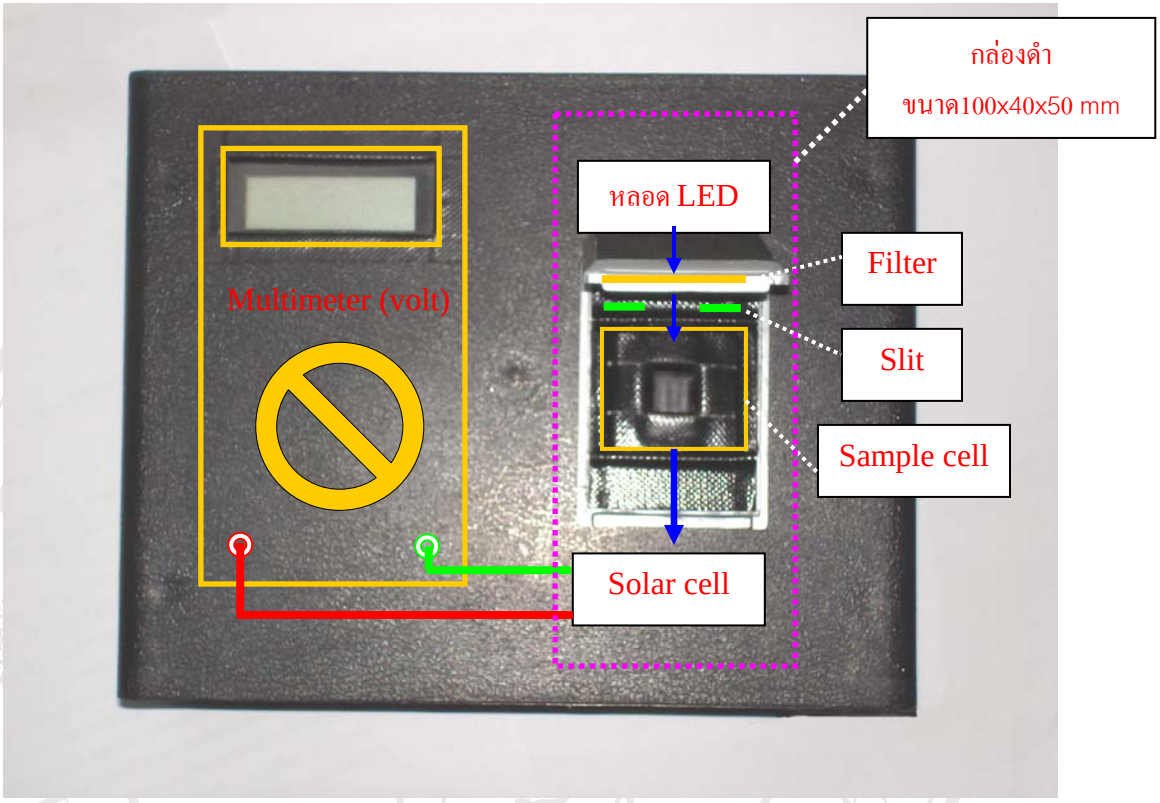
3. จัดหาอุปกรณ์ที่ใช้ในการสร้างเครื่องมือตามข้อ 3.3.2

4 สร้างวงจรไฟฟ้าตามข้อ 3.4.1.2

5 นำกล่องอินทรูเมนท์สีดำ มาเจาะรูสี่เหลี่ยม 2 รู (ดังภาพ 3.3 และ 3.4) ขนาด 58x20 มิลลิเมตร และ ขนาด 35x35 มิลลิเมตร เพื่อใช้เป็นจอแสดงผล และเป็นที่ใส่ตัวอย่างสำหรับวัดค่าความเข้มแสง ตามลำดับ ในส่วนของที่ใส่ตัวอย่างให้ติดตั้งฝาที่สามารถปิดเปิดได้ เพื่อป้องกันแสงจากภายนอกเข้าไปรบกวนการทำงานของเครื่องมือ ส่วนบริเวณด้านหลังกล่องให้ติดตั้งสวิทซ์ไฟฟ้า 2 ตัว ไว้ควบคุมแหล่งกำเนิดแสง และควบคุมมัลติมิเตอร์ ดังภาพ ค1 และภาพ ค2 ในภาคผนวก ค

6 ประกอบเครื่องวัดความเข้มแสงโดยจัดวางเรียงอุปกรณ์ให้อยู่ในแนวเดียวกันทั้งหมด ยกเว้น มัลติมิเตอร์ ดังภาพ 3.3

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 3.3 การจัดเรียงอุปกรณ์ภายในกล่อง

จากภาพ 3.3 เป็นการจัดเรียงอุปกรณ์ไว้ในแนวเดียวกันภายในกล่องดำที่ทำจากแผ่นพลาสติกลูกฟูกสีดำ ขนาด 100x40x50 มิลลิเมตร เจาะช่องสำหรับใส่ตัวอย่างขนาด 10x10x45 มิลลิเมตรด้านบน ซึ่งจะวางแหล่งกำเนิดแสงที่เป็นหลอด LED จำนวน 3 หลอดในแนวตั้ง ฟิวเตอร์ (filter) ที่ใช้ เป็นพลาสติกสีเหลืองใสวางห่างจากหลอด LED 10 มิลลิเมตร ส่วนช่องแสงผ่าน (slit) มีขนาดความกว้าง 5 มิลลิเมตร วางติดกับฟิวเตอร์ ช่องใส่ตัวอย่าง (sample cell) มีขนาด 10x10x45 มิลลิเมตรห่างจากช่องแสงผ่าน 5 มิลลิเมตร และโซลาเซลล์ (solar cell) ห่างจากช่องใส่ตัวอย่าง 3 มิลลิเมตร ทั้งนี้การวางอุปกรณ์ให้อยู่ในแนวเดียวกัน เพื่อให้แสงเดินทางเป็นเส้นตรงและสามารถผ่านสารละลายตัวอย่างได้ ซึ่งแสงที่ผ่านออกมาจากตัวอย่างจะถูกตรวจจับแสงด้วยโซลาเซลล์พร้อมกับแปลงสัญญาณแสงเป็นกระแสไฟฟ้า และตรวจวัดกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นด้วยมัลติมิเตอร์ในหน่วยของมิลลิโวลล์ ส่วนฝาที่ใช้สำหรับเปิดปิดช่องใส่ตัวอย่าง มีขนาด 70x50x10 มิลลิเมตร นำมาติดตั้งบริเวณช่องใส่ตัวอย่างด้วยกาวตราช้าง เพื่อควบคุมปริมาณแสงไม่ให้รบกวนขณะทำการวิเคราะห์ตัวอย่าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4.2 วิเคราะห์หาปริมาณอมิโลส (apparent amylose content) โดยวิธีมาตรฐาน

วิธีวิเคราะห์

1. นำตัวอย่างข้าวสารจำนวน 100 กรัม มาบดละเอียด และร่อนด้วยตะแกรงร่อนที่มีขนาด 80 mesh
2. ชั่งตัวอย่าง 0.1000 กรัม ใส่ในขวดวัดปริมาตรที่แห้งสนิทขนาด 100 มิลลิลิตร
2. เติม 95% เอทธิลแอลกอฮอล์ 1 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ
3. เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 นอร์มัล ปริมาตร 9 มิลลิลิตร
4. เขย่านาน 10 นาที ให้เป็นน้ำแป้ง และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร
5. ปิเปตสารละลายน้ำแป้ง 5 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร
6. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 70 มิลลิลิตร และกรดอะซิติก 1 นอร์มัล ปริมาตร 2 มิลลิลิตร
7. เติมสารละลายไอโอดีน 2 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 10 นาที
8. นำไปวัดความเข้มของสี โดยใช้สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร
9. อ่านค่าการดูดกลืนแสงเปรียบเทียบความเข้มข้นของอมิโลสกับกราฟมาตรฐาน ที่เตรียมจากอมิโลสบริสุทธิ์จากมันฝรั่ง

3.4.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่างข้าวที่ใช้ในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างและใช้เป็นตัวแทนในการทำกราฟมาตรฐานสำหรับชุดทดสอบมีอยู่ 3 สายพันธุ์ คือ หอมมะลิ105, กข23 และกข13

3.4.3.1 หาระยะเวลาที่เหมาะสมในการต้มสกัดอมิโลสในตัวอย่างข้าว

วิธีทดลอง

1. สุ่มตัวอย่างข้าวสารเต็มเมล็ดมา 10 เมล็ด ใส่ลงหลอดทดลองที่มีฝาปิด
2. เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร และปิดฝา
3. นำไปต้มในน้ำเดือด นาน 10 นาที
4. นำหลอดทดลองแช่ลงในน้ำ เพื่อลดอุณหภูมิให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง
5. นำสารละลายที่ได้มากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 42
6. นำสารละลายตัวอย่างที่กรองแล้วมา 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง
7. เติม 0.1 M HCl 7.5 มิลลิลิตร และเติมสารละลายไอโอดีน 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
8. นำสารละลายที่ได้ไปวัดความเข้มแสง (ให้ทำการวัดทันทีที่เตรียมตัวอย่างเสร็จ)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

9. ทำการทดลองซ้ำตั้งแต่ข้อ 1-8 โดยเปลี่ยนระยะเวลาในการต้มเป็น 15,20, 25,30,40 และ 50 นาที (ข้อ 3)

3.4.3.2 หาปริมาณของไอโอดีนที่มากเกินพอ (excess)ในการทำปฏิกิริยากับสารละลายตัวอย่างข้าว

วิธีทดลอง

1. สุ่มตัวอย่างข้าวสารเต็มเมล็ดมา 10 เมล็ด ใส่ลงหลอดทดลองที่มีฝาปิด
2. เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร และปิดฝา
3. นำไปต้มในน้ำเดือด นาน 15 นาที
4. นำหลอดทดลองแช่ลงในน้ำ เพื่อลดอุณหภูมิให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง
5. นำสารละลายที่ได้มากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 42
6. นำสารละลายตัวอย่างที่กรองแล้วมา 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง
7. เติม 0.1 M HCl 7.5 มิลลิลิตร และเติมสารละลายไอโอดีน 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
8. นำสารละลายที่ได้ไปวัดความเข้มแสง (ให้ทำการวัดทันทีที่เตรียมตัวอย่างเสร็จ)
9. ทำการทดลองซ้ำตั้งแต่ข้อ 1-8 โดยเปลี่ยนปริมาณของสารละลายไอโอดีนเป็น 2, 3,4 มิลลิลิตร (ข้อ 7)

3.4.4 การทดสอบประสิทธิภาพในการวัดปริมาณอมิโลสของชุดทดสอบ

3.4.4.1 ทดสอบความแม่นยำ (precision) ของชุดทดสอบ

วิธีทดลอง

1. สุ่มตัวอย่างข้าวสารเต็มเมล็ดมา 10 เมล็ด ใส่ลงหลอดทดลองที่มีฝาปิด
2. เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร และปิดฝาให้สนิท
3. นำไปต้มในน้ำเดือด นาน 15 นาที
4. นำหลอดทดลองแช่ลงในน้ำ เพื่อลดอุณหภูมิให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง
5. นำสารละลายที่ได้มากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 42
6. นำสารละลายตัวอย่างที่กรองแล้วมา 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง
7. เติม 0.1 M HCl 7.5 มิลลิลิตร และเติมสารละลายไอโอดีน 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
8. นำสารละลายที่ได้ไปวัดความเข้มแสง (ให้ทำการวัดทันทีที่เตรียมตัวอย่างเสร็จ)
9. ทำการทดลองซ้ำตั้งแต่ข้อ1-8 จำนวน 10 ซ้ำ
10. นำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความผันแปร (CV)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4.4.2 ทดสอบความถูกต้อง (accuracy) ของชุดทดสอบ

ทำการทดสอบตัวอย่างข้าวจำนวน 5 ตัวอย่าง ได้แก่ ข้าวชัยนาท1, ข้าวสุพรรณบุรี1, ข้าวเหลืองประทิว123, ข้าวหอมปทุมธานี1, ข้าวขาวตาแห้ง17 เพื่อหาปริมาณอมิโลสโดยใช้วิธีที่พัฒนาขึ้นเป็นชุดทดสอบเทียบกับวิธีที่ใช้เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ และนำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบเทียบกันโดยใช้ t-test

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved