บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย

2.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

2.1.1 อุปกรณ์การทดลอง

คอลัมน์ HPLC(normal phase) silica phase รุ่น shim-pack CLC-SIL ขนาด (ID) 6.0 mm ยาว15 cm ของบริษัท Shimadzu ประเทศญี่ปุ่น

คอลัมน์ HPLC(reverse phase) C18 รุ่น spherisorb 5 ODS(2) ขนาด (ID) 4.6 mm ยาว 25 cm ของบริษัท Phenomenex ประเทศสหรัฐอเมริกา

คอลัมน์ GC (capillary column) รุ่น SE-30 ขนาด (ID) 0.32 mm ยาว 30 m ของบริษัท Alltech ประเทศสหรัฐอเมริกา

เครื่องกำเนิดคลื่นอุลตราโซนิค (sonicator) รุ่น D200 บริษัท D.S.C. group ประเทศไต้หวัน

เครื่องเขย่าผสม (vortex) รุ่น Vortex-Genie 2 ของบริษัท Scientific Industries ประเทศสหรัฐอเมริกา

เครื่องชั่งแบบละเอียด(electronic balance) รุ่นFX-180A ของบริษัท A&D ประเทศญี่ปุ่น

เครื่องชั่งแบบหยาบ (electronic balance) รุ่น FX-3000 ของบริษัท A&D ประเทศญี่ปุ่น

เครื่องทำให้ระเหยเป็นไอ (rotary evaporator) รุ่น RE 52 ของบริษัท Yamato ประเทศญี่ปุ่น

เครื่องบีบอัดไฮดรอลิก (hydraulic press) รุ่น 10T ของบริษัท รอยัล แมชชีนเนอรี่ จำกัด ประเทศไทย

เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น UV-3100ของบริษัท Shimazu ประเทศญี่ปุ่น

เครื่องวัดสี Minolta Chroma Meter รุ่น CR-310 และ sample cell ขนาด 10 mm ของบริษัทท Minolta ประเทศญี่ปุ่น

เครื่อง HPLC รุ่น LC-6A ชุดควบคุมระบบ SLC-6A และเครื่องวิเคราะห์ผล C-R4A chromatopac ของบริษัท Shimadzu ประเทศญี่ปุ่น

เครื่อง GC รุ่น 15-A ของบริษัท Shimadzu ประเทศญี่ปุ่น

เครื่อง Kjeldahl (digestion unit Buchi รุ่น 425 และ distillation unit Buchi รุ่น 315) จัดจำหน่ายโดยบริษัทเบคไทย ประเทศไทย

เครื่อง Pulvis Mini Bed รุ่น GA-22 ของบริษัท Yamato ประเทศญี่ปุ่น

เครื่อง soxhlet extractor หรือ ชุดสกัดสาร (new multipurpose extractor รุ่น 6.30002) ของบริษัท Normschliff Geratebau จัดจำหน่ายโดย บริษัท ไซแอนติฟิค โปรโมชั่น จำกัด

เครื่อง spray dryer ของห้อง lab food processing ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตู้อบแห้งสุญญากาศ (vacuum drying oven) รุ่น DP-41 ของบริษัท Yamato ประเทศญี่ปุ่น

เตาเผารุ่น carbolite control 201 จัดจำหน่ายโดยบริษัท ไซแอนติฟิกโปรโมชั่น จำกัด ประเทศไทย

นอกจากนี้ยังมีอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลองทั่วไป ได้แก่ หลอดทดลอง กรวยแยก กระบอกตวง บิกเกอร์ ปิเปต บิวเรต หลอดหยด แท่งแก้วคน จุกยาง ขวดรูปชมพู่ กระดาษกรอง เทอร์โมมิเตอร์ hotplate และ electromental เป็นต้น

2.1.2 สารเคมี

สารเคมี	เกรด , บริษัทผู้ผลิต
กรดซัลฟุริก	commercial grade , ประเทศไทย
กรดอะซิติก	analytical grade , Maillinckrodt ประเทศสหรัฐอเมริกา
กรดไฮโดรคลอลิก(37%)	analytical grade , J.T. Baker ประเทศสหรัฐอเมริกา
แก๊สไนโตรเจนบริสุทธิ์	purity 99.99% , TIG Co. ประเทศไทย
แก๊สไฮโดรเจนบริสุทธิ์	purity 99.99% , TIG Co. ประเทศไทย
คลอโรฟอร์ม	analytical grade , J.T. Baker ประเทศสหรัฐอเมริกา
คอปเปอร์ซัลเฟต	analytical grade , Merck ประเทศเยอรมัน
คาร์บอนเตตระคลอไรด์	analytical grade , Carlo Erba ประเทศอิตาลี
โซเดียมคลอไรด์	analytical grade , Merck ประเทศเยอรมัน
โซเดียมไธโอซัลเฟต	analytical grade , Merck ประเทศเยอรมัน
โซเดียมไฮดรอกไซด์	analytical grade , Merck ประเทศเยอรมัน
โซเดียมไฮดรอกไซด์	commercial grade , ประเทศไทย
โซลูเบิล สตาร์ท	commercial grade , ประเทศไทย
ไดเอธิลอีเทอร์	analytical grade , Merck ประเทศเยอรมัน
ปิโตรเลียมอีเทอร์	analytical grade , Maillinckrodt ประเทศสหรัฐอเมริกา
โปแตสเซียมซัลเฟต	analytical grade , Carlo Erba ประเทศอิตาลี
โปแตสเซียมไอโอไดด์	analytical grade , Merck ประเทศเยอรมัน
โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์	analytical grade , Carlo Erba ประเทศอิตาลี
ฟีนอฟทาลีน	analytical grade , Merck ประเทศเยอรมัน
เมธานอล	analytical grade , Merck ประเทศเยอรมัน
เมธานอล	HPLC grade , Maillinckrodt ประเทศสหรัฐอเมริกา
อะซิโตน	commercial grade , ประเทศไทย
เอธิลแอลกอฮอล์ 95 %	commercial grade ประเทศไทย
ไอโอดีน	analytical grade , Carlo Erba ประเทศอิตาลี
เฮกเซน	analytical , Merck ประเทศเยอรมัน
เฮกเซน	analytical , Maillinckrodt ประเทศสหรัฐอเมริกา

เฮกเซน	commercial grade , ประเทศไทย
BF_3 – Methanol	analytical grade , Merck ประเทศเยอรมัน
Wij's solution	analytical grade , Merck ประเทศเยอรมัน

2.1.3 **สารมาตรฐาน**

สารเคมี	**เกรด , บริษัทผู้ผลิต**
กรดไขมันมาตรฐานในรูปเมธิลเอสเทอร์ 6 ชนิด	
C15:0 ME (pentadecanoic acid methyl ester)	analytical grade , Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา
C16:0 ME (hexadecanoic acid methyl ester)	analytical grade , NU-CHECK-PREP ประเทศสหรัฐอเมริกา
C18:0 ME (octadecanoic acid methyl ester)	analytical grade , NU-CHECK-PREP ประเทศสหรัฐอเมริกา
C18:1 ME (9 - octadecanoic acid methyl ester)	analytical grade , NU-CHECK-PREP ประเทศสหรัฐอเมริกา
C18:2 ME (9,12 – octadecanoic acid methyl ester)	analytical grade , NU-CHECK-PREP ประเทศสหรัฐอเมริกา
C20:0 ME (eicosanoic acid methyl ester)	analytical grade , Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา
สาร sesamol	analytical grade , Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา
สาร γ - tocopherol	analytical grade , Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา

I9936588 1

2.2 วิธีดำเนินงานวิจัย

2.2.1 การเตรียมวัตถุดิบ

ทำความสะอาดเมล็ดงา ที่ใช้ในการทดลอง คือ เมล็ดงาขัดขาว (รูปที่2.1)และเมล็ดงาดำเกษตร (รูปที่2.2) โดยเอาเมล็ดงาไปร่อนเอาฝุ่น ผง กรวด ทราย เศษใบไม้ และ อื่นๆที่ปะปนมาออก แล้วนำเมล็ดงาไปบรรจุใส่ถุง polyethylene (PE) เก็บไว้ในห้องเย็นอุณหภูมิ 4°C สำหรับนำไปทำการทดลองในขั้นตอนต่อๆไป

2.2.2 วิเคราะห์องค์ประกอบของเมล็ดงาที่ใช้ในการทดลอง

นำเมล็ดงาขัดขาวและเมล็ดงาดำเกษตรที่ใช้ในการทดลองมาวิเคราะห์หาองค์ประกอบ คือ ความชื้น ไขมัน โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และ เถ้า โดยใช้วิธีตาม experimental procedures-estimation of major food constituents (James,1995)

2.2.2.1 เถ้า

Muffle furnace at 550 °C

2.2.2.2 ความชื้น

Evaporation (loss on drying) method : Vacuum oven at 70 °C

2.2.2.3 ไขมัน

Gravimetric solvent extraction procedure : Soxhlet extraction

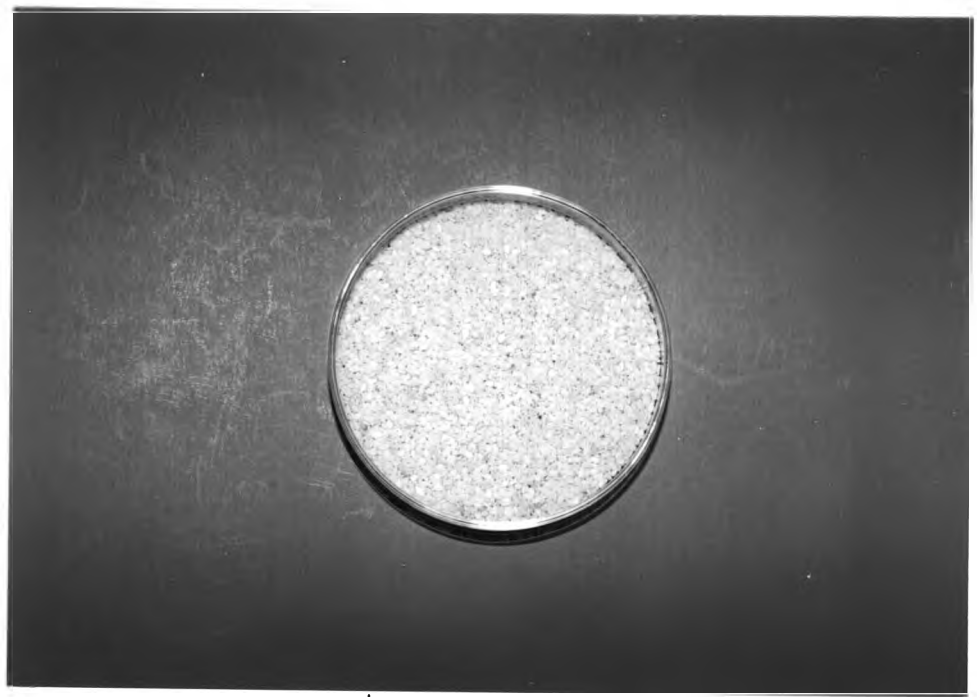
2.2.2.4 โปรตีน

The Kjeldahl method

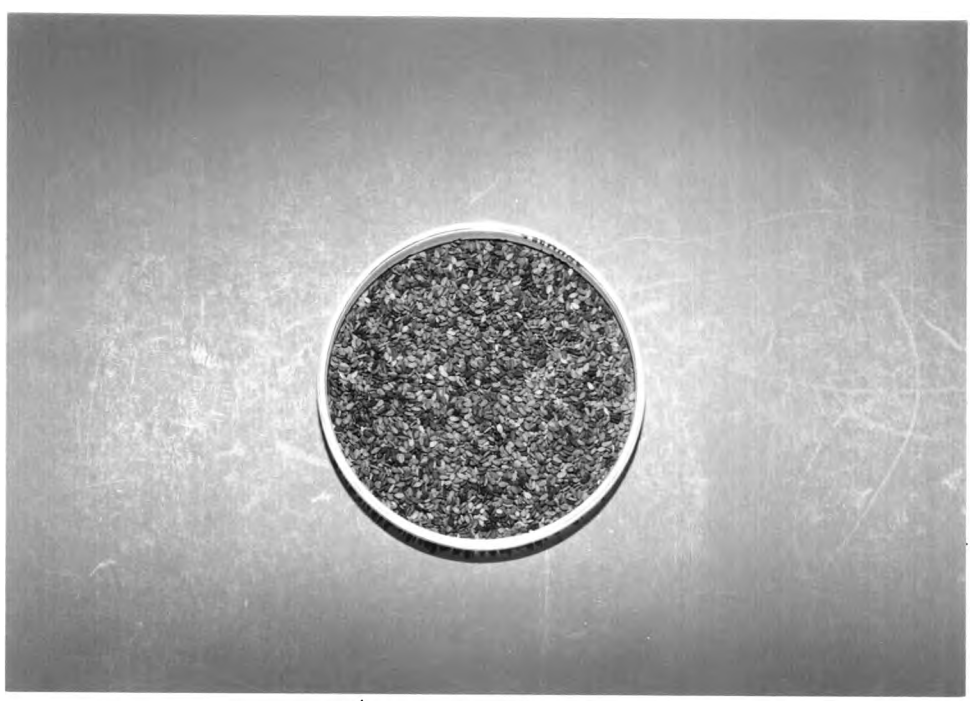
2.2.2.5 คาร์โบไฮเดรต

By different :

%Carbohydrates = 100 – [% Moisture + %Ash + %Fat + %Protein]



รูปที่ 2.1 เมล็ดงาขัดขาว



รูปที่ 2.2 เมล็ดงาดำเกษตร

2.2.3 หาความสัมพันธ์ของการคั่วเมล็ดงากับปริมาณน้ำมันที่สกัดได้จากเมล็ดงา

2.2.3.1 เตรียมน้ำมันงา

2.2.3.1.1 คั่วเมล็ดงา

นำเมล็ดงาที่เก็บไว้มาคั่วโดยใช้กระบวนการคั่วแบบลมเป่า(turbo roasting) ซึ่งดัดแปลงมาจาก เครื่องspray dryer ความเร็วลม 2.3 - 2.5 เมตรต่อวินาที โดยแปรผัน 2 ปัจจัย คือ อุณหภูมิ 150, 175, และ 200 °C กับเวลา 5, 10,15 และ 20 นาที ทำ 3 ซ้ำ เก็บเมล็ดงาที่ผ่านการคั่วไว้ในถุง polypropylene (PP) บรรจุแบบสุญญากาศ (vacuum pack)

2.2.3.1.2 บีบสกัดน้ำมันงา

นำเมล็ดงาที่ผ่านการคั่วแล้วมาบีบสกัดน้ำมัน ด้วยเครื่องบีบอัดน้ำมันแบบไฮดรอลิก โดยใช้แรงอัดอ่านค่าที่เครื่อง 8 ตัน (125.75 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร) นำน้ำมันที่ได้ไปกรองกำจัดเศษกากเมล็ดงาที่ปะปนมา แล้วบรรจุเก็บไว้ในขวดพลาสติก เป่าไนโตรเจนแก๊สแทนที่อากาศในขวดพลาสติก(Nitrogen Flushing) เป็นเวลา 45 – 60 วินาที ปิดฝาขวดพันพาราฟิล์ม แล้วนำไปเก็บไว้ในห้องเย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.2.3.2 วัดปริมาณน้ำมันงา (%w/w) ที่สกัดออกมาได้เปรียบเทียบกับปริมาณน้ำมันงาที่สกัดออกมาได้จากเมล็ดงาที่ไม่ผ่านการคั่ว และที่ผ่านการคั่วที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ และเปรียบเทียบปริมาณน้ำมันระหว่างเมล็ดงาขัดขาวและเมล็ดงาดำเกษตร

2.2.4 วิเคราะห์คุณสมบัติ คุณภาพของน้ำมันงาที่เตรียมได้

นำน้ำมันงาที่สกัดได้จากข้อ 2 มาวิเคราะห์ เพื่อหาสภาวะการคั่วที่เหมาะสมสำหรับสกัดน้ำมันงา โดยมีน้ำมันงาที่สกัดได้จากเมล็ดงาที่ไม่ผ่านการคั่วเป็นตัวเปรียบเทียบ (blank) ดังนี้

2.2.4.1 วิเคราะห์สีของน้ำมันงาตัวอย่าง

นำน้ำมันงาตัวอย่างมาใส่ในเซลที่ใส่ตัวอย่างแบบเหลว(sample cell) จนถึงขีดที่บอกไว้ แล้วนำไปวัดสีที่เครื่องวัดสี Minolta Chroma Meter CT-310 ตามวิธีการใช้งานของเครื่อง

2.2.4.2 วิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีของน้ำมันงาตัวอย่าง

2.2.4.2.1 ค่าความเป็นกรด (acid value , AV)

ชั่งน้ำมันตัวอย่าง 0.5 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml เติมเอธานอลที่ร้อนจากการอุ่นในwater bath 50 ml แล้วนำสารละลายที่ได้ไปอุ่นในwater bath และนำมาไตเตรทขณะร้อนกับสารละลาย โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 M โดยใช้ฟีนอฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ จุดยุติดูจากสีของสารละลายจาก ไม่มีสีเป็นสีชมพู ทำชุดควบคุมโดยไม่ต้องใช้น้ำมัน

สูตรการคำนวณ

$$\text{ค่าความเป็นกรด} = \frac{(T - B) \times m \times 56.11}{W}$$

กำหนดให้ B คือ ปริมาตรที่ใช้ของโปรแตสเซียมไฮดรอกไซด์ในชุดควบคุม(ml)

T คือ ปริมาตรที่ใช้ของโปรแตสเซียมไฮดรอกไซด์ในขวดตัวอย่าง(ml)

W คือ น้ำหนักของน้ำมันตัวอย่าง(กรัม)

m คือ ความเข้มข้นของโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์(M)

2.2.4.2.2 ค่าไอโอดีน (iodine value, IV)

ก. การเตรียมโซเดียมไธโอซัลเฟต ($Na_2S_2O_3.5H_2O$) 0.25 M เตรียมโดยละลายโซเดียมไธโอซัลเฟตหนัก 62.5 กรัม ในน้ำกลั่นที่ต้มเดือดแล้ว และทำให้เย็นใหม่ๆ เติมโซเดียมคาบอเนตหนัก 0.1 กรัมลงไป แล้วทำให้ปริมาตรสารละลายเป็น 1 ลิตร เก็บสารละลายนี้ในขวดสีน้ำตาล

ข. การเตรียมน้ำแป้ง เพื่อใช้เป็นอินดิเคเตอร์ โดยนำแป้งที่ละลายน้ำได้ (soluble starch) หนัก1.0 กรัม มาละลายในน้ำเล็กน้อย คนให้เป็นแป้งเปียกในบีกเกอร์ขนาด 250 ml เทน้ำร้อนที่เดือด 100 ml ลงไปแล้วคนให้แป้งละลาย ต้มสารละลายที่ได้ 1 นาที แล้วทำสารละลายที่ได้ให้เย็น เติมโปแตสเซียมไอโอไดด์ หนัก 2 กรัม คนสารละลายที่ได้ให้ผสมกันแล้วเก็บไว้ในขวดที่มีจุกอุด

ชั่งน้ำมันตัวอย่าง 0.2 - 0.3 กรัมลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml เติมคาร์บอนเตตระคลอไรด์ 10 ml เติมสารละลายวิจส์ 25 ml พร้อมทั้งเขย่าเบาๆ นำสารละลายไปเก็บไว้ในที่มืดนาน 30 นาที แล้วนำออกมาเติม 10 % โปแตสเซียมไอโอไดด์ 20 ml และ เติมน้ำกลั่น 100 mlเขย่าสารละลายให้เข้ากัน นำมาไตเตรทกับโซเดียมไธโอซัลเฟตเข้มข้น 0.25 M

จนสารละลายที่ได้มีสีชาอ่อน เติมน้ำแป้ง 2 ml จะได้สารละลายสีน้ำเงินนำไปไตเตรทต่อจนสีน้ำเงินของสารละลายจางหายไป ทำชุดควบคุมโดยไม่ต้องใช้น้ำมัน

สูตรการคำนวณ

$$\text{ค่าไอโอดีน} = \frac{(B - T) * 0.03175 * 100}{W}$$

กำหนดให้ B คือ ปริมาตรที่ใช้ของโซเดียมไธโอซัลเฟตในชุดควบคุม(ml)

T คือ ปริมาตรที่ใช้ของโซเดียมไธโอซัลเฟตในขวดตัวอย่าง(ml)

W คือ น้ำหนักของน้ำมันตัวอย่าง(กรัม)

1 ml 0.25 M thiosulphate solution = 0.03175 กรัม iodine

2.2.4.2.3 ค่าสปอนนิฟิเคชั่น (saponification value , SV)

ชั่งน้ำมันตัวอย่าง 0.75 – 1.25 กรัมใส่ลงในขวดกลั่นก้นแบนขนาด 250 ml เติมเศษกระเบื้องเล็กน้อย เติมโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.5 M 25 ml นำขวดกลั่นก้นแบนไปรีฟลักซ์นาน 30 นาที นำสารละลายที่ได้ขณะร้อนไปไตเตรทแบบย้อนกลับด้วยกรดไฮโดรคลอลิกเข้มข้น 0.5 M โดยใช้ฟีนอฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ (ไตเตรทโดยเร็ว) จุดยุติดูจากสีของสารละลายจากสีชมพูเป็นไม่มีสี ทำชุดควบคุมโดยไม่ต้องใช้น้ำมัน

สูตรการคำนวณ

$$\text{ค่าสปอนนิฟิเคชั่น} = \frac{(T - B) \times m \times 56.11}{W}$$

กำหนดให้ B คือ ปริมาตรที่ใช้ของกรดไฮโดรคลอริกในชุดควบคุม(ml)

T คือ ปริมาตรที่ใช้ของกรดไฮโดรคลอริกในขวดตัวอย่าง(ml)

W คือ น้ำหนักของน้ำมันตัวอย่าง(กรัม)

m คือ ความเข้มข้นของโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ (M)

2.2.4.2.4 ค่าเปอร์ออกไซด์ (peroxide value , PV)

ชั่งน้ำมันตัวอย่าง 2 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ 250 ml เติมสารละลายกรดอะซิติก : คลอโรฟอร์ม (3:2) 30 ml คนสารละลายให้เข้ากัน เติมสารละลายโปแตสเซียมไอโอไดด์

อิ่มตัว 0.5 ml เขย่าสารละลายให้เข้ากันประมาณ 1 นาที เติมน้ำกลั่น 30 ml นำสารละลายที่ได้มาไตเตรทกับโซเดียมไธโอซัลเฟตเข้มข้น 0.01 M จนสารละลายที่ได้มีสีชาอ่อนเติมน้ำแป้ง 2 ml จะได้สารละลายสีน้ำเงินนำไปไตเตรทต่อจนกระทั่งสีน้ำเงินของสารละลายจางหายไปเป็นไม่มีสี ทำชุดควบคุมโดยไม่ต้องใช้น้ำมัน

สูตรการคำนวณ

$$\text{ค่าเปอร์ออกไซด์} = \frac{(B - T) \times m \times 100}{W}$$

กำหนดให้ B คือ ปริมาตรที่ใช้ของโซเดียมไธโอซัลเฟตในชุดควบคุม(ml)

T คือ ปริมาตรที่ใช้ของโซเดียมไธโอซัลเฟตในขวดตัวอย่าง(ml)

W คือ น้ำหนักของน้ำมันตัวอย่าง(กรัม)

m คือ ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต (M)

2.2.4.3 วิเคราะห์กรดไขมันในน้ำมันงาตัวอย่าง

2.2.4.3.1 นำกรดไขมันมาตรฐานที่มีรายงานว่ามีในน้ำมันงาตามตารางที่ 1-3 ในบทที่1 มี palmitic acid(C16:0) , stearic acid(C18:0), oleic acid(C18:1), linoleic acid(C18:2) และ arachidic acid(C20:0) ในรูปเมธิลเอสเทอร์ซึ่งสั่งซื้อจากบริษัท Sigma และ บริษัท NU-CHECK-PREP นำมาฉีดวิเคราะห์ที่เครื่อง GC ใช้สภาวะตามข้อ 2.2.4.3.3 เพื่ออาศัยเปรียบเทียบเวลาชะ (retention time) กับกรดไขมันที่มีในน้ำมันงาตัวอย่าง

2.2.4.3.2 หาปริมาณกรดไขมัน(เปอร์เซ็นต์)ในน้ำมันงา โดยการเตรียมอนุพันธ์เมธิลเอสเทอร์(methy ester derivatives) ของกรดไขมันในน้ำมันงาตัวอย่าง

ชั่งน้ำมันตัวอย่าง 1 กรัม ลงในขวดกลั่นก้นกลมขนาด 25 ml เติม โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.5 M 4 ml ใส่เศษกระเบื้อง 2 – 3 ชิ้น นำไปรีฟลักซ์นาน 15 นาที แล้วเติม BF_3 -Methanol reagent 4 ml เติมขณะรีฟลักซ์แล้วรีฟลักซ์ต่ออีก 3 นาที แล้วเติมเฮกเซน 1 ml รีฟลักซ์ต่อ 1 นาที ยกออกจากเตาให้ความร้อนรอจนสารละลายอุ่น นำมาเติมโซเดียมคลอไรด์ที่อิ่มตัวจนถึงคอขวด ดูดชั้นของเฮกเซน(ชั้นบน) ซึ่งคือเมธิลเอสเทอร์ของกรดไขมันออกมาเก็บในหลอดทดลองปิดไว้เตรียมฉีดวิเคราะห์ GC ตามสภาวะในข้อ 2.2.4.3.3

2.2.4.3.3 การวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC

นำอนุพันธ์เมธิลเอสเทอร์ที่เตรียมได้จากข้อ 2.2.4.3.1 และ 2.2.4.3.2 ไปวิเคราะห์ด้วยGC โดยใช้สภาวะการทดลองดังนี้

สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์กรดไขมันในน้ำมันงา

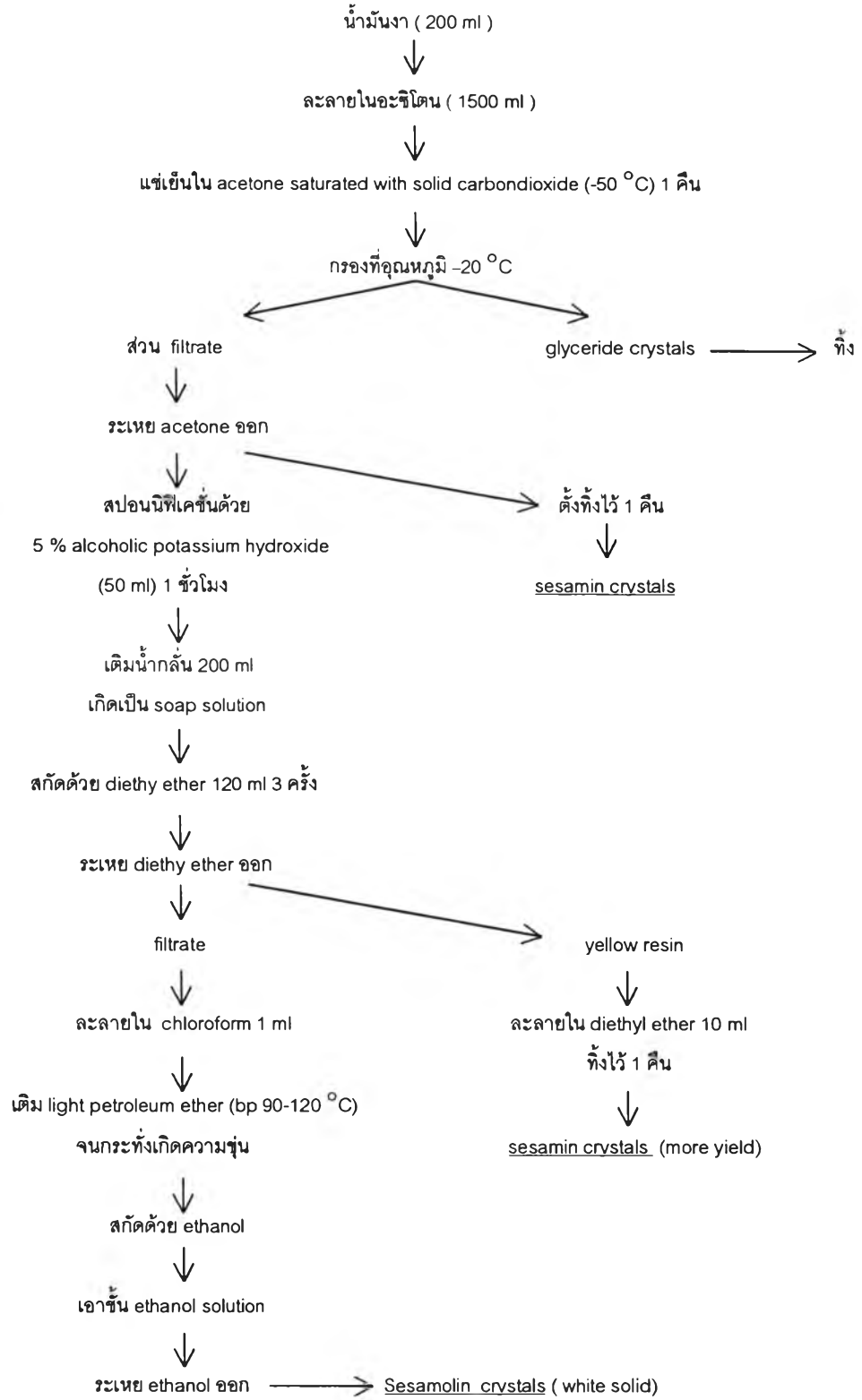
คอลัมน์	: SE – 30 (capillary column)
	ขนาด (ID) 0.32 mm ยาว 30 m
การตรวจวัด	: Flame Ionization Detector (FID)
อุณหภูมิคอลัมน์	: โปรแกรมเทมเพอร์เรเจอร์
	อุณหภูมิเริ่มต้น = 150 °C เป็นเวลา 1 นาที
	อัตราการเพิ่ม = 150 - 175 °C อัตราเพิ่ม 1.5 °C / นาที
	= 175 - 200 °C อัตราเพิ่ม 1 °C / นาที
	= 200 - 235 °C อัตราเพิ่ม 1.5 °C / นาที
	อุณหภูมิสุดท้าย = 235 °C
อุณหภูมิอินเจคเตอร์	: 250 °C
อุณหภูมิดีเทคเตอร์	: 250 °C
แก๊สตัวพาไนโตรเจน	: ความดัน 1.0 กิโลกรัม / ลูกบาศก์เซนติเมตร
ความดันไฮโดรเจน	: 0.5 กิโลกรัม / ลูกบาศก์เซนติเมตร
ความดันอากาศ	: 0.5 กิโลกรัม / ลูกบาศก์เซนติเมตร
ปริมาตรในการวิเคราะห์	: 1 ไมโครลิตร
สารตัวอย่าง	: เตรียมน้ำมันงาเป็นเมธิลเอสเทอร์
internal standard	: C15 :0

2.2.4.4 วิเคราะห์สารกันหืนในน้ำมันงาตัวอย่าง

2.2.4.4.1 สร้างกราฟมาตรฐานของสารกันหืน (antioxidants) ในน้ำมันงา ซึ่งมีสาร sesamol, sesamin, sesamolin และ γ -tocopherol โดย standard sesamol และ standard γ -tocopherol ซื้อจากบริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา ส่วน standard sesamin และ standard sesamolin สกัดจากน้ำมันงาตามวิธีของ Haslem และ Haworth ในปีค.ศ.1955 ซึ่งแสดงขั้นตอนไว้ดังรูปที่ 2.3 นำสารที่สกัดได้มาตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยใช้วิธีทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี(thin layer chromatography: TLC) ให้ n-hexane : ethyl acetate (2:1)เป็น solvent จากนั้นนำไปตรวจสอบโครงสร้างสารที่สกัดได้ด้วยเครื่องnuclear magnetic resonance(NMR) นำ standard antioxidants ทั้งหมดมาทำ absorption spectrum ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) เพื่อสแกนหาความยาวคลื่น(maximun wavelength :λ_{max})ที่จะใช้ในการตรวจวิเคราะห์ที่เครื่อง HPLC

เตรียมสารละลายมาตรฐานให้มีความเข้มข้นต่างๆ ฉีดสารละลายมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นเข้าเครื่อง HPLC ตามสภาวะที่ใช้ของแต่ละสารในข้อ2.2.4.4.3 แล้วนำพื้นที่ใต้พีคโครมาโตแกรม(peak area) ที่ได้มาทำกราฟมาตรฐานของสาร เพื่อใช้คำนวณหาปริมาณสารกันหืนในน้ำมันงาตัวอย่าง

2.2.4.4.2 หาปริมาณสารกันหืนในน้ำมันงา โดยเตรียมสารละลายตัวอย่างน้ำมันงา ชั่งน้ำมันงาตัวอย่าง 1 กรัม เติมนอร์มอลเฮกเซนปรับปริมาตรให้เป็น 5 มิลลลิตร กรองด้วยกระดาษกรอง PTFE แล้วนำไปฉีดที่เครื่อง HPLC ตามสภาวะในข้อ 2.2.4.4.3 นำพื้นที่ใต้พีคโครมาโทแกรมไปคำนวณกับกราฟมาตรฐานแต่ละสารจากข้อ 2.2.4.4.1



รูปที่ 2.3 ขั้นตอนการสกัดสาร sesamin และ sesamolin (Haslem and Haworth , 1955)

2.2.4.4.3 การวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

นำสารละลายที่เตรียมได้จากข้อ 2.2.4.4.1 และ 2.2.4.4.2 ไปวิเคราะห์ด้วย HPLC โดยใช้สภาวะการทดลองดังนี้

สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์สารกันหืนในน้ำมันงา (sesamol , sesamin และ sesamolin)

คอลัมน์	: คอลัมน์สำหรับวิเคราะห์ (analytical column)
	reverse phase (C_{18} :spherisorb 5 ODS(2))
	ขนาด (ID) 4.6 mm ยาว 25 cm
สารละลายตัวพา	: 75 % เมธานอลในน้ำที่ขจัดไอออนทวีคูณ
สารละลายตัวล้าง	: 80 % เมธานอลในน้ำที่ขจัดไอออนทวีคูณ
อัตราการไหล	: 0.8 มิลลิลิตร / นาที
อุณหภูมิคอลัมน์	: อุณหภูมิห้อง
ความยาวคลื่นการตรวจวัด	: คลื่นอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 298 นาโนเมตร
ตัวทำละลายมาตรฐาน	: 75 % เมธานอลในน้ำที่ขจัดไอออนทวีคูณ
ตัวทำละลายน้ำมันงาตัวอย่าง	: นอร์มอลเฮกเซน
สารตัวอย่าง	: น้ำมันงา 1 กรัมในเฮกเซนปริมาตรรวม 5 ml
ปริมาตรในการวิเคราะห์	: 5 ไมโครลิตร

สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์สารกันหืนในน้ำมันงา (γ-tocopherol)

คอลัมน์	: คอลัมน์สำหรับวิเคราะห์ (analytical column)
	normal phase (silica phase : CLC-SIL)
	ขนาด (ID) 6.0 mm ยาว 15 cm
สารละลายตัวพา	: นอร์มอลเฮกเซน : ไอโซโพรพานอล : เอธานอล
	(100 : 0.3 : 0.2)
สารละลายตัวล้าง	: นอร์มอลเฮกเซน
อัตราการไหล	: 0.8 มิลลิลิตร / นาที

อุณหภูมิคอลัมน์	: อุณหภูมิห้อง
ความยาวคลื่นการตรวจวัด	: คลื่นอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 295 nm
ตัวทำละลายสารมาตรฐาน	: นอร์มอลเฮกเซน : ไอโซโพรพานอล : เอธานอล (100 : 0.3 : 0.2)
ตัวทำละลายน้ำมันงาตัวอย่าง	: นอร์มอลเฮกเซน
สารตัวอย่าง	: น้ำมันงา 1 กรัมในเฮกเซนปริมาตรรวม 5 ml
ปริมาตรในการวิเคราะห์	: 5 ไมโครลิตร

- 2.2.4.5 ทดสอบทางประสาทสัมผัส (sensory test)

ใช้ผู้ทดสอบที่ไม่ผ่านการฝึกฝนมากกว่า 20 คน มาทำแบบทดสอบ ตามข้อ 2.2.4.5.1 และ 2.2.4.5.2 (ภาคผนวก ข)

2.2.4.5.1 ทดสอบ triangle test เพื่อคัดเลือกผู้ทดสอบที่จะสามารถนำข้อมูลของผู้ทดสอบในข้อ 2.2.4.5.2 ไปใช้วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติได้

2.2.4.5.2 ทดสอบ hedonic scale 9 points เพื่อพิจารณาการยอมรับสี กลิ่นรส และความชอบโดยรวมของผู้ทดสอบต่อผลิตภัณฑ์น้ำมันงาตัวอย่าง

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้ analysis of variance (ANOVA) และ Turkey's test หา least significant difference (LSD) เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

2.2.4.6 ประเมินข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์คุณสมบัติ และคุณภาพของน้ำมันงาตัวอย่างตามข้อ 2.2.4 ทั้งหมดเพื่อคัดเลือกอุณหภูมิและเวลาการคั่วเมล็ดงาทั้งสองชนิดให้ได้คุณสมบัติและคุณภาพน้ำมันงาที่เหมาะสม

2.2.5 ความสัมพันธ์ของวิธีการบีบสกัดน้ำมันงา กับปริมาณน้ำมันที่บีบสกัดได้และคุณสมบัติ คุณภาพของน้ำมันงาตัวอย่าง

2.2.5.1 นำเมล็ดงาขัดขาวและเมล็ดงาดำเกษตรมาคั่วที่อุณหภูมิและเวลาที่ประเมินได้จากข้อ 2.2.3 และ ข้อ 2.2.4 แล้วนำมาสกัดน้ำมันงาแบ่งเป็น 3 วิธี แต่ละวิธีทำการทดลอง 3 ซ้ำ

2.2.5.1.1 ใช้เครื่องบีบอัดไฮดรอลิกตามข้อ 2.2.3.1.2

2.2.5.1.2 ใช้ตัวทำละลายสกัดน้ำมันงาจากเมล็ดงาคั่วด้วยเครื่อง soxhlet extraction โดยตัวทำละลายคือ นอร์มอลเฮกเซนและใช้เวลาในการสกัด 6 ชั่วโมง

2.2.5.1.3 ใช้เครื่องบีบอัดไฮดรอลิกร่วมกับใช้ตัวทำละลายสกัดโดยบีบสกัดน้ำมันงาจากเมล็ดงาคั่วด้วยเครื่องบีบอัดไฮดรอลิกตามข้อ 2.2.5.1.1 แล้วนำกากที่ได้ไปสกัดน้ำมันด้วยตัวทำละลาย(นอร์มอลเฮกเซน) ตามข้อ 2.2.5.1.2

2.2.5.2 นำน้ำมันงาที่ได้จากการสกัดแต่ละวิธีมาวัดปริมาณน้ำมันดังเช่นข้อ 2.2.3 และวิเคราะห์คุณสมบัติ คุณภาพดังเช่นข้อ2.2.4 เปรียบเทียบค่าที่ได้ กับวิธีสกัดทั้ง 3 วิธี