บทที่ 3

อุปกรณ์และขั้นตอนการทดลอง

อุปกรณ์

1. เครื่องตีปน (blender) WARING รุ่น 32 BL79
2. เครื่องชั่งสารอย่างหยาบ SATORIOUS รุ่น B 3108
3. เครื่องกวน (magnetic stirrer) MAGNETOAGITADOR 8 BS รุ่น A-60
4. เครื่องระเหย (rotary vacuum evaporator) EYELA รุ่น NE-1S
5. ตู้อบ (hot air oven) WTB BINDER รุ่น E 53
6. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) MILTON ROY รุ่น Spectronic 601
7. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง SHIMADZU รุ่น UV 160
8. เครื่องไฮเพอฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (high performance liquid chromatography) SHIMADZU รุ่น UV Detecter SPD-1
9. เครื่องกาซโครมาโตกราฟี (gas chromatography) GC-FID PERKIN-ELMER รุ่น F-17
10. เครื่องอะตอมมิกแอบซอบชันสเปคโตรโฟโตเมเตอร์ (atomic absorption spectrophotometer) SPECTRA รุ่น AA-40P
11. graphite tube atomizer รุ่น GTA-96
12. pyrolytic coated graphite tube รุ่น GTA-96
13. autosampler รุ่น DS-15
14. refrigerated reciculator รุ่น CFT-33

15. เครื่องวัดสี (chromameter) MINOLTA รุ่น CR 300

16. แผ่นโครมาโตกราฟีเคลือบด้วยซิลิกา เจล จี 60 เอฟ 254 (TLC plate) MERCK

17. กระดาษกรองเบอร์ 1 เส้นผ่านศูนย์กลาง 11 เซนติเมตร WHATMAN

18. กระดาษลิตมัส pH 5.0-8.0 (Toyo test paper) No.20 (M.R.-B.T.B) บริษัท Toyo Roshi Co.,Ltd.

สารเคมี

1. โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride) UNIVAR A.R. grade

2. อะซีโตน (acetone) J.T.BAKER A.R. grade และ GC grade

3. เฮกเซน (hexane) J.T.BAKER A.R. grade และ GC grade

4. โซเดียมซัลเฟต (sodium sulphate anhydrous) CARLO ERBA A.R. grade

5. ปิโตรเลียม อีเธอร์ (petroleum ether) BDH A.R.grade

6. เอธานอล 95 % (ethanol 95%)

7. เมธานอล (methanol) MALLINCKRODT A.R. grade และ HPLC grade

8. โปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ (potassium hydroxide) FLUKA A.R. grade

9. อะซิโตไนไตรล์ (acetonitrile) HPLC grade

10. ไดคลอโรมีเธน (dichloromethane) HPLC grade

11. เมธิลไอโซบิวทิลคีโตน (methyisobutyl ketone, MIBK) A.R. grade

12. tritisol standard solution of Cu, Pb, As A.R. grade

13. เบตาคาโรทีน (β-carotene) SIGMA

14. น้ำมันถั่วเหลืองที่เติมและไม่เติมบีเอชที (butylated hydroxy toluene-BHT) และกรดซิตริค (citric acid) ตราองุ่น ของ บริษัทน้ำมันพืชไทย จำกัด

วัตถุดิบ

เปลือกส้มเขียวหวาน (Citrus reticulata Blanco) จากจังหวัดปทุมธานี เป็นวัตถุดิบในการทดลอง โดยใช้เปลือกส้มสดจากผลส้มที่มีอายุประมาณ 11-12เดือน ซึ่งมีสีเหลืองทั่วทั้งผล

ขั้นตอนการทดลอง

1. วิธีการเก็บและการวิเคราะห์หาความชื้นของวัตถุดิบ

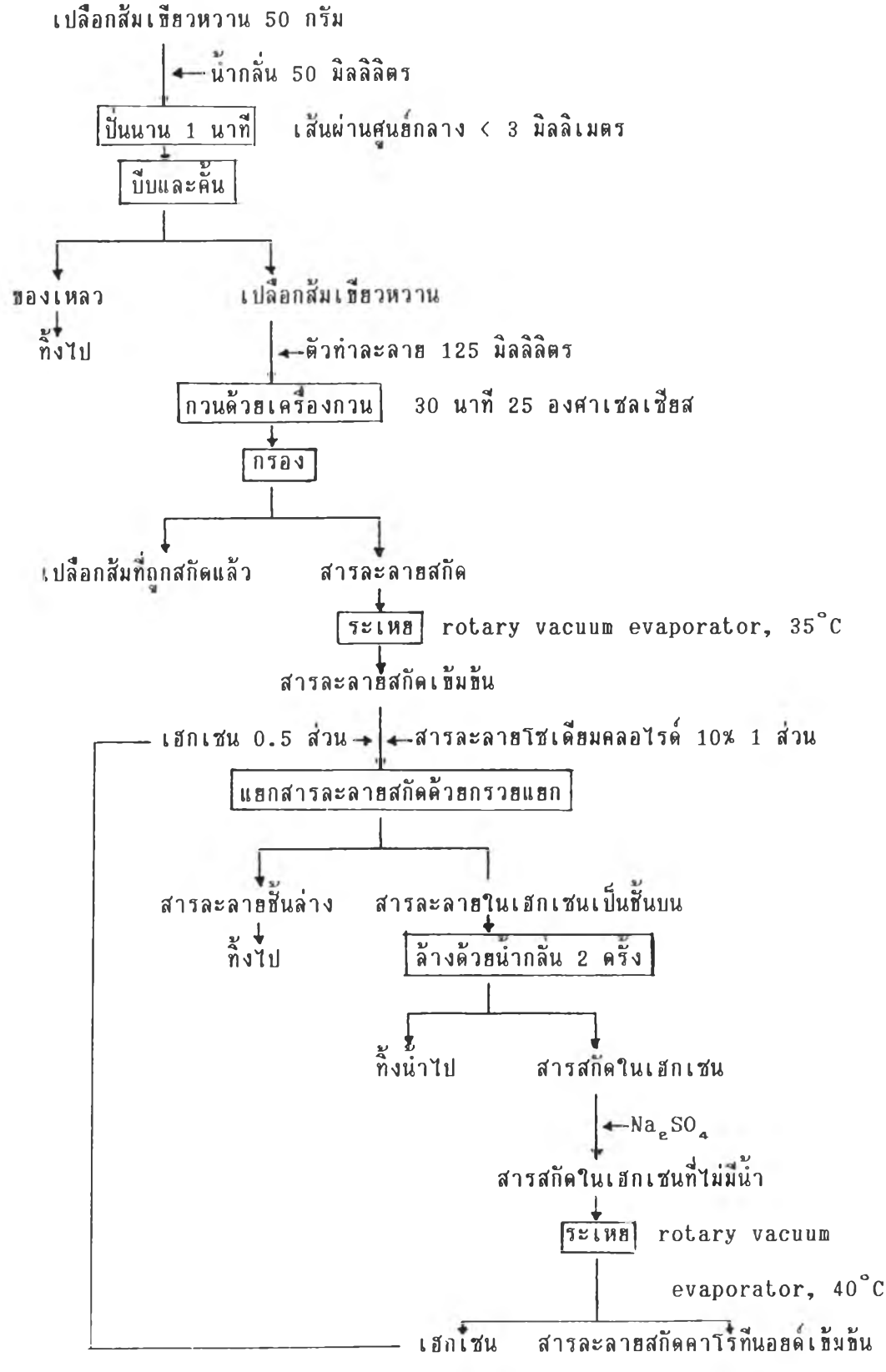
1.1 การเก็บเปลือกส้มเขียวหวานสด นำเปลือกมาล้างทำความสะอาดและเก็บไว้โดยวิธีแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิประมาณ -10 ถึง-18 องศาเซลเซียส

1.2 การวิเคราะห์หาความชื้นของเปลือกส้มเขียวหวานสด ทำตามวิธีใน AOAC (1984-7.007) (ภาคผนวก ก)

2. การสกัดและการวิเคราะห์ปริมาณคาโรทีนอยด์จากเปลือกส้มเขียวหวาน

2.1 วิธีการสกัดคาโรทีนอยด์จากเปลือกส้มเขียวหวาน ดัดแปลงจากวิธีของ Aravantinos-Zafiris, G และคณะ (1992) นำเปลือกส้มเขียวหวานแช่เยือกแข็ง 50 กรัม ปั่นรวมกับน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ด้วย Waring blenber ที่ความเร็วสูงสุดนาน 1 นาที จะได้เปลือกส้มที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางไม่เกิน 3 มิลลิเมตร จากนั้นบีบของเหลวจากส่วนผสมทิ้งไป ถ่ายเปลือกส้มลงในบีกเกอร์ขนาด 600 มิลลิลิตร แล้วเติมตัวทำละลาย 125 มิลลิลิตร นำส่วนผสมไปกวนด้วยเครื่อง magnetic stirrer ด้วยความเร็ว 600 รอบต่อนาที นาน 30 นาที (ควรปิดภาชนะระหว่างการกวนเพื่อไม่ให้ตัวทำละลายระเหย)ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส หลังการกวนกรองสารละลายสกัดด้วยวิธี suction กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 นำสารละลายสกัดที่กรองได้ไปกำจัดตัวทำละลาย โดยการระเหยด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่ 35 องศาเซลเซียส ด้วยระบบสุญญากาศ จากนั้นถ่ายสารละลาย

สกัดเข้มข้นลงในกรวยแยกด้วยเฮกเซน 0.5 เท่าของปริมาตรของสารละลายสกัดเข้มข้นที่ได้จากการระเหย เขย่าสารละลายในกรวยแยกนาน 3 นาที แล้วเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาณ 10 เท่าของสารละลายสกัดหลังการระเหย (เพื่อให้สารละลายแยกชั้นได้ดี) แยกสารละลายที่อยู่ในชั้นล่างทิ้งไปแล้วล้างสารละลายสกัดในเฮกเซน (สารละลายในส่วนชั้นบนในกรวยแยก) ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง (เพื่อล้างตัวทำละลายออกจากสารละลาย) ทิ้งชั้นน้ำไปและกำจัดน้ำในสารละลายในชั้นเฮกเซน ด้วย anhydrous sodium sulphate นำสารละลายสกัดไประเหยอีกครั้งด้วย rotary evaporator ที่ 40 องศาเซลเซียส ในระบบสุญญากาศ เพื่อกำจัดเฮกเซนออกจากสารละลายจะได้สารละลายสกัดคาโรทีนอยด์เข้มข้น ดังแสดงขั้นตอนการสกัดในรูปที่ 5



รูปที่ 5 ขั้นตอนการสกัดคาโรทีนอยด์จากเปลือกส้มเขียวหวาน

2.2 การตรวจหาเบตาคาโรทีนในสารละลายสกัด เนื่องจากในการหาปริมาณคาโรทีนอยด์ทั้งหมดมักแสดงในค่าของเบตาคาโรทีน ดังนั้นจึงต้องวิเคราะห์หาเบตาคาโรทีนในสารละลายที่สกัดได้ ซึ่งสามารถตรวจหาเบตาคาโรทีนได้ โดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบผิวบาง (thin layer chromatography, TLC) (Wilson et al., 1971) นำสารละลายสกัดที่ได้จากวิธีการสกัดข้อ 2.1 รูปที่ 5 และเบตาคาโรทีนมาตรฐานจุด (จุดซ้ำ 4 ครั้ง)ลงบนแผ่นโครมาโตกราฟีอะลูมิเนียมที่เคลือบด้วยซิลิกาเจล จี 60 ด้วยคาปิลารี นำแผ่นโครมาโตกราฟีวางในบรรยากาศที่อิ่มตัวด้วยตัวทำละลาย (ตัวพา) ผสมอะซีโตนกับเฮกเซนในอัตราส่วน 25:75 โดยปริมาตร จนตัวทำละลายเคลื่อนที่ถึงระยะทางที่กำหนด นำแผ่นโครมาโตการฟีออกจากบรรยากาศตัวทำละลายและทิ้งไว้ให้แห้ง วัดระยะทางที่สารละลายสกัดและเบตาคาโรทีนเคลื่อนที่บนแผ่นโครมาโตกราฟี เพื่อนำไปหาค่า R_f และเปรียบเทียบค่า R_f ของสารละลายสกัดกับเบตาคาโรทีน

2.3 การวิเคราะห์ปริมาณคาโรทีนอยด์ทั้งหมดในค่าของเบตาคาโรทีน ด้วยวิธีสเปคโตรโฟโตเมตรี(Wilson, Bissett and Berry, 1971; Berry, Wilson and Bissett, 1972) นำสารสกัดที่สกัดได้ตามรูปที่ 5 มาปรับปริมาตรด้วยเฮกเซนจนได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร หรือปรับความเจือจางให้ค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.3-0.8 ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร(Ramarkrishman and Francis, 1973;Aravantinos-Zafiris et al., 1992) นำสารละลายที่เจือจางมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) และใช้ cell ที่มีความหนา 1 ซม. นำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณปริมาณคาโรทีนอยด์ทั้งหมดได้ (Gross, 1974) ดังนี้

$$\text{คาโรทีนอยด์ทั้งหมด (มิลลิกรัมเบตาคาโรทีนต่อกิโลกรัมเปลือกส้มแห้ง)} = \frac{\text{O.D.} \times \text{DV} \times 1000}{\text{SW} \times E^{1\%}_{1\text{cm}} / 100}$$

O.D. = ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากสารละลายสกัด

DV = ปริมาตรของสารละลายสกัด (มิลลิลิตร)

SW = น้ำหนักเปลือกส้มแห้งที่สกัด (กรัม)

$E^{1\%}_{1cm}$ = extinction coefficient ของเบตาคาโรทีนละลายในเฮกเซนมีค่าเท่ากับ 2592 (ภาคผนวก ข)

3. การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการสกัดคาโรทีนอยด์จากเปลือกส้มเขียวหวาน

3.1 ศึกษาผลของตัวทำละลายและตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัด

ใช้วิธีการสกัดคาโรทีนอยด์ตามข้อ 2.1 รูปที่ 5 แต่ทำการสกัดจำนวน 2 ครั้งในแต่ละตัวอย่าง โดยใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ อะซีโตน เอธานอล 95% และปิโตรเลียมอีเธอร์ นำสารละลายที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณคาโรทีนอยด์ทั้งหมด และประเมินผลเพื่อเลือกตัวทำละลายในการสกัดที่ให้ปริมาณคาโรทีนอยด์ในสารละลายสูงสุด โดยวางแผนการทดลอง แบบ Completely Randomized Design (CRD) และทำการทดลอง 4 ซ้ำ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

3.2 ศึกษาจำนวนครั้งการสกัด

ใช้วิธีการสกัดตามข้อ 2.1 รูปที่ 5 โดยใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ อะซีโตน เอธานอล 95% และปิโตรเลียมอีเธอร์ ศึกษาจำนวนครั้งของการสกัด 6 ระดับ และหาปริมาณคาโรทีนอยด์ในสารละลายในแต่ละครั้งแล้วคำนวณเป็นร้อยละของคาโรทีนอยด์ทั้งหมดในแต่ละครั้ง จากนั้นจึงหาจำนวนครั้งที่สกัดที่รวมแล้วได้ปริมาณมากเกินร้อยละ 80 ของคาโรทีนอยด์ที่สกัดได้ทั้งหมดเพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป ทำการทดลอง 2 ซ้ำ

3.3 ศึกษาผลของอัตราส่วนระหว่างตัวทำละลายในการสกัดกับปริมาณเปลือกส้มเขียวหวานและเวลาในการกวนในระหว่างการสกัด

ใช้วิธีการสกัดคาโรทีนอยด์จากเปลือกส้มเขียวหวานตามข้อ 2.1 รูปที่ 5 โดยใช้ตัวทำละลายในการสกัดและจำนวนครั้งในการสกัดที่เลือกจาก 3.1 และ 3.2 ตามลำดับ แปรอัตราส่วนระหว่างตัวทำละลายในการสกัดกับปริมาณเปลือกส้มเขียวหวาน 5 ระดับ คือ 1.0:1 1.5:1 2.0:1 2.5:1 และ 3.0:1 (ปริมาตรต่อน้ำหนักเปลือกส้มสด)ตามลำดับ และแปรเวลาในการกวนในระหว่างการสกัด 6 ระดับ คือ 5 10 15 20 25 และ

30 นาที ตามลำดับ นำสารละลายสกัดที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณคาโรทีนอยด์ทั้งหมด และประเมินผล เพื่อเลือกอัตราส่วนระหว่างตัวทำละลายกับเปลือกส้มเขียวหวานและเวลาในการกวนระหว่างการสกัดที่ให้ปริมาณคาโรทีนอยด์ในสารละลายสกัดสูงสุด โดยวางแผนการทดลองแบบ Asymmetric Factorial Design ขนาด 5x6 และทำการทดลอง 2 ซ้ำ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

3.4 ศึกษาผลของอุณหภูมิในการสกัด

ใช้วิธีสกัดคาโรทีนอยด์จากเปลือกส้มเขียวหวาน ตามข้อ 2.1 รูปที่ 5 โดยใช้ตัวทำละลาย จำนวนครั้ง อัตราส่วนระหว่างตัวทำละลายกับปริมาณเปลือกส้มเขียวหวาน และเวลาในการกวนระหว่างการสกัด ที่เลือกจาก 3.1 3.2 และ 3.3 ตามลำดับ โดยแปรอุณหภูมิในการสกัด 8 ระดับ คือ 5 10 15 20 25 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ นำสารละลายสกัดที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณคาโรทีนอยด์ทั้งหมด และประเมินผลเพื่อเลือกระดับที่ให้ปริมาณคาโรทีนอยด์ในสารละลายสกัดสูงสุด โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design(CRD) และทำการทดลอง 3 ซ้ำ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

4. การจำแนกชนิดคาโรทีนอยด์ในสารละลายสกัด

การจำแนกชนิดคาโรทีนอยด์ในสารที่สกัดได้ด้วยวิธีโครมาโตกราฟี แบบผิวบางและสเปคโตรโฟโตเมตรี (อัจฉรียา จารยะพันธุ์, 2530; Wilson, Bissett and Berry, 1971) นำสารละลายสกัดที่ใช้วิธีการสกัดตามข้อ 2.1 รูปที่ 5 และใช้ภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองในข้อ 3 จุดลงบนแผ่นโครมาโตกราฟีอะลูมิเนียมที่เคลือบด้วยซิลิกาเจล จี 60 ขนาด 6x12 เซนติเมตร แล้วนำไปวางในบรรยากาศที่อิ่มตัวด้วยตัวทำละลาย (ตัวพา) ผสมอะซิโตนกับเฮกเซนในอัตราส่วน 25:75 โดยปริมาตร สารสกัดจะแยกเป็นแถบสีบนแผ่นโครมาโตกราฟี เมื่อตัวทำละลายเคลื่อนที่ถึงระยะทางที่กำหนด นำแผ่นโครมาโตกราฟีออกจากบรรยากาศตัวทำละลาย ทิ้งแผ่นโครมาโตกราฟีให้แห้งแล้ววัดระยะทางที่จุดสีแต่ละจุดเคลื่อนที่ เพื่อใช้ในการคำนวณค่า R_f ส่วนการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสีหรือสารที่แยกบนแผ่นโครมาโตกราฟี

จะใช้สีที่เกิดจากการจุดสารสกัดติดๆ กันบนแผ่นโครมาโตกราฟีและทำวิธีเช่นเดียวกับการหาค่า R_f จากนั้นใช้มีดปลายแหลมขูดแถบสีแต่ละแถบออกมา ทำการแยกสีบนแผ่นโครมาโตกราฟีซ้ำหลายๆ แผ่นตามวิธีที่กล่าวข้างต้น เพื่อรวบรวมแถบสีให้มีปริมาณมากพอต่อการวัดค่าการดูดกลืนแสงเพื่อหาความยาวคลื่นสูงสุด ใช้ตัวทำละลายที่ใช้เป็นตัวพาสกัดสารละลายสีออกจากซิลิกาเจลและแยกสารละลายสีจากซิลิกาเจลด้วยเครื่องเหวี่ยง นำสารละลายสีนี้ไประเหยด้วย rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้ภาวะสุญญากาศ นำสารละลายสีเข้มข้นละลายในเฮกเซน แล้วนำไปตรวจลักษณะการดูดกลืนคลื่นแสง (absorption spectrum) ด้วย UV-visible-spectrophotometor โดยscanในช่วง 200-600 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของคาโรทีนอยด์ชนิดต่างๆ ในภาคผนวก ข

5. การทำสารละลายสกัดให้บริสุทธิ์บางส่วน

ทำสารละลายสกัดให้บริสุทธิ์บางส่วน โดยกระบวนการ saponification (Kew and Berry, 1970; Ritter and Purcell, 1981) นำสารละลายสกัดที่ใช้วิธีการสกัดตามข้อ 2.1 รูปที่ 5 และภาวะในการสกัดที่ได้จากการทดลองข้อ 3 ในการทำ saponification ควรมีการตรวจคาโรทีนอยด์ในตัวอย่างก่อนและหลังการทำ saponification เพื่อดูว่า saponification มีผลต่อคาโรทีนอยด์ในตัวอย่างหรือไม่ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบผิวบางภาวะการทำเช่นเดียวกับการทดลองข้อ 4 การทำ saponification มีวิธีการทำดังนี้ ละลายสารละลายสกัดที่ได้โดยใช้เฮกเซนปริมาณ 4 เท่าของสารละลายสกัด แล้วถ่ายลงในกรวยแยกเติมสารละลาย methanolic KOH (ประกอบด้วย KOH 100 กรัม น้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร และเมธานอล 750 มิลลิลิตร) 1 เท่าของสารละลายสกัด แล้วเขย่าสารละลายนาน 1 นาที สารละลายในกรวยแยกจะแยกเป็นสองชั้น ชั้นล่างมีตะกอนสีน้ำตาลอยู่ในสารละลายจะแยกทิ้งไป ส่วนชั้นบนเป็นสารละลายสกัดคาโรทีนอยด์ในเฮกเซนนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นจนสารละลายสกัดในชั้นเฮกเซนมีค่า pH ประมาณ 7.5 (วัดด้วยกระดาษลิตมัส Toyo test paper)เติม anhydrous sodium sulphate ในสารละลายเพื่อกำจัดน้ำออกจากสารละลายให้หมด นำสารละลายที่ saponified ไประเหยที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

I20503349

ด้วย rotary evaporator ในระบบสุญญากาศ จะได้สารละลายสกัดคาโรทีนอยด์เข้มข้นที่ผ่านการ saponified แล้ว

6. การวิเคราะห์หาปริมาณเบตาคาโรทีนในสารละลายสกัดคาโรทีนอยด์เข้มข้น

นำสารละลายสกัดที่ได้จากการสกัดตามวิธีข้อ 2.1 รูปที่ 5 ใช้ภาวะการสกัดที่ได้จากข้อ 3 และผ่านกระบวนการ saponification ตามวิธีข้อ 5 มาวิเคราะห์หาปริมาณเบตาคาโรทีน ด้วยวิธี HPLC (Nelis and De Leenheer, 1983; Adewusi and Bradbury, 1993) (ภาคผนวก ก)

7. การศึกษาหาสารปนเปื้อนและตัวทำละลายตกค้างในสารละลายสกัดคาโรทีนอยด์เข้มข้น

7.1 วิเคราะห์หาสารปนเปื้อน คือ สารหนู (As) สารตะกั่ว (Pb) และทองแดง (Cu) นำสารละลายสกัดคาโรทีนอยด์จากการสกัดตามวิธีข้อ 2.1 รูปที่ 5 ใช้ภาวะการสกัดที่ได้จากข้อ 3 และผ่านกระบวนการ saponification ตามวิธีในข้อ 5 มาวิเคราะห์หาสารปนเปื้อน ด้วยวิธี atomic absorption spectrophotometry (AAS) แบบไม่ใช้เปลวไฟ (Robert, Bob and Isaac, 1967) (ภาคผนวก ก)

7.2 วิเคราะห์หาตัวทำละลายตกค้าง 2 ชนิด คืออะซีโตน และเฮกเซน นำสารละลายสกัดคาโรทีนอยด์จากการสกัดตามวิธีข้อ 2.1 รูปที่ 5ใช้ภาวะการสกัดที่ได้จากข้อ 3 และผ่านกระบวนการ saponification ตามวิธีข้อ 5 มาวิเคราะห์หาตัวทำละลายตกค้างในสารละลายสกัด ด้วยวิธีกาซโครมาโตกราฟี (Gas chromatography , GC) (ภาคผนวก ก)

8. การศึกษาเสถียรภาพของสารละลายสกัดคาโรทีนอยด์เข้มข้น

เตรียมสารละลายสกัดคาโรทีนอยด์จากเปลือกส้มเขียวหวาน ตามวิธีข้อ 2.1 รูปที่ 5 โดยใช้ภาวะที่คัดเลือกจากทดลองการศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการสกัดคาโรทีนอยด์จากเปลือกส้มเขียวหวานที่ได้จากข้อ 3 และทำสารละลายสกัดให้บริสุทธิ์โดยผ่านกระบวนการ saponification ตามวิธีข้อ 5 จากนั้นบรรจุสารละลายสกัดคาโรทีนอยด์เข้มข้นที่ผลิตปริมาณ 5 มิลลิลิตร ในขวดแก้วชนิดฝาเกลียวขนาด 5 มิลลิลิตร แล้วหุ้มด้วยกระดาษฟอยด์เพื่อป้องกันแสงสว่าง ศึกษาเสถียรภาพของสารละลายสกัดคาโรทีนอยด์เข้มข้นที่อุณหภูมิการเก็บ 3 ระดับ คือ อุณหภูมิแช่เยือกแข็ง (-18±2 องศาเซลเซียส) อุณหภูมิห้องเย็น (4±1 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 8 สัปดาห์ (2 เดือน) สุ่มตัวอย่างทุกสัปดาห์เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณคาโรทีนอยด์ทั้งหมดและคำนวณเป็นค่า carotenoids retention (%) ดังนี้

$$\text{carotenoids retention (\%)} = \frac{\text{ปริมาณคาโรทีนอยด์ที่เวลา t} \times 100}{\text{ปริมาณคาโรทีนอยด์เมื่อเวลาเริ่มต้น}}$$

โดยวางแผนการทดลองแบบ Asymmetric Factorial Design ขนาด 3x9 และทำการทดลอง 3 ซ้ำ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

9. การศึกษาเสถียรภาพของคาโรทีนอยด์ในรูปสารละลายสกัดในน้ำมันพืช

เตรียมสารละลายสกัดคาโรทีนอยด์สกัดเข้มข้นที่สกัดได้ตามวิธีข้อ 2.1 รูปที่ 5 จากภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองข้อ 3 ทำสารละลายสกัดให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยผ่านกระบวนการsaponification ตามวิธีข้อ 5 จากนั้นนำสารละลายสกัดผสมกับน้ำมันถั่วเหลืองที่เติมและไม่เติมสารแอนตีออกซิแดนซ์ (บีเอชทีและกรดซิตริค)โดยทำสารละลายให้มีความเข้มข้นของสารละลายสกัดในน้ำมันพืชร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก นำไปกวนในอ่างน้ำที่ 40 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เพื่อให้รวมเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นบรรจุสารละลายปริมาณ 5

มิลลิลิตร ในขวดแก้วชนิดฝาเกลียว ขนาด 5 มิลลิลิตร หุ้มด้วยกระดาษฟอยล์เพื่อป้องกันแสงสว่าง ศึกษาเสถียรภาพของสารละลายคาโรทีนอยด์ในน้ำมันถั่วเหลืองที่มีการเติมและไม่เติมบีเอชทีและกรดซิตริค โดยเก็บที่อุณหภูมิ 3 ระดับ คือ อุณหภูมิแช่เยือกแข็ง (-18±2 องศาเซลเซียส) อุณหภูมิห้องเย็น (4±1 องศาเซลเซียส) และ อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (3 เดือน) สุ่มตัวอย่างทุกสัปดาห์ เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณคาโรทีนอยด์ทั้งหมด และคำนวณเป็นค่า carotenoids retention(%) เช่นเดียวกับข้อ 8 โดยวางแผนการทดลองแบบ Asymmetric Factorial Design ขนาด 2x3x13 และทำการทดลอง 3 ซ้ำ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

10. การศึกษาการเติมสารละลายสกัดคาโรทีนอยด์เข้มข้นในผลิตภัณฑ์น้ำส้ม

เตรียมน้ำส้มคั้นจากผลส้มเขียวหวานสด และเติมสารละลายสกัดคาโรทีนอยด์เข้มข้นที่ได้ในน้ำส้มคั้น โดยแปรปริมาณสารละลายสกัดคาโรทีนอยด์เข้มข้นเป็น 6 ระดับ คือ สารละลายสกัดคาโรทีนอยด์เข้มข้น 0.00 0.02 0.04 0.06 0.08 และ 0.10 มิลลิลิตรต่อน้ำส้มคั้น 100 มิลลิลิตร เติมสารละลายสกัดคาโรทีนอยด์เข้มข้นในน้ำส้มคั้นแล้วนำไปกวนที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ด้วยเครื่อง magnetic stirrer นำน้ำส้มคั้นบรรจุในขวดแก้วที่ผ่านการฆ่าเชื้อโรคด้วยน้ำร้อน แล้วนำไปพาสเจอไรซ์ด้วยความร้อน 76 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที วิเคราะห์ผลโดยวัดค่าสีน้ำส้มคั้นหลังพาสเจอไรซ์ด้วยเครื่อง chromameter (Minolta-CR 300) วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทำการทดลอง 2 ซ้ำ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test