บทที่ 2

วิธีการดำเนินการวิจัย

การดำเนินการวิจัยได้แบ่งออกเป็น 3 ส่วนใหญ่ คือ

1. การวิเคราะห์ทางเคมี

เพื่อหาองค์ประกอบทางเคมีของผลมะค้อ และผลิตภัณฑ์น้ำมะค้อ โดยวิธีต่างๆ ดังต่อไปนี้

1.1 การวิเคราะห์หาสารอาหารต่างๆ โดยวิธี Proximate Analysis

1.2 การวิเคราะห์หาปริมาณแร่ธาตุบางชนิดด้วย Atomic Absorption Spectrophotometer

1.3 การวิเคราะห์หาปริมาณของกรดอะมิโนในโปรตีนด้วย Amino Acid Analyzer

1.4 การวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินต่างๆ โดยวิธีวิเคราะห์ของ Official method of analysis, Association of Official Analytical Chemists (AOAC)

1.5 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาล โดยวิธีของ Lane and Eynon

1.6 การวิเคราะห์หาปริมาณกรด โดยวิธีไทเทรต

1.7 การวิเคราะห์พีเอช ด้วยมาตรความเป็นกรด-เบส (pH meter)

2. การเตรียมผลิตภัณฑ์น้ำมะค้อสดและเข้มข้น

เพื่อเตรียมผลิตภัณฑ์น้ำมะค้อสดและเข้มข้น ด้วยเทคนิคที่เหมาะสมสำหรับชาวบ้าน ซึ่งจะใช้ศึกษาการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์น้ำมะค้อต่อไป

3. การศึกษาผลของการเก็บผลิตภัณฑ์น้ำมะค้อสดและเข้มข้นต่อปริมาณวิตามินซี

เพื่อหาวิธีที่เหมาะสม ในการเลือกเก็บรักษาผลิตภัณฑ์น้ำมะค้อ ให้คงคุณค่าทางโภชนาการ โดยอาศัยการสูญเสียของปริมาณวิตามินซีเป็นดัชนีชี้

1. การวิเคราะห์ทางเคมี (CHEMICAL ANALYSIS)

1.1 วิเคราะห์หาสารอาหารต่างๆ ในผลมะค้อ ผลิตภัณฑ์น้ำมะค้อ ได้แก่ ความชื้น โปรตีน ไขมัน กากใย เถ้า และคาร์โบไฮเดรต โดยวิธี Proximate Analysis (Osborne,1978; William,1984)

1.1.1 การเตรียมตัวอย่าง นำผลมะค้อสดมาล้างเปลือกให้สะอาด จากนั้นแกะเมล็ดออก นำเนื้อมะค้อสดที่ได้มาทำการวิเคราะห์หาสารอาหารต่างๆ

1.1.2 การหาปริมาณความชื้น โดยวิธี Drying

เครื่องมือ 1. ตู้อบไฟฟ้า (Hot Air Oven, Heraeus Theleo)

2. เดซิกเคเตอร์ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 นิ้ว

3. ขวดชั่งพร้อมฝา

วิธีวิเคราะห์

1. อบขวดชั่งเปล่าพร้อมฝาในตู้อบไฟฟ้า ที่อุณหภูมิ 100-102 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วนำมาใส่ในเดซิเคเตอร์ ปล่อยทิ้งไว้ให้เย็นก่อนนำไปชั่งหาน้ำหนักขวดชั่งเปล่า เสร็จแล้วนำเข้าตู้อบใหม่ อบซ้ำที่อุณหภูมิเดิม และปล่อยให้เย็นก่อนนำไปชั่งเป็นครั้งที่ 2 ทำซ้ำเช่นนี้จนกว่าจะได้น้ำหนักขวดชั่งเปล่าคงที่ คือมีน้ำหนักไม่ต่างจากครั้งก่อน 1-3 มิลลิกรัม จึงจะได้น้ำหนักขวดชั่งที่แท้จริง

2. ชั่งตัวอย่างประมาณ 5 กรัม ในขวดชั่ง แล้วนำไปอบในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 100 - 102 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง แล้วจึงนำออกมาใส่ในเดซิเคเตอร์ ปล่อยให้เย็น ชั่งหาน้ำหนักตัวอย่างและนำเข้าอบใหม่อีก 1-2 ชั่วโมง และชั่งใหม่จนกว่าจะได้น้ำหนักตัวอย่างที่คงที่ น้ำหนักที่หายไปเป็นปริมาณความชื้นทั้งหมด ซึ่งคำนวณได้จากสูตรดังต่อไปนี้

% ความชื้น = (น้ำหนักที่หายไป/น้ำหนักตัวอย่าง) x 100

1.1.3 การหาปริมาณโปรตีน โดย Kjeldahl method (William,1984)

เครื่องมือ 1. เครื่องย่อยและเครื่องกลั่นแบบ Kjeldahl's (Kjeltec system 1002 ประกอบด้วย Digestion unit และ Distilling unit , Tecator, Sweden)

2. เครื่องแก้ว ซึ่งประกอบด้วย

2.1 Kjeldahl tube ขนาด 100 มิลลิลิตร

2.2 Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร

2.3 บิวเรตต์ ขนาด 50 มิลลิลิตร

2.4 กระบอกตวง ขนาด 100 มิลลิลิตร

สารเคมี 1. กรดซัลฟุริกเข้มข้น (E. Merck)

2. เม็ด Catalyst ซึ่งประกอบด้วย ไดโซเดียมซัลเฟต 3.5 กรัม , คอปเปอร์ซัลเฟต 0.4 กรัม (Kjeltabs C. 3,5 ,Tecator, Sweden)

3. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40%

4. สารละลายอิ่มตัวของกรดบอริก

5. กรดซัลฟุริกเข้มข้นมาตรฐาน (ประมาณ 0.1 นอร์แมล)

6. Modified Methyl Red Indicator เตรียมโดยละลาย methyl red 1.250 กรัม และ methyl blue 0.825 กรัม ในเอธานอล จำนวน 1 ลิตร

7. น้ำกลั่นที่ปราศจากไนโตรเจน (Free-ammonia water)

วิธีวิเคราะห์

1. นำตัวอย่างที่อบแห้งแล้ว ชั่งน้ำหนักอย่างแม่นยำ 0.5 กรัม ใส่ใน Kjeldahl tube ขนาด 100 มิลลิลิตร

2. เติม Catalyst 1 เม็ด และกรดซัลฟุริกเข้มข้น 4 มิลลิลิตร ตั้งบนเตาอุณหภูมิ 370-420 องศาเซลเซียส เพื่อย่อยตัวอย่างให้กลายเป็นสารละลาย เมื่อสารละลายใสหมดแล้ว ให้ย่อยต่ออีกนาน 10-15 นาที เพื่อให้ไนโตรเจนในโปรตีนกลายเป็นอนินทรีย์ไนโตรเจนอย่างสมบูรณ์ แล้วทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

3. นำสารละลายจากข้อ 2. มาเติมน้ำกลั่นที่ปราศจากไนโตรเจน 15 มิลลิลิตร และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40% จำนวน 15 มิลลิลิตร นำไปกลั่นบนเครื่องกลั่น Kjeltec system 1002 distilling unit นาน 4 นาที เพื่อเปลี่ยนอนินทรีย์ไนโตรเจนให้เป็นแอมโมเนีย จับแอมโมเนียที่ระเหยออกมาด้วยสารละลายอิ่มตัวของกรดบอริก 20 มิลลิลิตร ที่เติม Modified Methyl Red อินดิเคเตอร์ 5 หยด ในที่สุดสารละลายอิ่มตัวของกรดบอริกจะเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเขียว

4. นำสารละลายอิ่มตัวของกรดบอริกที่ได้ไปไทเทรดกับกรดซัลฟุริกเข้มข้นเข้มข้นมาตรฐาน 0.1 นอร์แมล ที่จุดยุติจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน คำนวณหาค่าโปรตีนในผลมะค้อจากสูตร

$$\% \text{ โปรตีน} = [\{ 0.014 \times N \times (V_2 - V_1) \times \text{factor} \} / W] \times 100$$

โดยมีปัจจัยดังต่อไปนี้

0.014 = ค่าคงที่

factor = 6.25

N = ความเข้มข้นของกรดซัลฟุริกมาตรฐาน

V_1 = ปริมาตรของกรดซัลฟุริกที่ใช้ในการทดสอบไร้สิ่งตัวอย่าง (Blank)

V_2 = ปริมาตรของกรดซัลฟุริกที่ใช้ในตัวอย่าง (sample)

W = น้ำหนัก (กรัม) ของตัวอย่างมะค้อ

1.1.4 <u>การวิเคราะห์หาปริมาณไขมัน</u> โดยวิธี Solvent Extraction (Osborne,1978)

เครื่องมือ 1. Goldfisch Fat Extraction Apparatus พร้อมด้วย Porcelain thimble 6 ชิ้น และบีกเกอร์ สำหรับหาไขมัน ขนาด 150 มิลลิลิตรอีก 6 ใบ

สารเคมี 1. n-Hexane (J.T.Baker)

วิธีวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่างแห้งที่บดละเอียด ที่มีปริมาณมากพอที่จะบรรจุได้ราว 3 ใน 4 ของความสูงของ porcelain thimble ลงใน Porcelain thimble แล้วเติม n-hexane ประมาณ 100 มิลลิลิตร ใส่ในบีกเกอร์ที่อบแห้งแล้ว ซึ่งชั่งน้ำหนักจนได้น้ำหนักคงที่

แล้ว จากนั้นประกอบ thimble กับบีกเกอร์ และเครื่องควบแน่นของเครื่อง Goldfisch Fat Extraction Apparatus เข้าด้วยกัน

2. เลื่อนเตาไฟฟ้าข้างใต้ให้ชิดบีกเกอร์ เมื่อ n-hexane เริ่มเดือดให้เริ่มจับเวลา และปล่อยให้การสกัดไขมันดำเนินไปประมาณ 6 ชั่วโมง นำสารละลายที่ได้นี้มาระเหยเพื่อไล่ n-hexane ออกให้หมด จะได้ของเหลวข้นๆ นำไปอบในตู้อบที่ 100-102 องศาเซลเซียส จนได้น้ำหนักคงที่

3. น้ำหนักของบีกเกอร์ที่เพิ่มขึ้น เป็นน้ำหนักของไขมันที่สกัดได้ นำมาคำนวณปริมาณไขมันตามสูตรข้างล่างนี้

% ไขมัน = (น้ำหนักของไขมันที่สกัดได้ / น้ำหนักตัวอย่าง) x 100

1.1.5 <u>การหาปริมาณกากใย</u> (Crude fiber) โดยวิธีของ Osborne (1978)

เครื่องมือ 1. Crude Fiber Apparatus

2. บีกเกอร์ สำหรับหากากใย ขนาด 600 มิลลิลิตร

3. Fluted Funnel

4. เดซิกเคเตอร์ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 นิ้ว

5. ตู้อบไฟฟ้า (Heraeus Theleo)

สารเคมี 1. สารละลายกรดซัลฟุริก 1.25 %

2. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.25 %

3. เอทานอล 95 %

วิธีวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่างที่สกัดเอาไขมันออกแล้วจากข้อ 1.1.3 ประมาณ 2 กรัม ใส่ในบีกเกอร์สำหรับการย่อยขนาด 600 มิลลิลิตร

2. เติมสารละลายกรดซัลฟุริก 1.25 % จำนวน 200 มิลลิลิตร ตั้งบนเตาไฟฟ้าในเครื่องมือ ปล่อยให้กลั่นไหลกลับ นาน 30 นาที จึงนำมากรองผ่านตัวกรอง และล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นเดือด จนกว่าจะเป็นกลาง

3. ล้างตะกอนด้วยเอทานอล 95 % นำตัวกรองนั้นไปอบในตู้อบไฟฟ้าที่ 100 - 105 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง ชั่งแล้วอบจนได้น้ำหนักคงที่ (M_1) ล้าง

กากเส้นใยออกจากตัวกรองด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปอบจนได้น้ำหนักคงที่ (M_2) คำนวณหากากใย ตามสูตรดังต่อไปนี้

% กากใยอาหาร = [{(M_1 - M_2)/น้ำหนักตัวอย่าง} x 100] - % ปริมาณเถ้า

1.1.6 <u>การหาปริมาณเถ้า</u> (Ash) โดยวิธี Ashing ใน Muffle Furnance

เครื่องมือ 1. Porcelain Crucible (Rosenthall) ทนไฟ ขนาด 10 มิลลิลิตร

2. เดซิกเคเตอร์ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 นิ้ว

3. เตาไฟฟ้า (Hot Plate)

4. เตาเผา (Muffle Furnance , Gallenkamp)

วิธีวิเคราะห์

1. ล้าง Porcelain Crucible ขนาด 10 มิลลิลิตร ให้สะอาด แล้วอบให้แห้งจนได้น้ำหนักคงที่ ชั่งน้ำหนักบันทึกผลไว้ (M_2)

2. ชั่งตัวอย่างแห้งประมาณ 5 กรัม ใส่ใน Porcelain Crucible ที่ทราบน้ำหนักแล้วตามข้อ 1. ตั้งบนเตาไฟฟ้า เพื่อเผาเบื้องต้น จนกระทั่งตัวอย่างเป็นสีดำ แล้วไม่มีควันออกมา

3. นำตัวอย่างนี้ไปเผาให้เป็นเถ้า ในเตาเผาที่ 550 องศาเซลเซียส จนกระทั่งเถ้าเป็นสีขาว ซึ่งจะใช้เวลาเผาไม่ต่ำกว่า 8 ชั่วโมง

4. นำออกมาใส่ในเดซิเคเตอร์ ปล่อยให้เย็น แล้วชั่งหาน้ำหนักคงที่ (M_1) นำไปคำนวณหาปริมาณเถ้าได้จากสมการดังต่อไปนี้

% เถ้า = [(M_1 - M_2) / น้ำหนักตัวอย่าง] x 100

1.1.7 <u>การหาปริมาณคาร์โบไฮเดรต</u> จากการคำนวณ

จากส่วนประกอบของอาหารทั้งหมดเป็น 100 ส่วน ถ้าหักค่ารวมของความชื้น โปรตีน ไขมัน กากใย และเถ้า ออกแล้ว ค่าที่เหลือจึงเป็นค่าของคาร์โบไฮเดรต ซึ่งย่อยด้วยกรดด่างได้ ดังสมการข้างล่างนี้

% คาร์โบไฮเดรต = 100 - (%ความชื้น + %โปรตีน + %ไขมัน + %กากใย + %เถ้า)

1.2 <u>วิเคราะห์ปริมาณของแร่ธาตุ โซเดียม โพแทสเซียม แคลเซียม สังกะสี ทองแดง เหล็ก และแมงกานีส</u> ในเนื้อมะค้อโดย Atomic Absorption Spectrophotometer (William,1984)

เครื่องมือ 1. Digestion tube ขนาด 100 มิลลิลิตร

2. ปิเปตต์ ขนาด 2,5,10,20, และ 25 มิลลิลิตร

3. ขวดปริมาตร ขนาด 100 และ 250 มิลลิลิตร

4. Atomic Absorption Spectrophotometer (Shimadzu AA-650)

5. Ultraviolet Spectrophotometer (Unicam SP 1800)

สารเคมี 1. กรดซัลฟุริกเข้มข้น (E. Merck)

2. กรดไนตริกเข้มข้น (E. Merck)

3. สารละลายกรดไฮโดรคลอริก 10 %

4. สารละลายแอมโมเนียเจือจาง

5. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (E. Merck)

6. น้ำกลั่นชนิดปราศจากแร่ธาตุ (กลั่น 3 ครั้ง)

7. Vanadate molybdate composite reagent ซึ่งเตรียมโดยละลาย Ammonium molybdate 20 กรัม ในน้ำกลั่นที่ 50 องศาเซลเซียส ปริมาตร 400 มิลลิลิตร แล้วเทลงในสารละลาย Ammonium vanadate 1 กรัม ในน้ำกลั่นเดือด 300 มิลลิลิตร ที่มีกรดไนตริกเข้มข้นอยู่ 140 มิลลิลิตร ซึ่งทิ้งไว้ให้เย็นก่อนจะเทรวมกัน และคนจนเข้ากันดี จึงปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

วิธีวิเคราะห์

1. ภาชนะและอุปกรณ์ทุกชิ้น ก่อนใช้ให้แช่ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 10 % แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นชนิดปราศจากแร่ธาตุ หรือน้ำกลั่น 3 ครั้ง จนภาชนะและอุปกรณ์ทุกชิ้นปราศจากแร่ธาตุอื่นเจือปน

2. ชั่งตัวอย่างประมาณ 5 กรัม ใส่ใน digestion tube ขนาด 100 มิลลิลิตร ทำการย่อยโดยวิธี wet digestion (Osborne,1978) ใช้กรดซัลฟุริกเข้มข้น 10 มิลลิลิตร และกรดไนตริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ต้มที่อุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส จนหมดควัน

สีเหลืองของไนตรัสออกไซด์

3. ถ้าสารละลายยังเป็นสีน้ำตาลเข้มให้หยดกรดไนตริกเพิ่มครั้งละ 3-4 หยด ต้มต่อไปจนกระทั่งได้สารละลายใสสีเหลืองอ่อน และจนหมดควันของกรดซัลฟูริก ใช้เวลาทั้งหมดประมาณ 6 ชั่วโมง

4. เตรียมการทดสอบไร้สิ่งตัวอย่าง (blank) โดยใช้ปริมาณของกรดที่เติมเท่าๆ กัน แต่ไม่มีตัวอย่าง

5. นำตัวอย่างที่ย่อยสมบูรณ์แล้ว ออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็น แล้วถ่ายใส่ในขวดปริมาตร ขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากแร่ธาตุจนครบ 100 มิลลิลิตร แล้วแบ่งไปใช้วิเคราะห์ปริมาณ โซเดียม โพแทสเซียม แคลเซียม สังกะสี ทองแดง เหล็กและแมงกานีส โดยใช้เครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer (Shimadzu AA-650)

6. สารละลายอีกส่วนแบ่งไปวิเคราะห์หาปริมาณฟอสฟอรัส (Egans และคณะ,1981) โดยทำให้เกิดสีด้วย Vanadate molybdate composite reagent

6.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานฟอสเฟต โดยเตรียมสารละลายโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 3.834 กรัม/ลิตร ก่อน แล้วนำสารละลายนี้มา 25 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้เป็น 250 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐาน ที่มีความเข้มข้นของสารละลาย 1 มิลลิลิตร ที่มี 0.2 มิลลิกรัมของ P_2O_5

6.2 เตรียมสารละลายมาตรฐาน ที่มีความเข้มข้นต่างๆ กัน โดยปิเปตสารละลายมาตรฐาน 0,2.5,5,10,20,30,40 และ 50 มิลลิลิตร ตามลำดับ ใส่ในขวดปริมาตร ขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวม 50-60 มิลลิลิตร จึงเติมสารละลายแอมโมเนียเจือจาง 2-3 หยด ให้สารละลายเป็นกลาง แล้วเติมกรดไนตริกให้เป็นกรดเล็กน้อย

6.3 ปิเปตต์สารละลายตัวอย่างที่ได้จากข้อ 5. มา 10 - 20 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวม 50-60 มิลลิลิตร แล้วจึงเติมสารละลายแอมโมเนีย 2-3 หยด ให้สารละลายเป็นกลาง แล้วเติมกรดไนตริกให้เป็นกรดเล็กน้อย

6.4 เติม Vanadate molybdate composite reagent 25 มิลลิลิตร ลงในสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างที่เตรียมไว้ในข้อ 6.2 และ 6.3 แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 10 นาที วัดแอบซอร์แบนซ์ที่ 470 นาโนเมตร

โดยใช้เครื่อง Ultraviolet Spectrophotometer (Unicam SP 1800)

6.5 คำนวณปริมาณฟอสฟอรัสจากกราฟมาตรฐานที่ได้จากสารละลายมาตรฐาน ขณะที่ทำการทดลองพร้อมกัน

1.3 วิเคราะห์หาปริมาณวิตามินเอ อี บีหนึ่ง บีสอง ไนอะซิน และซี ตามวิธี AOAC

1.3.1 การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินเอ อี ตามวิธีของ De Vries และคณะ (1979)

เครื่องมือ 1. Erlenmeyer flask สีชา ขนาด 125 มิลลิลิตร

2. ขวดปริมาตร สีชา ขนาด 100 มิลลิลิตร

3. เครื่อง High Pressure Liquid Chromatography ของ Watters

4. Microsyringe ขนาด 20 ไมโครลิตร

สารเคมี 1. สารมาตรฐานเรตินอล (Roche)

2. แอซีโทน

3. เอทานอล 95 %

4. Pyrogallic acid

5. Alpha - tocopheryl acetate (Roche)

6. เอทานอล โพแทสเซียม ไฮดรอกไซด์

7. Tetrahydrofuran

8. ก๊าซไนโตรเจน

วิธีวิเคราะห์

1. เตรียมตัวอย่าง

ชั่งตัวอย่างผลมะค้อแห้งที่บดละเอียดมา 5 กรัม ใส่ erlenmeyer flask สีชา ขนาด 125 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร

2. เตรียมสารละลายมาตรฐาน

สารละลายมาตรฐานวิตามินเอ ละลายสารมาตรฐานเรตินอล

100 มิลลิกรัม ในแอซีโทน 10 มิลลิลิตร แล้วทำให้เจือจางด้วย เอทานอล 95 % เป็น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้นของเรทินอล 30 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชา เก็บไว้ในตู้เย็น

สารละลายมาตรฐานวิตามินอี ละลาย Alpha - tocopheryl acetate 35 มิลลิกรัม ในแอซีโทน 10 มิลลิลิตร ทำให้เจือจางด้วยเอทานอล 95 % เป็น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้นของวิตามินอีในรูปของ alpha - tocopheryl acetate 350 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ให้เตรียมใหม่ทุกครั้ง

ผสมสารละลายมาตรฐานวิตามินเอและสารละลายมาตรฐานวิตามินอี อย่างละ 10 มิลลิลิตร แล้วเติมเอทานอล 95 % จำนวน 20 มิลลิลิตร ผสมเข้าด้วยกันใส่ในขวดใบหนึ่ง และอีกใบหนึ่ง ผสมสารละลายมาตรฐานวิตามินเอ และสารละลายมาตรฐานวิตามินอี อย่างละ 20 มิลลิลิตร แล้วเติมเอทานอล 95% จำนวน 10 มิลลิลิตร

3. นำ สารละลายตัวอย่าง และสารละลายมาตรฐาน มาเติม pyrogallic acid 50 มิลลิกรัม จากนั้นเติมเอทานอล 95 % จำนวน 22 มิลลิลิตร และเอทานอล โพแทสเซียม ไฮดรอกไซด์ (0.25 กรัม/มิลลิลิตร) 8 มิลลิลิตร นำไปกลั่นไหลกลับภายใต้ก๊าซไนโตรเจน นาน 45 นาที แล้วทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

4. ทำให้เป็นกลางด้วยกรดแอซีติก ในเอทานอล 95 % เขย่าเป็นครั้งคราวแล้วถ่ายใส่ขวดปริมาตรสีชา ขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย 50 : 50 ของ tetrahydrofuran : เอทานอล 95 % จะทำให้เกิดการตกตะกอน

5. หาปริมาณของวิตามิน โดยกรองสารละลายที่ได้ ผ่านตัวกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร นำแต่ส่วนที่ใสมาฉีดเข้าเครื่อง High Pressure Liquid Chromatography ของ Watters โดยใช้ 20 ไมโครลิตร โดยปรับสภาวะของเครื่องสำหรับการวิเคราะห์หาวิตามินแต่ละชนิด ดังต่อไปนี้

5.1 วิตามินเอ ปรับสภาวะเครื่องดังนี้

Column : 10 um Lichrosorb RP-18

Detector : Vari-chrom variable wavelength detector (Varian Palo Alto, CA) excitation wavelength

328 nm.(20 nm. slit width) emission wavelength 510 nm. (20 nm. slit width)

Mobile phase : methanol + water (87 + 13)

Flow rate : 1.5 ml/min

โดย ทรานซ์ เรทินอล ทุกตัว จะถูกแยกออกมาภายใน 12 นาที เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน คำนวณปริมาณที่พบจากโครมาโทแกรม

5.2 วิตามินอี ปรับสภาวะเครื่องดังนี้

Column : prepacked reversed phase C_8

Detector : Vari-chrom variable wavelength detector (Varian Palo Alto, CA) excitation wavelength 308 nm.(10 nm. slit width) emission wavelength 330 nm. (10 nm. slit width)

Mobile phase : methanol + water (95 + 5), pH = 4 ปรับด้วย acetic acid

Flow rate : 1.5 ml/min

คำนวณปริมาณที่พบจากกราฟที่ได้โดย alpha-tocopherol จะถูกแยกออกมาภายใน 10 นาที เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน คำนวณปริมาณที่พบจากโครมาโทแกรม

1.3.2 <u>การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบีหนึ่ง</u> ตามวิธีใน AOAC (1980)

เครื่องมือ 1. เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge)

2. Spectrofluorometer (Kontron SFN 23 B)

3. เครื่องอังน้ำ (Water bath)

4. ขวดปริมาตร ขนาด 100, 200, 500 และ 1000 มิลลิลิตร ตามลำดับ

สารเคมี 1. สารมาตรฐานไทอะมีน ไฮโดรคลอไรด์ (Roche)

2. เอทานอล 20 %

3. กรดไฮโดรคลอริก 0.1 นอร์แมล

019086

4. Thymol blue

5. โซเดียมคลอไรด์ หรือ โพแทสเซียมคลอไรด์

6. โซเดียม ไฮดรอกไซด์ 15 %

7. ไอโซบูทานอล

8. สารออกซิไดซิงก์ เตรียมโดยผสมสารละลายโพแทสเซียมเฟอร์ริกไซยาไนด์ 1 % จำนวน 4 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ จนปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ใช้ภายใน 4 ชั่วโมง

วิธีวิเคราะห์

1. เตรียมสารละลายมาตรฐาน

1.1 <u>สารละลายมูลภัณฑ์ของไทอะมีน ไฮโดรคลอไรด์</u> (Stock Solution)

ชั่งสารมาตรฐานไทอะมีน ไฮโดรคลอไรด์ อย่างละเอียดให้ได้น้ำหนักระหว่าง 50-60 มิลลิกรัม แล้วนำมาละลายในเอทานอล 20 % ปรับพีเอช ให้ได้ระหว่าง 3.5 - 4.3 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 0.1 นอร์แมล แล้วเจือจางด้วยเอทานอลที่ทำให้เป็นกรด ให้ได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นสารละลายมาตรฐานไทอะมีนไฮโดรคลอไรด์ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส

1.2 <u>สารละลายมัธยันตร์</u> (Intermediate Solution)

ใช้สารละลายมูลภัณฑ์ 100 มิลลิลิตร ทำให้เจือจางด้วยเอทานอล 20 % เป็น 1000 มิลลิลิตร แล้วปรับพีเอชให้ได้ระหว่าง 3.5 - 4.3 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 0.1 นอร์แมล เก็บที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส

1.3 <u>สารละลายมาตรฐาน</u> (Standard Solution)

ใช้สารละลายมัธยันตร์ 5 มิลลิลิตร เจือจางเป็น 250 มิลลิลิตร ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 0.1 นอร์แมล จะได้สารละลายมาตรฐานไทอะมีนไฮโดรคลอไรด์ 0.2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

2. การเตรียมตัวอย่าง แบ่งเป็น 3 ขั้นตอน คือ

2.1 <u>การแยกสลายด้วยน้ำ</u> (Hydrolysis)

ชั่งผลมะค้อแห้ง ที่บดละเอียดแล้ว ให้มีความเข้มข้นของไทอะมีน ไฮโดรคลอไรด์ ประมาณ 0.2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เติมกรดไฮโดรคลอริก 0.1

นอร์แมล จำนวน 15 มิลลิลิตรต่อ 1 กรัมของตัวอย่าง ตั้งบนเครื่องอังน้ำที่ 95 - 100 องศาเซลเซียส คนอย่างสม่ำเสมอ ให้ของแข็งลอยอยู่ในสารแขวนลอยนั้นนาน 30 นาที

2.2 การสกัด (Extraction)

แยกเฉพาะส่วนใส มาทดสอบด้วย thymol blue ให้มีพีเอชระหว่าง 1.0-1.2 ปรับด้วยกรดไฮโดรคลอริก 0.1 นอร์แมล ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นนำเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยง เพื่อทำให้ตัวอย่างชั้นบนเป็นสารละลายใส กรองผ่านตัวกรองหรือกระดาษกรองชนิดไม่มีเถ้า (ash free papers)

2.3 การออกซิเดชั่น (Oxidation)

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ หรือ โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 1.5 กรัม ใส่ในแต่ละหลอดทดลอง ซึ่งมีทั้งหมด 4 หลอด และเติมสารละลายในหลอดต่างๆ ดังนี้

หลอดที่ 1 เติมสารละลายตัวอย่างที่เตรียมไว้ในข้อ 2 (2.2) 5 มิลลิลิตร และสารออกซิไดซิงก์ 3 มิลลิลิตร

หลอดที่ 2 เติมสารละลายตัวอย่างที่เตรียมไว้ในข้อ 2 (2.2) 5 มิลลิลิตร และสารละลายโซเดียม ไฮดรอกไซด์ 15 % จำนวน 3 มิลลิลิตร

หลอดที่ 3 เติมสารละลายมาตรฐานในข้อ 1 (1.3) 5 มิลลิลิตร และ สารออกซิไดซิงก์ 3 มิลลิลิตร

หลอดที่ 4 เติมสารละลายมาตรฐานในข้อ 1 (1.3) 5 มิลลิลิตร และสารละลายโซเดียม ไฮดรอกไซด์ 15 % จำนวน 3 มิลลิลิตร

เขย่าเบาๆ จากนั้นเติม ไอโซบูทานอล 13 มิลลิลิตร ทันที เขย่าโดยใช้เครื่องหมุนเหวี่ยง ประมาณ 2 นาที ปิเปตต์ส่วนบนของสารละลาย นำไปวัด ฟลูออเรสเซนซ์ ที่ 365 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrofluorometer (Kontron SFN 23 B) ได้

ค่าฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายตัวอย่าง = l

ค่าฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายตัวอย่างที่เติมโซเดียม ไฮดรอกไซด์ 15 % จำนวน 3 มิลลิลิตร = b

ค่าฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายมาตรฐาน = s

ค่าฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายมาตรฐานที่เติมโซเดียม ไฮดรอกไซด์ 15 % จำนวน 3 มิลลิลิตร = d

คำนวณค่า มิลลิกรัม ของไทอะมีน ไฮโดรคลอไรด์ ใน 5 มิลลิลิตร ของสารละลายตัวอย่าง = (l-b)/(s-d)

1.3.3 การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบีสอง ตามวิธีใน AOAC (1980)

เครื่องมือ 1. ขวดปริมาตร ขนาด 100, 200, 500 และ 1000 มิลลิลิตร ตามลำดับ

2. ปิเปตต์ ขนาด 10, 50 มิลลิลิตร

3. เครื่องอังน้ำ (Water bath)

4. Spectrofluorometer (Kontron SFN 23 B)

สารเคมี 1. สารมาตรฐานไรโบฟลาวิน (Roche)

2. กรดแอซีติก 0.02 นอร์แมล

3. สารละลายโพแทสเซียม เปอร์แมงกาเนต 4 %

4. สารละลายไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์ 3 %

5. โซเดียม ไดไทโอเนต

วิธีวิเคราะห์

1. เตรียมสารละลายมาตรฐาน

1.1 สารละลายมูลภัณฑ์ของไรโบฟลาวิน (Stock Riboflavin solution)

ละลายสารมาตรฐานไรโบฟลาวิน 50 มิลลิกรัมในกรดแอซีติก 0.02 นอร์แมล ให้ได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ตั้งบนเครื่องอังน้ำจะช่วยให้ละลายเร็วขึ้น เก็บภายใต้โทลูอีนที่ 0 องศาเซลเซียส จะมีความเข้มข้นของไรโบฟลาวิน 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

1.2 สารละลายมัธยันตร์ (Intermediate solution)

ใช้สารละลายมูลภัณฑ์ของไรโบฟลาวิน 100 มิลลิลิตร เจือจางด้วยกรดแอซีติก 0.02 นอร์แมล ให้ได้ปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร เก็บภายใต้โทลูอีนที่ 0 องศาเซลเซียส จะมีความเข้มข้นของไรโบฟลาวิน 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

1.3 สารละลายมาตรฐาน (Standard solution)

ใช้สารละลายมัธยันตร์ 10 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จะมีความเข้มข้นของไรโบฟลาวิน 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

2. การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

ชั่งผลมะค้อแห้ง ที่บดละเอียดแล้ว ประมาณ 1 กรัม เติมกรดไฮโดรคลอริก 0.1 นอร์แมล 10 มิลลิลิตร ให้มีไรโบฟลาวิน 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เขย่าแล้วนำไปเข้าหม้อนึ่งอัดไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121-123 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ถ้าเกิดเป็นก้อนให้เขย่าแรงๆ ให้กระจายออก ปรับพีเอชให้ได้ 6.0-6.5 ด้วยสารละลายโซเดียม ไฮดรอกไซด์เจือจาง ถ้ามีตะกอนเกิดขึ้นอีกให้เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเจือจางจนกระทั่งตะกอนหมดไป กรองผ่านกระดาษกรองแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

3. การทำให้เกิดสี

ปิเปตต์สารละลายตัวอย่างจากข้อ 2. มา 10 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลอง 4 หลอด โดย 2 หลอดแรก เติมสารละลายมาตรฐานในข้อ 1 (1.3) จำนวน 1 มิลลิลิตร อีก 2 หลอดหลัง เติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร และแต่ละหลอดเติมกรดแอซีติก 1 มิลลิลิตร และสารละลายโพแทสเซียม เปอร์แมงกาเนต 4 % จำนวน 0.5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที จากนั้นเติมสารละลายไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์ 3 % จำนวน 0.5 มิลลิลิตร ซึ่งจะทำลายสีของโพแทสเซียม เปอร์แมงกาเนต ภายใน 10 วินาที เขย่าแรงๆ จนกระทั่งออกซิเจนที่เกินถูกไล่ออกหมด จึงวัดค่าฟลูออเรสเซนซ์ ด้วย Spectrofluorometer ที่ 440-565 นาโนเมตร ได้ค่าฟลูออเรสเซนซ์ของหลอดสารละลายตัวอย่าง และสารละลายมาตรฐานคู่แรกได้ X_1 และ X_2 เฉลี่ยได้ค่า X หลอดสารละลายตัวอย่าง และน้ำกลั่นคู่หลังได้ B_1 และ B_2 เฉลี่ยได้ค่า B แล้วนำหลอดทดลองคู่หลังนี้ เติมโซเดียม ไดไทโอเนต* 20 มิลลิกรัม เพื่อทำลายฟลูออเรสเซนซ์ของไรโบฟลาวิน แล้วนำมาวัดค่าฟลูออเรสเซนซ์ ของหลอดสารละลายตัวอย่าง และน้ำกลั่น และโซเดียม ไดไทโอเนต ได้ค่า C_1 และ C_2 ได้ค่าเฉลี่ย C นำมาคำนวณค่าของวิตามินบีสองตามสมการดังนี้

$$\text{mg Riboflavin/ml final sample solution} = [(B-C)/(X-B)]\times 0.10\times 0.001$$

*โซเดียม ไดไทโอเนต ถ้าเติมมากกว่า 20 มิลลิกรัม จะไปลดสีของสารอื่น ทำให้อ่านค่าผิดพลาดได้

1.3.4 <u>การวิเคราะห์ปริมาณไนอาซิน</u> ตามวิธีใน AOAC (1980)

เครื่องมือ 1. Erlenmeyer flask ขนาด 50, 100 มิลลิลิตร

2. ปิเปตต์ขนาด 2, 10, 20 มิลลิลิตร

3. Ultraviolet Spectrophotometer (Unicam SP 1800)

4. หม้อนึ่งอัดไอ (Autoclave)

สารเคมี 1. สารมาตรฐานไนอาซิน (Roche)

2. เอทานอล 25 %

3 . กรดซัลฟุริก 1 นอร์แมล

4. โซเดียม ไฮดรอกไซด์ 10 นอร์แมล

5. Bromocresol green

6. กรดไฮโดรคลอริกเจือจาง

7. แอมโมเนียเจือจาง

8. Sulfanilic acid 10 % เตรียมจากแอมโมเนียม ไฮดรอกไซด์ 1 มิลลิลิตร Sulfanilic acid 20 กรัม และน้ำกลั่น 170 มิลลิลิตร เขย่าจนกระทั่งละลายหมด ปรับพีเอชเป็น 4.5 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (1:1) โดยใช้ Bromocresol green เป็นตัวบอก แล้วเจือจางเป็น 200 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น สารละลายสุดท้ายเกือบจะไม่มีสี

9. สารละลายไซยาโนเจน โบรไมด์ 10 % เตรียมโดยใส่น้ำอุ่นที่ 40 องศาเซลเซียส 370 มิลลิลิตร ในภาชนะก่อน แล้วเติมไซยาโนเจนโบรไมด์ 40 กรัม เขย่าแรงๆ จนกระทั่งละลายหมด ทิ้งให้เย็น แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นเป็น 400 มิลลิลิตร เก็บในตู้เย็น ระวังอย่าให้ถูกผิวหนังและตา

10. แอมโมเนียม ซัลเฟต

วิธีวิเคราะห์

1. เตรียมสารละลายมาตรฐาน

1.1 <u>สารละลายมูลภัณฑ์ของไนอาซิน</u> (Stock Niacin Standard Solution)

ละลายสารมาตรฐานไนอาซิน 50 มิลลิกรัม ในเอทานอล 25 % ปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร เก็บที่ 10 องศาเซลเซียส จะได้สารละลายมาตรฐานมูลภัณฑ์ของไนอาซินที่มีความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

1.2 สารละลายมาตรฐาน (Standard Solution)

เจือจางสารละลายมูลภัณฑ์ของไนอาซิน 2 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 4 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

2. เตรียมสารละลายตัวอย่าง

ชั่งผลมะค้อแห้ง ที่บดละเอียดแล้วมาประมาณ 10 กรัม ใส่ใน erlenmeyer flask ขนาด 1000 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟุริก 1 นอร์แมล 200 มิลลิลิตร แล้วนำไปเข้าหม้อนึ่งอัดไอที่ความดัน 15 ปอนด์ หรือ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วทำให้เย็นก่อนปรับพีเอชให้เป็น 4.5 ด้วยสารละลายโซเดียม ไฮดรอกไซด์ 10 นอร์แมล โดยใช้ bromocresol green เป็นตัวบอก แล้วทำให้เจือจางด้วยน้ำกลั่น ให้มีปริมาตร 250 มิลลิลิตร

3. ชั่งแอมโมเนียมซัลเฟต 17 กรัม ใส่ในขวดปริมาตร ขนาด 50 มิลลิลิตร 2 ใบ ใบแรกใส่สารละลายตัวอย่าง 40 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่นเป็น 50 มิลลิลิตร ใบหลังใส่สารละลายมาตรฐาน 40 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่นเป็น 50 มิลลิลิตร ซึ่งจะได้ความเข้มข้น 3.2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

4. การทำให้เกิดสี

ปิเปตต์สารละลายมาตรฐาน และสารละลายตัวอย่างที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต และน้ำกลั่นเรียบร้อยแล้ว (ข้อ 3) อย่างละ 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลอง 4 หลอด แล้วเติมสารละลายอื่นเพื่อให้เกิดสีดังนี้

Standard Blank	**Sample Blank**
1.0 ml standard solution	1.0 ml sample solution
5.0 ml H_2O	5.0 ml H_2O
0.5 ml dil.NH_4OH	0.5 ml dil.NH_4OH
2.0 ml 10 % Sulfanilic acid	2.0 ml 10 % Sulfanilic acid
0.5 ml dil. HCl	0.5 ml dil. HCl

Standard Solution	Sample Solution
1.0 ml standard solution	1.0 ml sample solution
0.5 ml dil. NH_4OH	0.5 ml dil. NH_4OH
5.0 ml CNBr	5.0 ml CNBr
2.0 ml 10 % Sulfanilic acid	2.0 ml 10 % Sulfanilic acid
0.5 ml H_2O	0.5 ml H_2O

วัดแอบซอร์แบนซ์ที่ 430 - 450 นาโนเมตร ภายใน 30 วินาที หลังจากเติมสารละลาย sulfanilic acid ในหลอดการทดสอบไร้สิ่งตัวอย่าง (blank) ส่วนในหลอดสารละลาย สีจะเข้มสูงสุดภายใน 90 วินาที หลังจากเติมสารละลาย sulfanilic acid จะอยู่ได้นาน 120 วินาที แล้วสีจะซีดจางลงอย่างช้าๆ จึงควรรีบอ่านค่าแอบซอร์แบนซ์ ของสารละลายมาตรฐาน เมื่อให้ standard blank มีค่าเป็น 0 และอ่านค่าแอบซอร์แบนซ์ ของสารละลายตัวอย่าง เมื่อให้ sample blank มีค่าเป็น 0 นำค่าที่ได้มาคำนวณหาปริมาณของไนอาซิน

1.3.5 <u>การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซี</u> ตามวิธีใน AOAC (1980)

เครื่องมือ
1. ขวดปริมาตร ขนาด 50, 200, 1000 มิลลิลิตร
2. Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร
3. ปิเปตต์ ขนาด 1, 5 มิลลิลิตร

สารเคมี
1. สารละลาย Metaphosphoric acid เตรียมโดยละลาย 30 กรัมของ Metaphosphoric acid ในกรดแอซีติกล้วน 80 มิลลิลิตรและน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร คนให้ละลายจนหมด แล้วปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น กรองสารละลายถ้าจำเป็น
2. สารละลายมาตรฐาน Indophenol เตรียมโดยชั่ง โซเดียมไบคาร์บอเนต 42 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปริมาตร ขนาด 200 มิลลิลิตร ชั่ง 2,6 - dichloro indophenol 50 มิลลิกรัม คนให้ละลายปรับปริมาตรเป็น 200

มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น เก็บในขวดสีชา ควรเตรียมใหม่ทุกครั้ง

3. สารมาตรฐานกรดแอสคอบิก (Roche)

วิธีวิเคราะห์

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอบิก โดยชั่งกรดแอสคอบิกอย่างแม่นยำ 50 มิลลิกรัม ใส่ในขวดปริมาตร ขนาด 50 มิลลิลิตร เจือจางด้วยสารละลาย metaphosphoric acid ปรับปริมาตรจนครบ 50 มิลลิลิตร

2. ปิเปตต์สารละลายมาตรฐานกรดแอสคอบิก 1.0 มิลลิลิตร ใส่ใน erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ทำให้เจือจางด้วยสารละลาย metaphosphoric acid 20 มิลลิลิตร นำไปไทเทรตด้วยสารละลายมาตรฐาน indophenol จุดยุติจะเป็นสีชมพูซึ่งจะมีความคงตัวประมาณ 5 วินาที

3. ปิเปตต์ตัวอย่างน้ำมะค้อมา 5.0 มิลลิลิตร ใส่ใน erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ทำให้เจือจางด้วยสารละลาย metaphosphoric acid 20 มิลลิลิตร นำไปไทเทรตด้วยสารละลายมาตรฐาน indophenol จุดยุติจะเป็นสีชมพู ซึ่งจะมีความคงตัวประมาณ 5 วินาที

การคำนวณปริมาณวิตามินซีคำนวณได้ตามสมการดังต่อไปนี้

$$\text{ปริมาณวิตามินซี (มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร)} = \frac{(a-b) \times c \times 100}{(s-b) \times \text{ปริมาณของตัวอย่าง (มิลลิลิตร)}}$$

โดยมีปัจจัยดังต่อไปนี้

a = ปริมาณที่ใช้ในการไทเทรตของตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

b = ปริมาณที่ใช้ในการไทเทรตของการทดสอบไร้สิ่งตัวอย่าง (Blank) (มิลลิลิตร)

s = ปริมาณที่ใช้ในการไทเทรตของสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอบิก (มิลลิลิตร)

c = มิลลิกรัมของสารมาตรฐานกรดแอสคอบิก ที่สมมูลย์กับ 1.0 มิลลิลิตร ของสารละลายมาตรฐาน indophenol

1.4 วิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดอะมิโน โดยวิธีของ Meason และคณะ (1980)

เครื่องมือ 1. Round bottom flask ขนาด 100 มิลลิลิตร

2. เครื่องอังน้ำแข็ง (Ice bath)

3. Rotary evaporator

4. เครื่องอังทราย (Sand bath)

5. Amino Acid Analyzer (Hitachi 835-50)

สารเคมี 1. สารละลายไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์ 30 %

2. กรดฟอร์มิก 89 %

3. กรดไฮโดรคลอริก 6 นอร์แมล

4. ฟีนอล

5. Lithium loading buffer pH 2.2

6. สารผสมเปอร์ออกไซด์ เตรียมจากสารละลายไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์ 30 % จำนวน 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับกรดฟอร์มิก 89 % จำนวน 45 มิลลิลิตร และ ฟีนอล 25 มิลลิกรัม แล้ววางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที ทิ้งให้เย็น แล้วแช่ในเครื่องอังน้ำแข็ง นาน 15 นาที

วิธีวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่างเนื้อมะค้อแห้ง ที่บดละเอียดแล้ว ให้มีปริมาณไนโตรเจนประมาณ 10 มิลลิกรัม ใส่ใน round bottom flask ขนาด 100 มิลลิลิตร

2. เติมสารผสมเปอร์ออกไซด์ 7 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่างข้อ 1.อย่างช้าๆ และระมัดระวัง คนให้เข้ากัน แล้วปิดภาชนะให้สนิท เก็บแช่ในช่องแข็งที่ 0 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง แล้วไล่กรดฟอร์มิกที่เหลือออกโดยใช้ rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

3. นำตัวอย่างที่ถูกออกซิไดซ์แล้ว จากข้อ 2. มากลั่นไหลกลับ ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 6 นอร์แมล 50 มิลลิลิตร และ ฟีนอล 50 มิลลิกรัม บนเครื่องอังทราย ที่อุณหภูมิ 145 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แล้วระเหยจนตัวอย่างแห้ง

4. เติมกรดไฮโดรคลอริก 6 นอร์แมล ให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

แล้วปิเปตต์ตัวอย่าง 25 มิลลิลิตร นำไประเหยด้วย rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียส จนกระทั่งตัวอย่างแห้ง

5. นำตัวอย่างจากข้อ 4. มาทำให้เจือจางด้วย Lithium loading buffer pH 2.2 จำนวน 50 มิลลิลิตร ปิเปตต์ตัวอย่างมา 5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตรด้วย Lithium loading buffer

6. นำตัวอย่างที่ได้จากข้อ 5. มาฉีดเข้าเครื่อง Amino Acid Analyzer ซึ่งปรับให้มีสภาวะดังต่อไปนี้

Column : 2.6 x 250 mm (Resin # 2619)

Flow rate : 0.275 ml/min

Sample : 5 n mol/50 ul

Ammonia filter column : 4 x 200 mm (Resin # 2650)

7. แปรผลจากโครมาโทแกรมที่ได้ เปรียบเทียบชนิดกรดอะมิโน และคำนวณหาปริมาณกรดอะมิโน

1.5 <u>วิเคราะห์ปริมาณกรด</u> โดยวิธีไทเทรต (Ranganna,1977)

เครื่องมือ 1. บิวเรตต์ ขนาด 50 มิลลิลิตร

2. Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร

3. กระดาษกรองเบอร์ 4 (Whatman paper)

สารเคมี 1. Phenolphthalein TS เตรียมโดยละลาย 1 กรัมของ Phenolphthalein ในเอทานอล 100 มิลลิลิตร

2. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์แมล

วิธีวิเคราะห์

1. นำน้ำมะค้อสด มาทำให้ใสก่อน โดยกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 จากนั้นปิเปตต์เอาน้ำมะค้อสด ที่ผ่านการกรองแล้วมา 10 มิลลิลิตร ใส่ลงใน erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร

2. เติมน้ำ 100 มิลลิลิตร และหยด phenolphthalein TS 3 หยด นำไปไทเทรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์แมล โดยมี phenolphthalein

เป็นอินดิเคเตอร์ จุดยุติจะเปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีชมพู คำนวณหาปริมาณกรดจากสมการดังต่อไปนี้

$$\%\text{ปริมาณกรด} = \frac{1}{10} \times \frac{\text{equivalent weight of acid} \times \text{normality of NaOH} \times \text{Titer}}{\text{weight of sample}}$$

Equivalent weight of citric acid (monohydrate) = 70.0 กรัม

1.6 <u>วิเคราะห์หาพีเอช</u> โดยใช้มาตรความเป็นกรด-เบส (pH meter)

เครื่องมือ 1. มาตรความเป็นกรด-เบส (pH meter) (RADIOMETER COPENHAGEN, PHM64 RESEARCH pH METER)

2. บีกเกอร์ ขนาด 50 มิลลิลิตร

สารเคมี 1. สารละลายมาตรฐานบัฟเฟอร์ พีเอช 4.0

2. สารละลายมาตรฐานบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0

วิธีวิเคราะห์

1. Standardize มาตรความเป็นกรด-เบส ด้วยสารละลายมาตรฐานบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ก่อน จากนั้นทำการ Standardize มาตรความเป็นกรด-เบส อีกครั้งด้วยสารละลายมาตรฐานบัฟเฟอร์ พีเอช 4.0

2. นำน้ำมะค้อสดมาจำนวน 25 มิลลิลิตร ใส่ลงในบีกเกอร์ ขนาด 50 มิลลิลิตร แล้ววัดพีเอช ด้วยมาตรความเป็นกรด-เบส

1.7 <u>วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล</u> โดยวิธีของ Lane and Eynon (Ranganna,1977)

เครื่องมือ 1. บีกเกอร์ ขนาด 400 มิลลิลิตร

2. Erlenmeyer flask ขนาด 250, 1000 มิลลิลิตร

3. ขวดปริมาตร ขนาด 100, 200 และ 250 มิลลิลิตร

4. บิวเรตต์ ขนาด 50 มิลลิลิตร

5. ปิเปตต์ ขนาด 2 มิลลิลิตร
6. กระดาษกรองเบอร์ 4 (Whatman paper)
7. กระดาษกรองเบอร์ 41H (Whatman paper)

สารเคมี 1. สารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต เตรียมโดยละลายคอปเปอร์ซัลเฟต จำนวน 69.28 กรัม ลงในน้ำ และเจือจางให้มีปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

2. สารละลายแอลคาไลทาร์เทรต เตรียมโดยละลายเกลือ Rochelle (โพแทสเซียมโซเดียมทาร์เทรต, $KNaC_4H_4O_6.4H_2O$) จำนวน 346 กรัม และโซเดียมไฮดรอกไซด์ 100 กรัม ลงในน้ำ และทำให้มีปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร

3. Fehling 's solution เตรียมโดยผสมสารเคมีในข้อ 1. และข้อ 2. ที่มีปริมาตรเท่าๆ กันก่อนจะใช้

4. Methylene blue อินดิเคเตอร์ เตรียมโดยละลาย Methylene blue 1 กรัม ในน้ำ 100 มิลลิลิตร

5. สารละลาย Neutral lead acetate 45 % เตรียมโดยละลาย Neutral lead acetate, ($Pb(C_2H_3O_2)_2.3H_2O$) จำนวน 225 กรัม ในน้ำ และเจือจางให้มีปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร

6. สารละลายโพแทสเซียมออกซาเลท 22 % เตรียมโดยละลายโพแทสเซียมออกซาเลท ($K_2C_2O_4.H_2O$) จำนวน 110 กรัม ในน้ำ และเจือจางให้มีปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร ปริมาณ lead acetate ที่มากเกินพอในสารละลายน้ำตาล (sugar solution) จะมีผลทำให้เกิดความผิดพลาดในการไทเทรต

กำหนดปริมาณที่แน่นอนของสารละลายโพแทสเซียมออกซาเลท เพื่อที่จะตกตะกอน Pb^{++} จากสารละลาย lead acetate 2 มิลลิลิตร ดังนี้ ใช้บีกเบอร์ ขนาด 50 มิลลิลิตร จำนวน 6 ใบ ใส่น้ำ 25 มิลลิลิตร และปิเปตต์สารละลาย lead acetate จำนวน 2 มิลลิลิตร ลงไปในแต่ละบีกเกอร์เติม 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0 และ 2.1 มิลลิลิตร ของสารละลายโพแทสเซียม ตามลำดับ กรองแต่ละบีกเกอร์ด้วยกระดาษกรองเบอร์ 41H และเก็บที่กรองแล้วใส่

ใน erlenmeyer flaskขนาด 50 มิลลิลิตร ในแต่ละส่วนที่กรองได้เติมสารละลายโพแทสเซียมลงไป 2-3 หยด ปริมาณที่ถูกต้องของโพแทสเซียมออกซาเลทที่ต้องการคือ ปริมาณที่น้อยที่สุดซึ่งเมื่อเติมสารละลาย lead acetate ลงไป 2 มิลลิลิตร จะให้ผลลบ สำหรับ lead ในส่วนที่กรองได้ คือไม่มีการตกตะกอน ปริมาตรที่สมดุลย์นี้จะบันทึกไว้ที่ขวด และจะนำไปใช้เมื่อสารละลายถูกใช้ไปในช่วงการตรวจวัดปริมาณน้ำตาล

<u>การเตรียมสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน</u> (Standard sugar solution)

ชั่งซูโครสบริสุทธิ์ 9.5 กรัม นำไปใส่ในบีกเกอร์ ขนาด 400 มิลลิลิตร เติมน้ำ 100 มิลลิลิตร และกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 3 วัน ที่อุณหภูมิ 20-25 องศาเซลเซียส เพื่อที่จะทำให้เกิดการผกผัน (inversion) จากนั้นนำไปใส่ในขวด ขนาด 1000 มิลลิลิตร และทำให้มีปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

ทำให้สารละลายน้ำตาลเป็นกลางโดยการไทเทรตดังนี้ ปิเปตต์สารละลายมาตรฐานหกกลับ 50 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดปริมาตร ขนาด 200 มิลลิลิตร เติมน้ำลงไป 100 มิลลิลิตร ใช้ phenolphthalein เป็นอินดิเคเตอร์ เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 20% จนกระทั่งสารละลายมีสีชมพู เติมกรดไฮโดรคลอริก 1 นอร์แมล ลงไปมีละหยดจนกระทั่งสีชมพูหายไป เติมน้ำให้มีปริมาตร 200 มิลลิลิตร นำไปไทเทรตด้วย 10 มิลลิลิตรของ Fehling's solution วิธีการไทเทรตอธิบายไว้ในหัวข้อการไทเทรตวิธีมาตรฐาน

<u>การไทเทรตวิธีมาตรฐาน</u> (Standard method of titration)

ปิเปตต์ Fehling's solution 10 มิลลิลิตร ใส่ลงไปใน erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร จำนวน 2 ใบ เติมสารละลายที่จะไทเทรตลงไปในบิวเรตต์ ขนาด 50 มิลลิลิตร และให้ไหลลงไปในขวดในปริมาตรที่ต้องการที่จะไปลด fehling's solution ผสมส่วนผสมในขวดให้เข้ากัน นำไปต้มให้เดือด ประมาณ 2 นาที และเติมสารละลาย methylene blue 2 หยด ลงไปโดยระวังไม่ให้สัมผัสกับด้านข้างของขวดทำให้การไทเทรตเป็นไปอย่างสมบูรณ์ภายใน 1 นาที จนกระทั่งสีของอินดิเคเตอร์หายไปโดยสมบูรณ์ ที่จุดยุติของเหลวจะมีสีแดงอิฐของตะกอนคูปรัสออกไซด์ ซึ่งมีก่อนที่อินดิเคเตอร์จะถูกเติมลงไป

วิธีวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่างน้ำมะค้อ ที่ผ่านการกรองด้วยกระดาษกรอง เบอร์ 4 จำนวน 15 กรัม เติมน้ำ 50 มิลลิลิตร แล้วทำให้เป็นกลาง มีพีเอชประมาณ 7.5 - 8.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์แมล และนำไปใส่ในขวดปริมาตร ขนาด 100 มิลลิลิตร

2. เติมสารละลาย lead acetate 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ 10 นาที

3. เติมโพแทสเซียมออกซาเลท ในปริมาณที่จำเป็น ทำให้มีปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร และนำไปกรองผ่านกระดาษกรอง เบอร์ 5 ทดสอบสารละลายที่กรองด้วยโพแทสเซียมออกซาเลทเล็กน้อย เพื่อทดสอบให้แน่ใจว่าไม่มีตะกอนเกิดขึ้น

4. นำสารละลายที่กรองได้จากข้อ 2. มาจำนวน 50 มิลลิลิตร ใส่ลงใน erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมกรดซิตริก 5 กรัม ตั้งทิ้งไว้ 1 คืน จากนั้นเติมน้ำ 50 มิลลิลิตร และต้มเบาๆ ประมาณ 10 นาที เพื่อที่จะหกกลับน้ำตาลซูโครส แล้วทำให้เย็น เปลี่ยนมาใส่ในขวดปริมาตร ขนาด 250 มิลลิลิตร ทำให้เป็นกลางโดยใช้ phenolphthalein เป็นอินดิเคเตอร์

5. เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 20 % จนสารละลายมีสีชมพู และเติมกรดไฮโดรคลอริก 1 นอร์แมล ทีละหยดจนสีชมพูหายไป ถ้ามีสีแดงซ่อนอยู่ด้วยที่จุดยุติปรับให้มีพีเอช 8.1 โดยใช้มาตรความเป็นกรด-เบส ทำให้มีปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตร และไทเทรตโดยวิธีมาตรฐาน คำนวณหาปริมาณน้ำตาลดังสมการต่อไปนี้

$$\% \text{ ปริมาณน้ำตาล} = \frac{0.0422 \times 100 \times \text{dilution factor}}{\text{ปริมาณสารละลายน้ำตาลที่ใช้ในการไทเทรต}}$$

2. <u>การเตรียมผลิตภัณฑ์น้ำมะค้อสดและเข้มข้น</u>

2.1 <u>การเตรียมตัวอย่าง</u>

ผลมะค้อที่เก็บจากต้นมะค้อหลายๆ ต้น ภายในท้องที่เดียวกัน คือ ที่บ้านโนนโม่ง ตำบลศิลา อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น ในวันเดียวกัน นำมารวมกันแล้วบรรจุใส่ในขวดแก้วสีชา เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส

การแปรรูปผลิตภัณฑ์น้ำมะค้อสด และเข้มข้น โดยดัดแปลงจากการทำน้ำผลไม้เสาวรส (ประเสริฐ สายสิทธิ์,2531; กัลยาณี ดันติธรรม,2531; ผลิตภัณฑ์เสาวรสหรือกะทกรกผรั่ง, 2530; เครื่องดื่มน้ำผลไม้ชนิดผงและชนิดเม็ด,2532) ขั้นตอนในการผลิตได้เขียนเป็นแผนผังไว้ตามรูปที่ 4 และ 5 ตามลำดับ ส่วนรายละเอียดของวิธีการผลิต มีดังต่อไปนี้

2.2 <u>การผลิตน้ำมะค้อสด</u>

2.2.1 นำผลมะค้อมาล้างเปลือกให้สะอาด จากนั้นแกะเปลือกออกเอาเนื้อข้างในผลมะค้อใส่ผ้าขาวบาง บีบจนได้น้ำมะค้อ แยกเอาเมล็ดออก (ผลมะค้อ 10 กิโลกรัม นำมาคั้นจะได้น้ำมะค้อจำนวนประมาณ 2.8 - 3 ลิตร)

2.2.2 นำน้ำมะค้อที่ได้จากข้อ 2.2.1 มาเติมน้ำเชื่อมร้อยละ 50

2.2.3 เติมโซเดียมเบนโซเอท เป็นวัตถุกันเสีย ด้วยปริมาณ 0, 0.5 และ 1.0 (กรัม/มิลลิลิตร) ตามลำดับ การเติมทำโดยการนำโซเดียมเบนโซเอท ที่ชั่งน้ำหนักแน่นอนแล้วมาละลายด้วยน้ำเล็กน้อย เติมลงในผลิตภัณฑ์น้ำมะค้อสดแล้วคนให้ทั่ว

2.2.4 นำผลิตภัณฑ์น้ำมะค้อสดที่ได้มาวัดความเข้มข้น (ปริมาณของแข็งที่ละลายได้) หาปริมาณองศาบริกซ์ด้วย Hand Brix Refractometer วัดค่าได้ 30 องศาบริกซ์

2.2.5 นำผลิตภัณฑ์น้ำมะค้อสดที่ได้ มาทำให้ร้อน (Pasteurization) ที่อุณหภูมิ 80-90 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที คนตลอดเวลาที่ทำให้ร้อน

2.2.6 ทำให้เย็นลงทันที บรรจุในภาชนะบรรจุที่ต้มในน้ำเดือดมาแล้ว

2.3 <u>การผลิตน้ำมะค้อเข้มข้น</u>

2.3.1 นำผลมะค้อมาล้างเปลือกให้สะอาด จากนั้นแกะเปลือกออกเอาเนื้อข้างในผลมะค้อใส่ผ้าขาวบาง บีบจนได้น้ำมะค้อ แยกเอาเมล็ดออก (ผลมะค้อ 10 กิโลกรัม นำมาคั้นจะได้น้ำมะค้อจำนวนประมาณ 2.8 - 3 ลิตร)

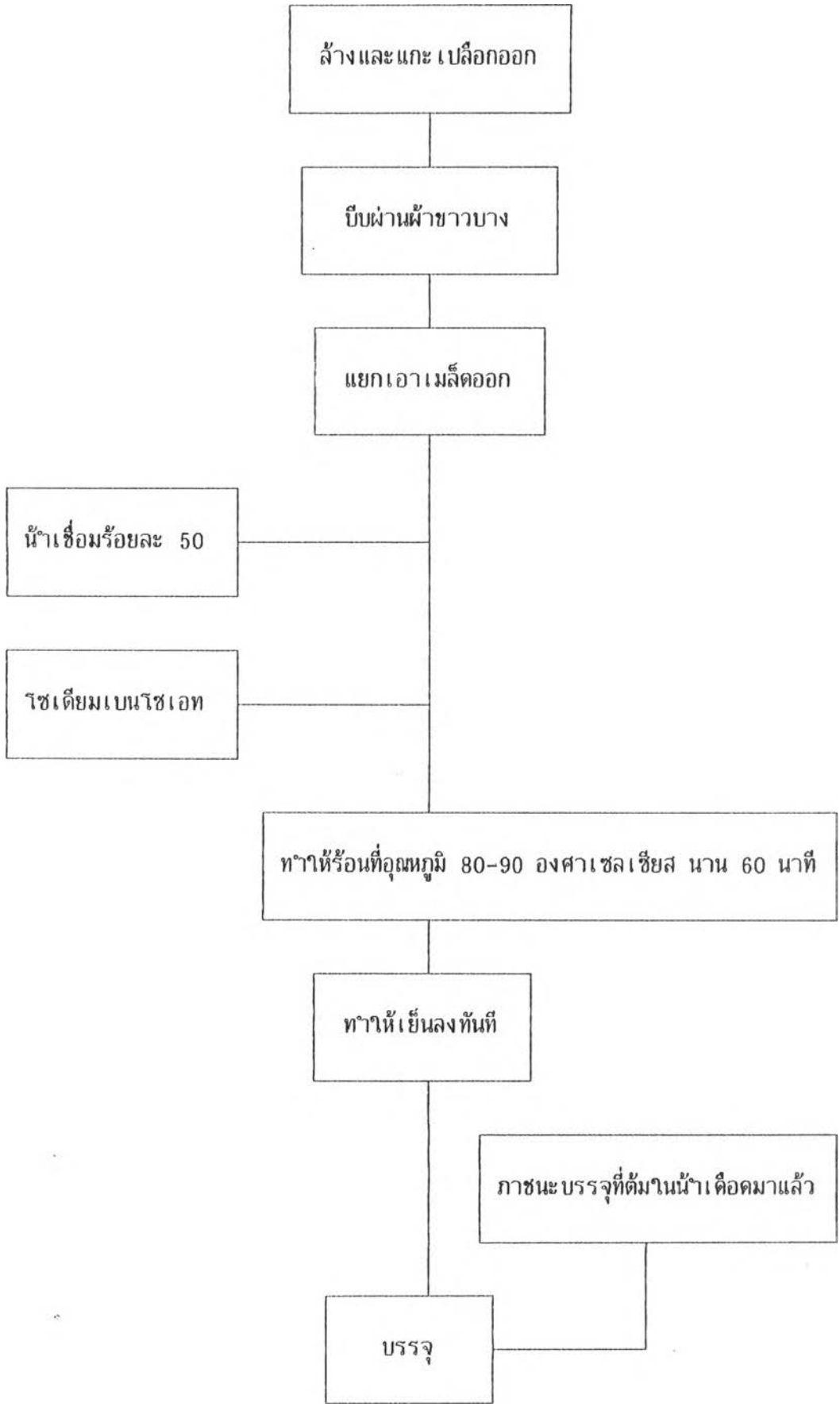
2.3.2 นำน้ำมะค้อที่ได้จากข้อ 2.3.1 มาต้มระเหยบนเครื่องอังไอน้ำ จนเหลือปริมาตรน้ำมะค้อประมาณ 1 ใน 3 ของน้ำมะค้อเริ่มต้น

2.3.3 เติมโซเดียมเบนโซเอท เป็นวัตถุกันเสีย ด้วยปริมาณ 0, 0.5 และ 1.0 (กรัม/มิลลิลิตร) ตามลำดับ การเติมทำโดยการนำโซเดียมเบนโซเอท ที่ชั่งน้ำหนักแน่นอนแล้วมาละลายด้วยน้ำเล็กน้อย เติมลงในผลิตภัณฑ์น้ำมะค้อเข้มข้นแล้วคนให้ทั่ว

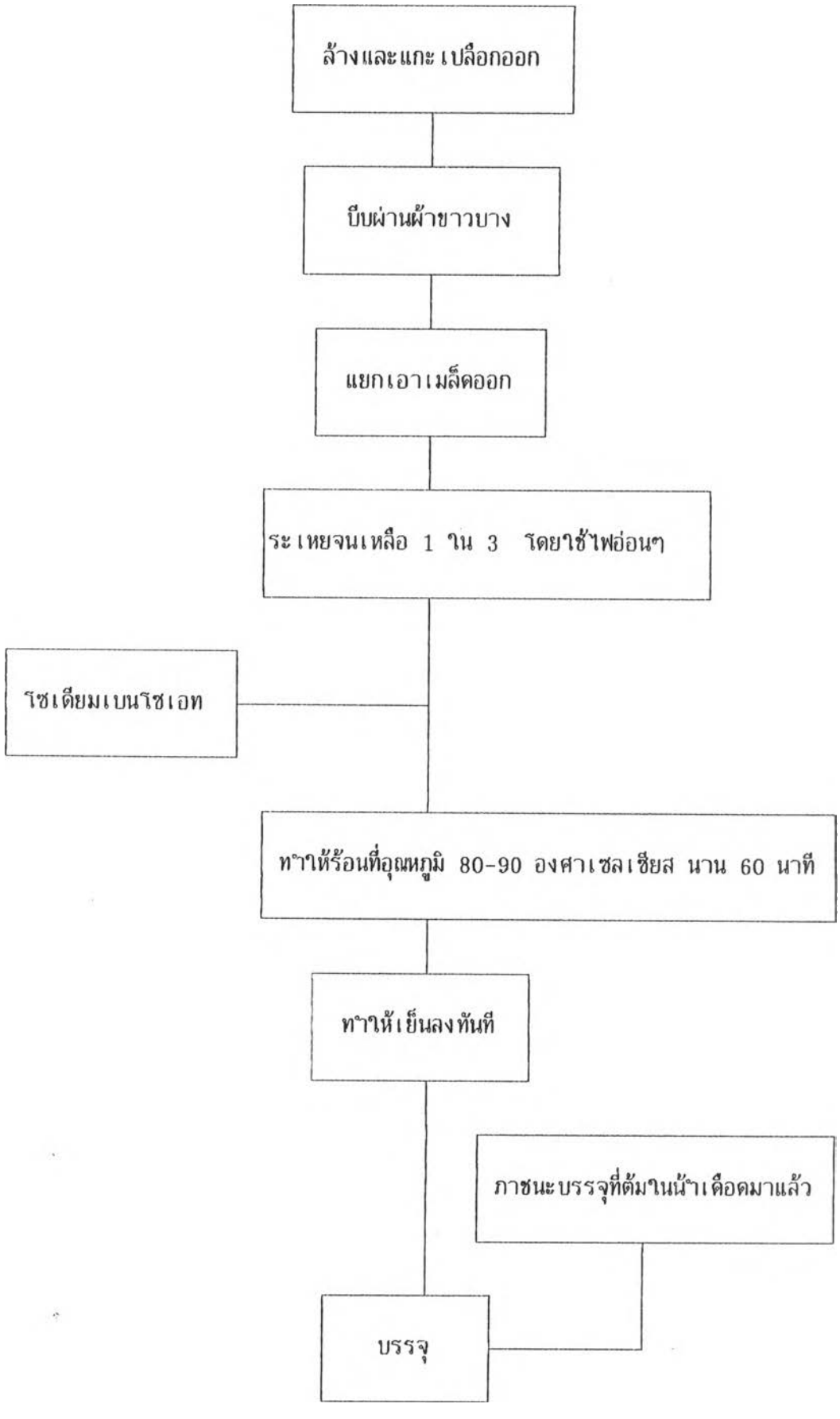
2.3.4 นำผลิตภัณฑ์น้ำมะค้อเข้มข้นที่ได้มาวัดความเข้มข้น (ปริมาณของแข็งที่ละลายได้) หาปริมาณองศาบริกซ์ด้วย Hand Brix Refractometer วัดค่าได้ 55 องศาบริกซ์

2.3.5 นำผลิตภัณฑ์น้ำมะค้อเข้มข้นที่ได้ มาทำให้ร้อน (Pasteurization) ที่อุณหภูมิ 80-90 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที คนตลอดเวลาที่ทำให้ร้อน

2.3.6 ทำให้เย็นลงทันที บรรจุในภาชนะบรรจุที่ต้มในน้ำเดือดมาแล้ว



รูปที่ 4 แผนผังการผลิตน้ำมะค้อสด



รูปที่ 5 แผนผังการผลิตน้ำมะค้อเข้มข้น

3. การศึกษาผลของการเก็บผลิตภัณฑ์น้ำมะค้อสดและเข้มข้นต่อปริมาณวิตามินซี

การศึกษาผลของการเก็บผลิตภัณฑ์น้ำมะค้อ โดยการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซีที่คงเหลือในผลิตภัณฑ์ สำหรับเป็นเครื่องบ่งชี้

3.1 การศึกษาผลของการเก็บผลิตภัณฑ์น้ำมะค้อสด

3.1.1 ทดลองเก็บผลิตภัณฑ์น้ำมะค้อสด ที่อุณหภูมิห้อง (30-40 องศาเซลเซียส) โดยบรรจุผลิตภัณฑ์น้ำมะค้อสดใน

ก) ขวดแก้วสีชา

ข) ขวดแก้วใสไม่มีสี

ค) ขวดพลาสติกชนิดโพลีเอทธิลีนสีขาวขุ่นชนิดแข็ง

วิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซี เมื่อระยะเวลาผ่านไป 0, 15, 30, 45, 60, 75 และ 90 วัน ตามลำดับ

3.1.2 ทดลองเก็บผลิตภัณฑ์น้ำมะค้อสด ที่เติมโซเดียมเบนโซเอท 1 กรัม ต่อน้ำมะค้อ 1 ลิตร ที่อุณหภูมิห้อง (30-40 องศาเซลเซียส) โดยบรรจุผลิตภัณฑ์น้ำมะค้อสดใน

ก) ขวดแก้วสีชา

ข) ขวดแก้วใสไม่มีสี

ค) ขวดพลาสติกชนิดโพลีเอทธิลีนสีขาวขุ่นชนิดแข็ง

วิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซี เมื่อระยะเวลาผ่านไป 0, 15, 30, 45, 60, 75 และ 90 วัน ตามลำดับ

3.1.3 ทดลองเก็บผลิตภัณฑ์น้ำมะค้อสด ที่เติมโซเดียมเบนโซเอท 0.5 กรัม ต่อน้ำมะค้อ 1 ลิตร ที่อุณหภูมิห้อง (30-40 องศาเซลเซียส) โดยบรรจุผลิตภัณฑ์น้ำมะค้อสดใน

ก) ขวดแก้วสีชา

ข) ขวดแก้วใสไม่มีสี

ค) ขวดพลาสติกชนิดโพลีเอทธิลีนสีขาวขุ่นชนิดแข็ง

วิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซี เมื่อระยะเวลาผ่านไป 0, 15, 30, 45, 60, 75 และ 90 วัน ตามลำดับ

3.1.4 ทดลองเก็บผลิตภัณฑ์น้ำมะค้อสด ที่อุณหภูมิตู้เย็น (2-8 องศาเซลเซียส) โดยบรรจุผลิตภัณฑ์น้ำมะค้อสดใน

ก) ขวดแก้วสีชา

ข) ขวดแก้วใสไม่มีสี

ค) ขวดพลาสติกชนิดโพลีเอทธิลีนสีขาวขุ่นชนิดแข็ง

วิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซี เมื่อระยะเวลาผ่านไป 0, 15, 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 วัน ตามลำดับ

3.1.5 ทดลองเก็บผลิตภัณฑ์น้ำมะค้อสด ที่เติมโซเดียมเบนโซเอท 1 กรัม ต่อน้ำมะค้อ 1 ลิตร ที่อุณหภูมิตู้เย็น (2-8 องศาเซลเซียส) โดยบรรจุผลิตภัณฑ์น้ำมะค้อสดใน

ก) ขวดแก้วสีชา

ข) ขวดแก้วใสไม่มีสี

ค) ขวดพลาสติกชนิดโพลีเอทธิลีนสีขาวขุ่นชนิดแข็ง

วิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซี เมื่อระยะเวลาผ่านไป 0, 15, 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 วัน ตามลำดับ

3.1.6 ทดลองเก็บผลิตภัณฑ์น้ำมะค้อสด ที่เติมโซเดียมเบนโซเอท 0.5 กรัม ต่อน้ำมะค้อ 1 ลิตร ที่อุณหภูมิตู้เย็น (2-8 องศาเซลเซียส) โดยบรรจุผลิตภัณฑ์น้ำมะค้อสดใน

ก) ขวดแก้วสีชา

ข) ขวดแก้วใสไม่มีสี

ค) ขวดพลาสติกชนิดโพลีเอทธิลีนสีขาวขุ่นชนิดแข็ง

วิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซี เมื่อระยะเวลาผ่านไป 0, 15, 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 วัน ตามลำดับ

1971284856

3.2 การศึกษาผลของการเก็บผลิตภัณฑ์น้ำมะค้อเข้มข้นต่อปริมาณวิตามินซี

3.2.1 ทดลองเก็บผลิตภัณฑ์น้ำมะค้อเข้มข้น ที่อุณหภูมิห้อง (30-40 องศาเซลเซียส) โดยบรรจุผลิตภัณฑ์น้ำมะค้อเข้มข้นใน

ก) ขวดแก้วสีชา

ข) ขวดแก้วใสไม่มีสี

ค) ขวดพลาสติกชนิดโพลีเอทธิลีนสีขาวขุ่นชนิดแข็ง

วิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซี เมื่อระยะเวลาผ่านไป 0, 15, 30, 45, 60, 75 และ 90 วัน ตามลำดับ

3.2.2 ทดลองเก็บผลิตภัณฑ์น้ำมะค้อเข้มข้น ที่เติมโซเดียมเบนโซเอท 1 กรัม ต่อน้ำมะค้อ 1 ลิตร ที่อุณหภูมิห้อง (30-40 องศาเซลเซียส) โดยบรรจุผลิตภัณฑ์น้ำมะค้อเข้มข้นใน

ก) ขวดแก้วสีชา

ข) ขวดแก้วใสไม่มีสี

ค) ขวดพลาสติกชนิดโพลีเอทธิลีนสีขาวขุ่นชนิดแข็ง

วิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซี เมื่อระยะเวลาผ่านไป 0, 15, 30, 45, 60, 75 และ 90 วัน ตามลำดับ

3.2.3 ทดลองเก็บผลิตภัณฑ์น้ำมะค้อเข้มข้น ที่เติมโซเดียมเบนโซเอท 0.5 กรัม ต่อน้ำมะค้อ 1 ลิตร ที่อุณหภูมิห้อง (30-40 องศาเซลเซียส) โดยบรรจุผลิตภัณฑ์น้ำมะค้อเข้มข้นใน

ก) ขวดแก้วสีชา

ข) ขวดแก้วใสไม่มีสี

ค) ขวดพลาสติกชนิดโพลีเอทธิลีนสีขาวขุ่นชนิดแข็ง

วิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซี เมื่อระยะเวลาผ่านไป 0, 15, 30, 45, 60, 75 และ 90 วัน ตามลำดับ

3.2.4 ทดลองเก็บผลิตภัณฑ์น้ำมะค้อเข้มข้น ที่อุณหภูมิตู้เย็น (2-8 องศาเซลเซียส) โดยบรรจุผลิตภัณฑ์น้ำมะค้อเข้มข้นใน

ก) ขวดแก้วสีชา

ข) ขวดแก้วใสไม่มีสี

ค) ขวดพลาสติกชนิดโพลีเอทธิลีนสีขาวขุ่นชนิดแข็ง

วิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซี เมื่อระยะเวลาผ่านไป 0, 15, 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 วัน ตามลำดับ

3.2.5 ทดลองเก็บผลิตภัณฑ์น้ำมะค้อเข้มข้น ที่เติมโซเดียมเบนโซเอท 1 กรัม ต่อน้ำมะค้อ 1 ลิตร ที่อุณหภูมิตู้เย็น (2-8 องศาเซลเซียส) โดยบรรจุผลิตภัณฑ์น้ำมะค้อเข้มข้นใน

ก) ขวดแก้วสีชา

ข) ขวดแก้วใสไม่มีสี

ค) ขวดพลาสติกชนิดโพลีเอทธิลีนสีขาวขุ่นชนิดแข็ง

วิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซี เมื่อระยะเวลาผ่านไป 0, 15, 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 วัน ตามลำดับ

3.2.6 ทดลองเก็บผลิตภัณฑ์น้ำมะค้อเข้มข้น ที่เติมโซเดียมเบนโซเอท 0.5 กรัม ต่อน้ำมะค้อ 1 ลิตร ที่อุณหภูมิตู้เย็น (2-8 องศาเซลเซียส)โดยบรรจุผลิตภัณฑ์น้ำมะค้อเข้มข้นใน

ก) ขวดแก้วสีชา

ข) ขวดแก้วใสไม่มีสี

ค) ขวดพลาสติกชนิดโพลีเอทธิลีนสีขาวขุ่นชนิดแข็ง

วิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซี เมื่อระยะเวลาผ่านไป 0, 15, 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 วัน ตามลำดับ