บทที่ 3

วัสดุและวิธีวิจัย

การดำเนินการวิจัยแบ่งออกเป็น 4 ส่วน คือ

1. การเตรียมผลิตภัณฑ์น้ำส้มเข้มข้น และน้ำส้มผง
2. การศึกษาคุณสมบัติและการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของอาหารในน้ำส้มสด น้ำส้มเข้มข้น และน้ำส้มผง
3. ทดสอบการยอมรับของผลิตภัณฑ์น้ำส้ม
4. การวิเคราะห์ทางสถิติ

1. การเตรียมผลิตภัณฑ์

1.1 การเตรียมน้ำส้มเข้มข้น (ดัดแปลงจาก ศิริวัลย์ พฤติวิลัย, 2530 ; Crandall, 1986) (รูปที่ 5)

วัตถุดิบ ส้มเขียวหวาน กลุ่มแมนดาริน (Citrus recticulata Blanco) พันธุ์เขียวหวาน เลือกตัวอย่างโดยวิธีการสุ่มตัวอย่างจากต้นซึ่งมีอายุประมาณ 5 ปี โดยสุ่มจากต้นภายในสวนเดียวกัน ทำการสุ่มผลส้มที่มีอายุเท่ากันจากส่วนต่าง ๆ ของต้นส้ม โดยเก็บจากต้นที่ทำการสุ่มต้นละ 6 ผล เมื่อผลส้มอายุ 37 สัปดาห์

เครื่องมือ

1) ที่คั้นน้ำผลไม้
2) ตะแกรงกรองน้ำผลไม้
3) Refractometer ขนาด 0-90 องศาบริกซ์ (ATAGO JAPAN)
4) เครื่องระเหยแบบหมุน (Rotary Evaporator) (BUCHI ROTAVAPOR - R)

สารเคมี

1) เอนไซม์เปคติเนส (pectinase) (VINA LIVERPOOL , ENGLAND) เอนไซม์ 1 ซีซี เท่ากับ 0.0107 ยูนิต (1 ยูนิต จะให้ 1.0 ไมโครโมลของกรดกาแล็กทูโรนิก)

2) เปคติน (pectin) (APPLE250 - GRADE , BDH CHEMICALS LTD.)

3) โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ (sodium metabisulfite) (AR) (MAUINGKRODT)

4) น้ำส้มสด

<u>การวางแผนงานวิจัย</u> (experimantal design)

ใช้การทดสอบแบบแฟคทอเรียล (The factorial experiment) ซึ่งเป็นการทดสอบผลของตัวแปรที่มากกว่าหนึ่งตัวขึ้นไปพร้อม ๆ กันในเวลาเดียวกัน และศึกษาผลของปฏิกิริยาระหว่างแฟคเตอร์ (interaction) ซึ่งจากการวิจัยเป็นการทดสอบผลของอายุที่เก็บส้ม , ระดับเอนไซม์เปคติเนส, เปคติน, โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ และระยะเวลาในการเก็บผลิตภัณฑ์

วิธีเตรียม

1) ล้างส้มที่เลือกเก็บมาให้สะอาดด้วยน้ำประปา

2) เก็บผลส้มที่อุณหภูมิ 12-15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน และ 5 วัน เมื่อดูผลของอายุในการเก็บต่อการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมี

3) ทำการคั้นน้ำส้มและกรอง โดยผ่าผลส้มเป็น 2 ซีก ทำการคั้นที่ละซีก กรองผ่านตะแกรง น้ำส้มที่ผ่านการกรองแล้วจะเก็บตัวอย่างไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี (ตามการดำเนินการวิจัยข้อ 2)

4) แบ่งน้ำส้มที่ผ่านการกรองออกเป็น 4 ส่วน แล้วนำมาผ่านกระบวนการดังนี้

4.1) ไม่เติมเอนไซม์เปคติเนส

4.2) เติมเอนไซม์เปคติเนส 1.5 มิลลิลิตร/ลิตร

4.3) เติมเอนไซม์เปคติเนส 3 มิลลิลิตร/ลิตร

4.4) เติมเอนไซม์เปคติเนส 4.5 มิลลิลิตร/ลิตร

เพื่อดูผลของเอนไซม์ระดับต่าง ๆ ต่อปริมาณวิตามินซี และองค์ประกอบทางเคมีของผลิตภัณฑ์น้ำส้มเข้มข้น

5) วางน้ำส้มที่เติมเอนไซม์แต่ละระดับในข้อ 4 ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้เอนไซม์ทำปฏิกิริยาแล้วนำไประเหยในเครื่องระเหยแบบหมุนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส จนได้ความเข้มข้นสูงกว่า 42 องศาบริกซ์

6) เติมน้ำส้มสดลงในน้ำส้มจากข้อ 5 ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 42 องศาบริกซ์

7) แบ่งน้ำส้มที่เตรียมได้จากข้อ 5 ออกเป็น 3 ส่วน

ส่วนที่ 1 ไม่เติมสารใด ๆ เพื่อเป็นตัวควบคุม

ส่วนที่ 2 เติมเปคตินร้อยละ 0.4 โดยน้ำหนัก เพื่อดูผลของเปคตินต่อความคงตัวของผลิตภัณฑ์ และการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมี นำไปวางในเครื่องอังน้ำ (water bath) อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที แล้วเติมโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนักขณะร้อน

ส่วนที่ 3 เติมโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนัก เพื่อดูผลของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ต่อปริมาณวิตามินซี และการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีนำไปวางในเครื่องอังน้ำ อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที โดยเติมขณะร้อน

8) บรรจุน้ำส้มเข้มข้นที่เตรียมได้จากข้อ 7 ในขวดสีชาที่ผ่านการต้มในน้ำเดือดเพื่อฆ่าเชื้อ แล้วทำให้เย็นที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 เดือน นำตัวอย่างมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีทุก 1 เดือน โดยทำการวิเคราะห์ตัวอย่างที่เก็บเดือนที่สามก่อน

1.2 **การเตรียมน้ำส้มผง** (ดัดแปลงจาก Agricultural Research, 1962) (รูปที่ 6)

วัตถุดิบ ส้มเขียวหวาน กลุ่มแมนดาริน (Citrus recticulata Blanco) พันธุ์เขียวหวาน

เครื่องมือ

1) ที่คั้นน้ำผลไม้

2) ตะแกรงกรองน้ำผลไม้

3) Refractometer ขนาด 0-90 องศาบริกซ์ (ATAGO JAPAN)

4) เครื่องระเหยแบบหมุน (BUCHI ROTAVAPOR - R)

5) เครื่องอบแห้งแบบพ่นกระจาย (Spray dryer) (BUCHI 190)

6) เตาไฟฟ้า (hot plate)

7) โถอบแห้ง (dessiccator)

สารเคมี

1) มอลโตเด็กซ์ตริน (maltodextrin) (MODIFIED STARCH , FIELDOSE PHS 17 GOODMAN FIELDER LTD, AUSTRALIA)

2) แป้ง (soluble starch) (GPR BDH CHEMICAL LTD,)

3) เจลาติน (gelatin) (MERCK)

วิธีเตรียม

1) น้ำส้มที่ผ่านการกรองแล้วระเหยในเครื่องระเหยแบบหมุน ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส จนกระทั่งความเข้มข้นประมาณ 50 องศาบริกซ์

2) แบ่งน้ำส้มเข้มข้นจากข้อ 1 มาเติมสารช่วยทำให้แห้ง (drying aid) ปริมาณต่าง ๆ ดังนี้

   2.1) มอลโตเด็กซ์ตริน ร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก

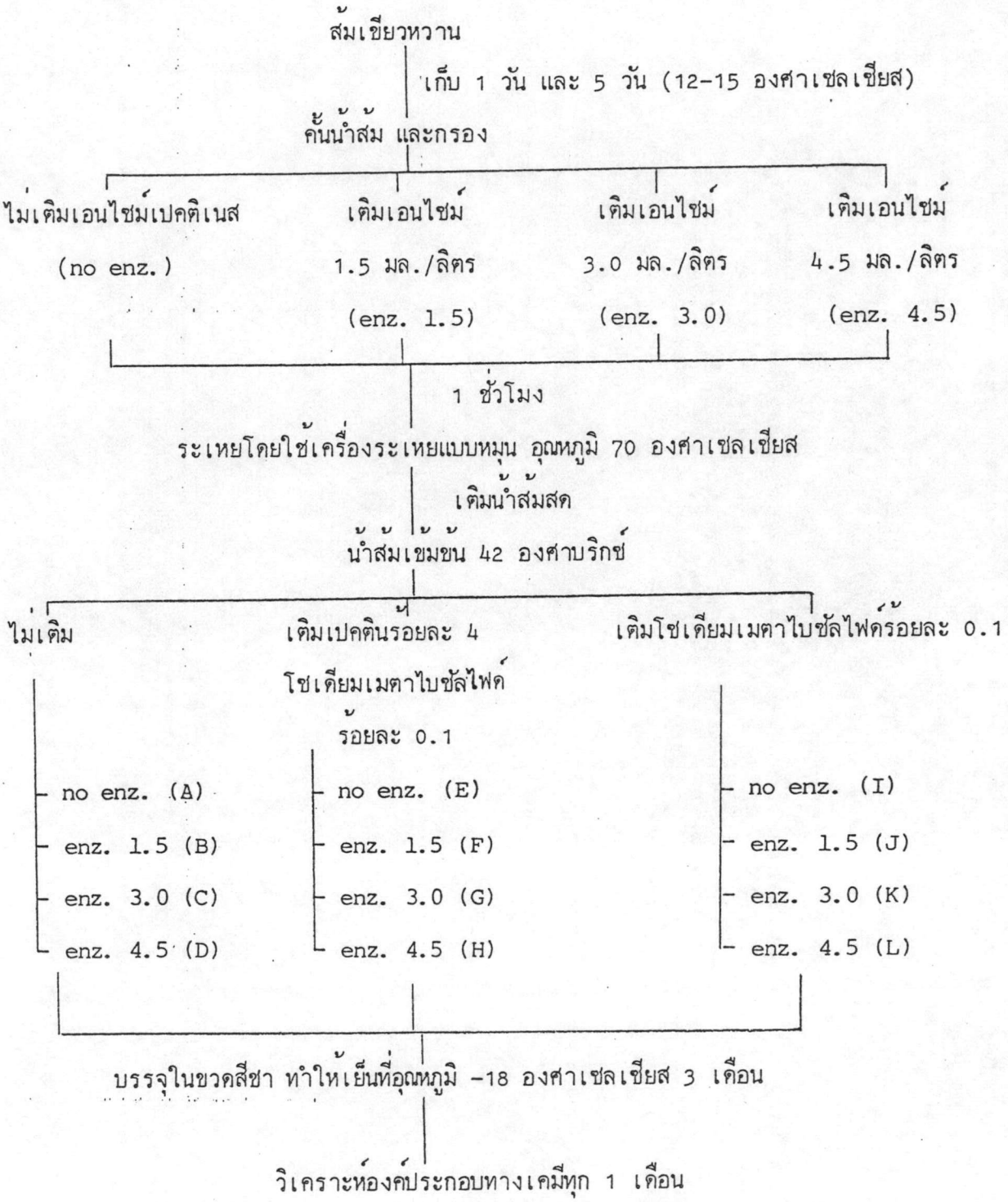
   2.2) มอลโตเด็กซ์ตริน ร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก และแป้งร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก

   2.3) มอลโตเด็กซ์ตริน ร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก และเจลาตินร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก

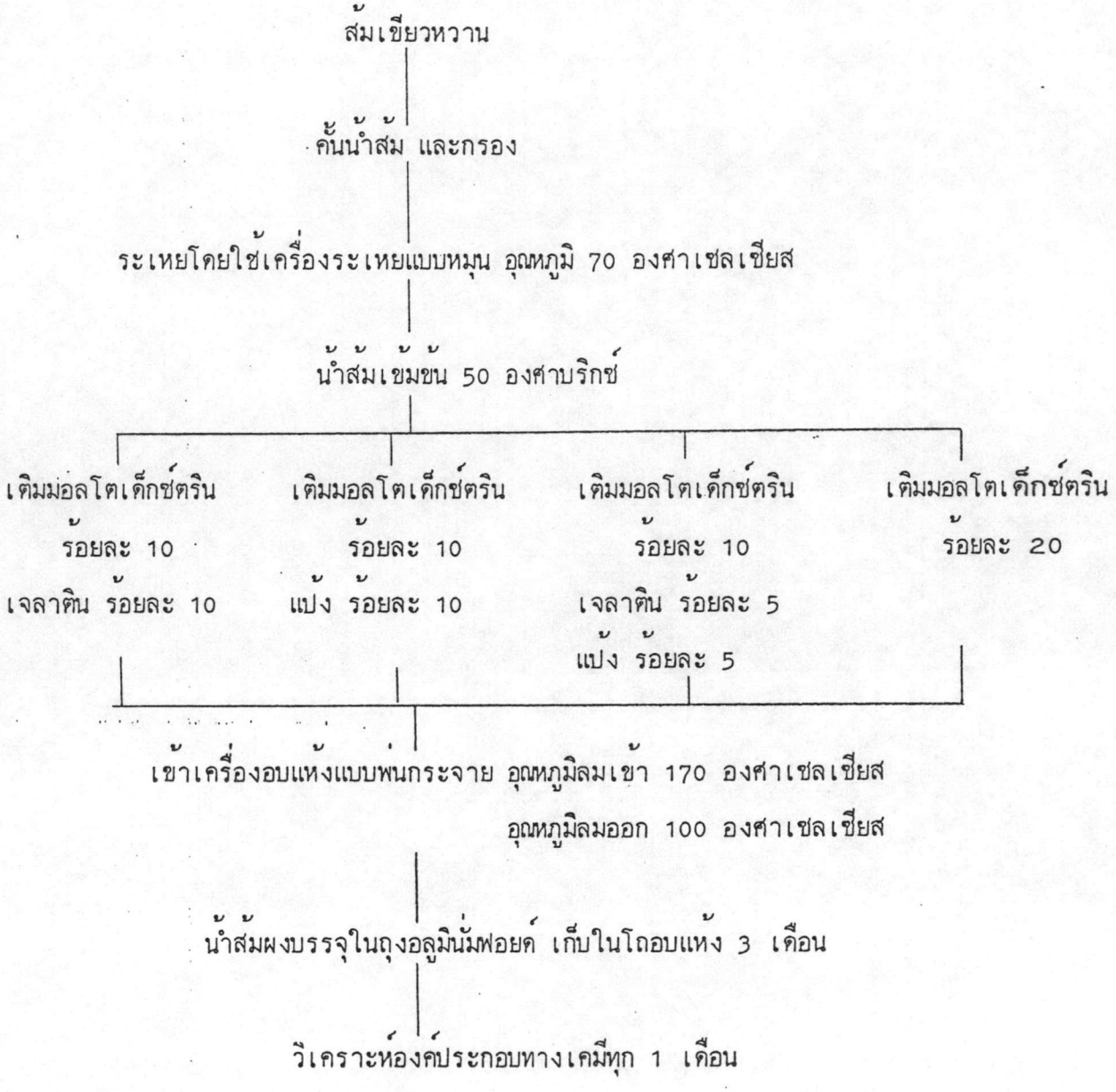
2.4) มอลโตเด็กซ์ตริน ร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก แป้งร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก และเจลาตินร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก การเลือกใช้มอลโตเด็กซ์ตริน แป้ง และเจลาติน เนื่องจากให้ผลิตภัณฑ์ที่มีผลได้สูง และการละลายน้ำดี

3) นำน้ำส้มจากข้อ 2 ทำให้แห้งด้วยเครื่องอบแห้งแบบพ่นกระจาย โดยใช้อุณหภูมิลมเข้า 170 องศาเซลเซียส อุณหภูมิลมออก 100 องศาเซลเซียส และปรับความดันเป็น 600 NI/h

4) น้ำส้มผงที่ได้บรรจุในถุงอลูมินั่มฟอยด์ปิดสนิท เก็บในโถอบแห้งเป็นเวลา 3 เดือน นำตัวอย่างมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีทุก 1 เดือนโดยทำการวิเคราะห์ตัวอย่างที่เก็บเดือนที่สามก่อน



รูปที่ 5 แผนภูมิแสดงการเตรียมน้ำส้มเข้มข้น



รูปที่ 6 แผนภูมิแสดงการเตรียมน้ำส้มผง

2. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำส้มสด น้ำส้มเข้มข้น และน้ำส้มผง

2.1 การวิเคราะห์หาปริมาณกรดโดยการไตเตรต (Ruck, 1963)

เครื่องมือ

1) กระดาษกรองเบอร์ 4 (WHATMAN No.4)

2) บิวเรตต์ขนาด 50 มิลลิลิตร

สารเคมี

1) โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์แมล

2) สารละลายฟีนอล์ทาลิน (phenolphthalein)

วิธีวิเคราะห์

1) กรองน้ำส้มด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4

2) ชั่งน้ำส้ม 10 กรัม (9.5 มิลลิลิตร) ใส่ในขวดรูปชมพู่ (flask) ขนาด 125 มิลลิลิตร เติมน้ำ 50 มิลลิลิตร หยดฟินอล์ทาลีน 3 หยด เพื่อเป็นอินดิเคเตอร์ (indicator) นำไปไตเตรตด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์แมล ทำซ้ำ 2 ครั้ง

3) น้ำส้มเข้มข้น ชั่งน้ำส้มเข้มข้นจำนวน 3 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร เติมน้ำ 50 มิลลิลิตร นำไปไตเตรตด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์แมล ทำซ้ำ 2 ครั้ง

4) น้ำส้มผง ชั่งน้ำส้มผงจำนวน 1 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร เติมน้ำ 50 มิลลิลิตร คนให้ละลาย นำไปไตเตรตด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์แมล ทำซ้ำ 2 ครั้ง

การคำนวณ

ปริมาณกรด (ร้อยละ) =

$$\frac{1/10 \times \text{equivalent weight of acid} \times \text{normality of NaOH} \times \text{titer})}{\text{weight of sample}}$$

equivalent weight of citric acid (monohydrate) = 70.0 กรัม

2.2 **การวัดพีเอช** (Ruck, 1963)

เครื่องมือ

1) เครื่องวัดพีเอช (pH meter) (RHM 64 RADIOMETER COPENHAGEN)

2) บีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร

วิธีวิเคราะห์

1) ปรับเครื่องวัดพีเอช ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 และ 4.0 ตามลำดับ

2) น้ำส้มสด รินน้ำส้มสดจำนวน 25 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร วัดพีเอชด้วยเครื่อง ทำซ้ำ 2 ครั้ง

3) น้ำส้มเข้มข้น รินน้ำส้มเข้มข้นจำนวน 25 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร วัดพีเอชด้วยเครื่อง ทำซ้ำ 2 ครั้ง

4) น้ำส้มผง ชั่งน้ำส้มผงจำนวน 1 กรัม เติมน้ำ 50 มิลลิลิตร คนให้ละลาย

5) แบ่งน้ำส้มจากข้อ 4) จำนวน 25 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร วัดพีเอชด้วยเครื่อง ทำซ้ำ 2 ครั้ง

2.3 **การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลโดยวิธีของ Lane และ Eynon (Ruck, 1963)**

เครื่องมือ

1) บิวเรตต์ขนาด 50 มิลลิลิตร

2) ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร

3) เตาไฟฟ้า (hot plate)

4) กระดาษกรองเบอร์ 41 H (WHATMAN No.41 H)

สารเคมี

1) คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4 . 5H_2O$)

การเตรียมสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต (Fehling`s solution A)

ชั่ง $CuSO_2 . 5H_2O$ 69.28 กรัม นำมาละลายน้ำแล้วเจือจางให้มีปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

2) โพแทสเซียมโซเดียมตาเตรต ($KNaC_4H_4O_6 . 4H_2O$) (AR BDH CHEMICAL LTD.)

การเตรียมสารละลายตาเตรต (Fehling`s solution B)

ชั่งโพแทสเซียมโซเดียมตาเตรต จำนวน 346 กรัม และโซเดียม-ไฮดรอกไซด์ 100 กรัม นำมาละลายน้ำ แล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

3) เมทิลีนบลู (methylene blue) (MERCK)

การเตรียมสารอินดิเคเตอร์ เมทิลีนบลู

ชั่งเมทิลีน บลู 1 กรัม ละลายในน้ำ 100 มิลลิลิตร

4) นิวทัล เลดอะซีเตต [$Pb(C_2H_3O_2)_2 . 3H_2O$] (AR BDH CHEMICAL LTD.)

การเตรียมสารละลายเลดอะซีเตตร้อยละ 45

ชั่งนิวทัล เลดอะซีเตต 225 กรัมละลายน้ำ แล้วปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร

5) โพแทสเซียมออกซาเลต ($K_2C_2O_4 . H_2O$) (MAY & BAKER)

การเตรียมสารละลายโพแทสเซียมออกซาเลตร้อยละ 22

ละลายโพแทสเซียมออกซาเลต 110 กรัมในน้ำ เจือจางให้มีปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร แล้วกำหนดปริมาณของสารละลายโพแทสเซียมออกซาเลต เพื่อตกตะกอน Pb^{++} จากสารละลายเลดอะซีเตต โดยปิเปตต์สารละลายเลดอะซิเตต 2 มิลลิลิตร ลงในบิกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตรจำนวน 6 ใบ เติมน้ำ 25 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายโพแทสเซียมออกซาเลต ปริมาณแตกต่างกันตามลำดับต่อไปนี้ 1.6,1.7,1.8,1.9,2.0 และ 2.1 มิลลิลิตร ตามลำดับ กรองสารละลายแต่ละบิกเกอร์ด้วยกระดาษกรองเบอร์ 41 H ปริมาณของสารละลายโพแทสเซียมออกซาเลตที่นำไปใช้สำหรับการกำหนดปริมาณน้ำตาล (sugar determination) คือปริมาณน้อยที่สุดซึ่งเมื่อเติมสารละลายเลดอะซีเตต 2 มิลลิลิตร แล้วไม่เกิดการ

ตกตะกอน (จากการวิเคราะห์ครั้งนี้คือสารละลายโพแทสเซียมออกซาเลต 2.1 มิลลิลิตร)

6) น้ำตาลซูโครสมาตรฐาน (sucrose standard) (AR MERCK)

การเตรียมสารละลายมาตรฐานของน้ำตาลที่เกิดการผกผัน (standard invert sugar solution)

ชั่งน้ำตาลซูโครส 9.5 กรัม ใส่ในขวดปรับปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 1 ลิตร เติมน้ำ 100 มิลลิลิตร และเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ตั้งไว้ 3 วัน ที่อุณหภูมิ 20-25 องศาเซลเซียสเพื่อให้เกิดการผกผันของน้ำตาล (inversion) แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำเป็น 1 ลิตร

ปิเปตต์สารละลายมาตรฐานของน้ำตาลที่เกิดการผกผัน 25 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำ 50 มิลลิลิตร เติมสารละลายฟีนอล์ฟทาลีน 2-3 หยด เพื่อเป็นอินดิเคเตอร์แล้วทำให้เป็นกลางโดยเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 20 จนสารละลายมีสีชมพู เติมกรดไฮโดรคลอริก 1 นอร์แมลทีละหยดจนสีชมพูหายไป ปรับปริมาตรด้วยน้ำเป็น 100 มิลลิลิตร

**การจัดมาตรฐานของสารละลาย Fehling`s** (Standandization of the Fehling`s solution)

ทำการผสมสารละลาย Fehling`s A และ B ในปริมาตรที่เท่ากัน แล้วปิเปตต์สารละลาย Fehling`s 10 มิลลิลิตร ที่ผสมกันแล้วลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร 2 ใบ เติมสารละลายน้ำตาลที่เกิดการผกผันจากบิวเรตต์ลงไปประมาณ 15 มิลลิลิตร นำไปต้มให้เดือดประมาณ 2 นาที แล้วไตเตรตต่อจนสีน้ำเงินจางเกือบหมดไปจึงเติมสารละลายเมทิลีนบลู 2 หยด ทำการไตเตรตขณะกำลังเดือดจนกระทั่งสีของสารละลายเมทิลีนบลู หายไป เวลาที่ใช้ในการไตเตรตช่วงนี้ควรน้อยกว่า 1 นาที

วิธีวิเคราะห์

1) **น้ำส้มสด**

ชั่งตัวอย่างที่ผ่านการกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 จำนวน 15 กรัม

น้ำส้มเข้มข้น

ชั่งตัวอย่างจำนวน 5 กรัม เติมน้ำ 100 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 ทำการปิเปตต์สารที่ผ่านการกรองจำนวน 25 มิลลิลิตร

น้ำส้มผง

ชั่งตัวอย่างจำนวน 1 กรัม เติมน้ำ 50 มิลลิลิตร คนให้ละลาย กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 ทำการปิเปตต์สารที่ผ่านการกรองจำนวน 25 มิลลิลิตร

2) นำตัวอย่างจากข้อ 1) เติมน้ำ 50 มิลลิลิตร ทำให้เป็นกลาง (พีเอช 7.5 -8) ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์แมล นำไปใส่ขวดปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติมสารละลายเลดอะซิเตต 2 มิลลิลิตร ตั้งไว้ 10 นาที เติมสารละลายโพแทสเซียมออกซาเลต 2.1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำเป็น 100 มิลลิลิตร กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 5

3) ปิเปตต์สารที่เตรียมจากข้อ 2 จำนวน 50 มิลลิลิตร เติมกรดซิตริก 5 กรัม ตั้งไว้ 1 คืน แล้วเติมน้ำ 50 มิลลิลิตร ต้มพอเดือดประมาณ 10 นาที เพื่อให้เกิดการผกผันของน้ำตาลซูโครส ทำให้เย็น นำมาทำให้เป็นกลาง (พีเอช 7.5-8) ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์แมล ปรับปริมาตรด้วยน้ำ เป็น 250 มิลลิลิตร แล้วทำการไตเตรตตามวิธีการจัดมาตรฐานของสารละลาย Fehling`s โดยเปลี่ยนจากสารละลายน้ำตาลที่เกิดการผกผัน เป็นสารตัวอย่างของน้ำส้มสด น้ำส้มเข้มข้น และน้ำส้มผง ที่เตรียมขึ้นแล้ว โดยการวิเคราะห์ซ้ำ 2 ครั้ง

การคำนวณ ปริมาณน้ำตาล (ร้อยละ) = $\frac{0.0509 \times 100 \times \text{dilution factor}}{\text{ปริมาณสารละลายน้ำตาลที่ใช้ในการไตเตรต}}$

2.4 **การวิเคราะห์หาปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้** (Ruck, 1963)

1) ชั่งน้ำส้มผงจำนวน 1 กรัม ละลายในน้ำ 50 มิลลิลิตร

2) วัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ โดยใช้ refractometer ขนาด 0-90 องศาบริกซ์ (ATAGO JAPAN) ทำการวิเคราะห์ซ้ำ 2 ครั้ง

2.5 **การวิเคราะห์วิตามินซี** (ดัดแปลงจาก วาสนา จตุรนต์รัศมี, 2525)

เครื่องมือ

1) Ultraviolet Spectrophotometer (PYE UNICAM SP 1000)

2) เครื่องอังน้ำ (water bath) (HOTCH INSTRUMENTS MODEL 905)

3) กระดาษกรองเบอร์ 1 (whatman No.1)

4) Buchner funnel

สารเคมี

1) กรดแอสคอร์บิคมาตรฐาน (standard ascorbic acid) (AR) (ROCHE SWITZERLAND)

2) ไธโอยูเรีย (thiourea)

3) ถ่านกัมมันต์ (activated charcoal) (MERCK)

4) กรดเมตาฟอสฟอริก (GPR) (BDH CHEMICAL LTD.)

5) 2,4 - ไดไนโตรฟินิลไฮดราซีน (2,4 - dinitrophenyl-hydrazine) (MERCK)

6) กรดซัลฟุริก 9 นอร์แมล และกรดซัลฟุริก ร้อยละ 85

หลักการ

ทำการสกัดวิตามินซีด้วยสารละลายเมตาฟอสฟอริก ร้อยละ 10 แล้วทำปฏิกิริยากับสารละลาย 2,4 ไดไนโตรฟินิลไฮดราซีน ร้อยละ 2 ได้สารประกอบโอซาโซน ซึ่งนำไปวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV spectrophotometer ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

วิธีวิเคราะห์

การเตรียมกราฟมาตรฐานของกรดแอสคอร์บิคมาตรฐาน

1) ชั่งกรดแอสคอร์บิคให้ได้น้ำหนักแน่นอน 100.0 มิลลิกรัม

2) นำมาละลายในกรดเมตาฟอสฟอริกร้อยละ 5 ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

3) นำสารละลายจากข้อ 2) 50 มิลลิลิตร เติมถ่านกัมมันต์ 1 กรัม ผสมและกรองโดยใช้ Buchner funnel

4) ปิเปตต์ส่วนที่กรองได้ 10.0 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร เติมไธโอยูเรีย 5 กรัม ผสมและเจือจางด้วยสารละลายกรดเมตาฟอสฟอริกร้อยละ 5 ให้ปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตร

5) ปิเปตต์สารจากข้อ 4) 2.0,5.0,10.0,15.0,30.0,50.0 และ 75.0 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตร ขนาด 100 มิลลิลิตร เจือจางด้วยสารละลายไธโอยูเรียร้อยละ 1 ให้เป็น 100 มิลลิลิตร

6) ปิเปตต์สารจากข้อ 5) ใส่ในหลอดทดลองความเข้มข้นละ 3 หลอด หลอดละ 4.0 มิลลิลิตร เติมสารละลาย 2,4 - ไดไนโตรฟินิล-ไฮดราซีนร้อยละ 2 1.0 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง 2 หลอด โดยหลอดที่เหลือเป็นสารละลายที่ไม่มีสารสำคัญ (blank) นำไปแช่ในเครื่องอังน้ำ อุณหภูมิ 37 ± 0.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

7) เมื่อครบเวลา นำหลอดทดลองทั้งหมดเติมกรดซัลฟุริกร้อยละ 85 5.0 มิลลิลิตร แช่ในอ่างน้ำแข็ง 15 นาที เติมสารละลาย 2,4-ไดไนโตรฟินิลไฮดราซิน ร้อยละ 2 1.0 มิลลิลิตร ในหลอดที่เป็นสารละลายที่ไม่มีสารสำคัญ (blank)

8) นำหลอดทดลองทั้งหมดตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที วัดการดูดกลืนแสงโดยเครื่อง UV Spectrophotometer ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

9) นำค่าที่ได้เขียนกราฟมาตรฐาน (รูปที่ 7)

การเตรียมตัวอย่าง

1) ชั่งน้ำส้มสด 15.000 กรัม (น้ำส้มเข้มข้น 3.000 กรัม น้ำส้มผง 1.000 กรัม) เติมสารละลายกรดเมตาฟอสฟอริกร้อยละ 10 20 มิลลิลิตร เจือจางด้วยกรดเมตาฟอสฟอริก ร้อยละ 5 ให้ปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

2) นำสารข้อ 1) 50 มิลลิลิตร เติมถ่านกัมมันต์ 1 กรัม ผสมและกรอง โดยใช้ buchner funnel

3) ปิเปตต์สารละลายที่ผ่านการกรองจากข้อ 2) 10.0 มิลลิลิตร เติมสารละลายไธโอยูเรีย ร้อยละ 2 5 มิลลิลิตร เจือจางด้วยสารละลายกรดเมตาฟอสฟอริก ร้อยละ 5 ให้ปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

4) ปิเปตต์สารจากข้อ 3) ใส่ในหลอดทดลอง 3 หลอด ๆ ละ 4.0 มิลลิลิตร เติมสารละลาย 2,4-ไดไนโตรฟินิลไฮดราซีน ร้อยละ 2 1.0 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง 2 หลอด หลอดที่เป็น blank นำไปแช่ในเครื่องอังน้ำอุณหภูมิ 37 ± 0.5 องศาเซลเซียส 3 ชั่วโมง

5) เมื่อครบเวลา นำหลอดทั้งหมดเติมกรดซัลฟุริก ร้อยละ 85 5.0 มิลลิลิตร แช่ในอ่างน้ำแข็ง 15 นาที เติมสารละลาย 2,4-ไดไนโตรฟินิลไฮดราซีน ร้อยละ 2 1.0 มิลลิลิตร ในหลอดที่เป็น blank

6) นำหลอดทั้งหมดตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที วัดการดูดกลืนแสงโดยเครื่อง UV Spectrophotometer) ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

7) นำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน โดยการวิเคราะห์ทำซ้ำ 2 ครั้ง

การคำนวณ ปริมาณวิตามินซี (มิลลิกรัม/100 กรัม) = $\frac{\text{ค่าจากกราฟมาตรฐาน} \times 50 \times 100 \times 100}{10 \times 1000 \times \text{น้ำหนักของตัวอย่าง}}$

2.6 **การวิเคราะห์สารสีน้ำตาลจากปฏิกิริยาที่ไม่ใช้เอนไซม์** (Meydav, 1977)

เครื่องมือ

1) เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง (centrifuge) (CLEMENTS GS 100) ขนาดหัวเหวี่ยง 17 นิ้ว
2) UV Spectrophotometer (PYE UNICAM SP 1000)

สารเคมี

แอลกอฮอล์ ร้อยละ 95

หลักการ

ทำการตกตะกอนสารแขวนลอยที่ให้ความขุ่นในน้ำผลไม้ โดยการหมุนเหวี่ยงในเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง แล้วทำการสกัดสารละลายใสชั้นบน (supernatant) ด้วยแอลกอฮอล์เพื่อละลายสารสีน้ำตาล และลดปริมาณสารคาโรทีนอยด์ ทำการวัดการดูดกลืนแสงโดยใช้ UV spectrophotometer ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร ซึ่งความยาวคลื่นนี้เป็นดัชนีของสารสีน้ำตาล (browning index) ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่ง่าย และค่าที่ได้มีความถูกต้องสูง (Meydav, 1977)

วิธีวิเคราะห์

1) นำน้ำส้มสด 10 มิลลิลิตร (น้ำส้มเข้มข้นต้องเจือจางน้ำก่อนในอัตราส่วน 1 : 3) เข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง โดยใช้หลอดหมุนเหวี่ยงขนาด 10 มิลลิลิตร โดยใช้ความเร็ว 1000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที
2) นำสารละลายใสชั้นบน (supernatant) 3.0 มิลลิลิตร เติมแอลกอฮอล์ ร้อยละ 95 3 มิลลิลิตร แช่ในน้ำแข็ง 15 นาที
3) นำสารจากข้อ 2) เข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงอีกครั้ง โดยใช้ความเร็ว 1000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที

4) นำสารละลายใสชั้นบน วัดการดูดกลืนแสงโดยใช้ UV Spectrophotometer ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร โดยทำซ้ำ 2 ครั้ง

2.7 **การวิเคราะห์สารแขวนลอยที่ให้ความขุ่น cloud retention** (USDA, 1955)

เครื่องมือ

1) เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง (CLEMENTS GS 100) ขนาดหัวเหวี่ยง 17 นิ้ว

2) UV Spectrophotometer (PYE UNICAM SP 1000)

หลักการ

ทำการตกตะกอนสารแขวนลอยที่ให้ความขุ่นในน้ำผลไม้ โดยการหมุนเหวี่ยงในเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง นำสารละลายใสส่วนบนวัดการส่งผ่านของแสงโดยเครื่อง UV Spectrophotometer ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร ถ้าน้ำผลไม้มีความคงตัว สารแขวนลอยที่ให้ความขุ่นยังคงตัวอยู่ในสารละลายใสส่วนบน ทำให้การส่งผ่านของแสงลดลง (USDA, 1955)

วิธีวิเคราะห์

1) นำน้ำส้มสด 10 มิลลิลิตร (น้ำส้มเข้มข้นต้องเจือจางน้ำก่อนในอัตราส่วนน้ำส้มเข้มข้นต่อน้ำเท่ากับ 1:3) เข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง โดยใช้ความเร็ว 60 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที โดยใช้หลอดหมุนเหวี่ยงขนาด 10 มิลลิลิตร

2) นำสารละลายใส่ส่วนบน วัดค่าการส่งผ่านของแสง (transmission) โดยเครื่อง UV Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร โดยทำซ้ำ 2 ครั้ง

3. <u>ทดสอบการยอมรับของผลิตภัณฑ์น้ำส้ม</u> (Amerine, 1965)

ใช้วิธี Hedonic Scaling (Amerine, 1965) ในการทดสอบการยอมรับทางประสาทสัมผัส เรื่องสี กลิ่น รสชม และความชอบรวมของผลิตภัณฑ์น้ำส้ม โดยใช้อาสาสมัคร 10 คน กำหนดให้ระดับคุณภาพและความชอบรวมเท่ากับ 7 ซึ่งการทดสอบได้อธิบายให้อาสาสมัคร ทราบ

ถึงวิธีการให้คะแนนตามความชอบ โดยในการชิมอาสาสมัครไม่ทราบว่าตัวอย่างที่ทำการชิมเป็นอะไร สำหรับน้ำส้มเข้มข้นที่ชิมต้องเจือจางก่อนในอัตราส่วนน้ำส้มเข้มข้นต่อน้ำเท่ากับ 1 ต่อ 3 และน้ำส้มผงที่ชิม ต้องละลายน้ำก่อนในอัตราส่วนน้ำส้มผงต่อน้ำเท่ากับ 1 ต่อ 3 การชิมตัวอย่างต้องล้างปากทุกครั้งก่อนชิมตัวอย่างต่อไป ซึ่งการชิมตัวอย่างทุกตัวอย่างใช้อาสาสมัครกลุ่มเดิม อาสาสมัครสามารถให้คะแนนโดยอิสระ นำคะแนนที่ได้ประเมินผลโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance, Anova) (วัชราภรณ์ สุริยาภิวัฒน์, 2529)

4. <u>การวิเคราะห์ทางสถิติ</u>

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติจากผลการวิจัย โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance, Anova) (วัชราภรณ์ สุริยาภิวัฒน์, 2529) ขององค์ประกอบทางเคมีในน้ำส้มเข้มข้น เมื่อพิจารณาจึงระยะเวลาในการเก็บ ระดับของเอนไซม์ และเวลาที่เก็บส้มไว้ รวมถึงผลของสูตรต่าง ๆ ของน้ำส้มผงต่อองค์ประกอบทางเคมี เมื่อเก็บผลิตภัณฑ์ในระยะเวลา 1,2 และ 3 เดือน