

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1. วัตถุดิบ และส่วนผสม

- 1.1 น้ำส้มเข้มข้น (67 องศาบริกซ์)
- 1.2 น้ำเชื่อมฟรักโทส
- 1.3 น้ำเชื่อมซูโครส
- 1.4 สารขุ่น
- 1.5 โซเดียมเบนโซเอต
- 1.6 กรดแอสคอร์บิก
- 1.7 สีผสมอาหาร (sunset yellow)
- 1.8 กลิ่นส้ม

2. สารเคมี

- 2.1 สารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก
- 2.2 สารมาตรฐานกรดเบนโซอิก
- 2.3 สารมาตรฐานเบนซีน
- 2.4 เมทานอล
- 2.5 เอทานอล
- 2.6 น้ำใช้กับเครื่อง HPLC

3. เครื่องมือ และ อุปกรณ์

- 3.1 เครื่อง High Performance Liquid Chromatography - UV visible detector
- 3.2 เครื่อง High Performance Liquid Chromatography - Photo diode array detector
- 3.3 เครื่อง gas chromatography – flame ionization detector (GC - FID)
- 3.4 เครื่อง gas chromatography – mass spectrometry detector
- 3.5 pH Meter
- 3.6 Hand Refractometer
- 3.7 Glass vial
- 3.8 Volumetric Flask
- 3.9 Pipette
- 3.10 Solid Phase Micro-extraction (SPME)
- 3.11 Solid Phase Extraction (SPE - C18 SepPak Column)

4. Software สำหรับการประเมินผล



4.1 Microsoft® Office Excel 2003

4.2 Minitab® V.14

4.3 Unscrambler® V.9.7

วิธีดำเนินการ

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ	
ห้องสมุดงานวิจัย	
วันที่.....	17 11 2555
เลขทะเบียน.....	248640
เลขเรียกหนังสือ.....	

1 ผลิตน้ำส้ม 25 % พาสเจอร์ไรส์สูตรพื้นฐานที่ผลิตในโรงงานเพื่อจำหน่ายเป็นการค้า (ตารางที่ 3) โดยมีขั้นตอนการผลิตดังภาพที่ 5 แปรปริมาณโซเดียมเบนโซเอต และกรดแอสคอร์บิกในสูตร (ตารางที่ 4) นำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณเบนซีนด้วยเครื่อง GC-FID ปริมาณกรดเบนโซอิก และกรดแอสคอร์บิกด้วยเครื่อง HPLC ปริมาณโลหะหนัก (ทองแดง เหล็ก) ด้วยเครื่อง Atomic Absorption Spectrometry (AA) ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (degree brix) ค่าพีเอช และเปอร์เซ็นต์กรด ประเมินผลการวิเคราะห์ เลือกสูตรที่พบการเกิดสารเบนซีนสูงสุดเพื่อนำมาศึกษาต่อในข้อ 2 วิธีการวิเคราะห์มีดังนี้คือ

1.1 การวิเคราะห์ปริมาณเบนซีน ใช้ headspace gas chromatographic technique (Agilent Technologies, 6890N) โดยใช้ mass spectrometry detector (Agilent Technologies, 5973) (HS-GC/MS) แบบ complete scanning method (SCAN MODE, 20 to 100 m/z) อุณหภูมิ Headspace oven อยู่ที่ 80°C อุณหภูมิที่ valve และ transfer line คือ 100°C เวลาในการ Equilibrate ตัวอย่างเท่ากับ 30 นาที และใช้เวลาในการ inject ตัวอย่าง 1 นาที คอลัมน์ที่ใช้คือ Agilent HP5MS 30 m x 0.25 mm, film thickness 0.25 µm. Temperature gradients เป็นดังต่อไปนี้: 60°C เป็นเวลา 2 นาที, ต่อมา เพิ่มอุณหภูมิที่ 20°C/นาที จนถึง 200°C, และรักษาไว้ที่ 250°C เป็นเวลา 5 นาที อุณหภูมิที่ Injection port (splitless) เท่ากับ 250°C

1.2 การวิเคราะห์ปริมาณกรดเบนโซอิก ใช้วิธีที่พัฒนาโดย Techakriengkrai and Surakarnkul (2006) โดย นำตัวอย่างเครื่องดื่ม 10 มิลลิลิตร มาสกัดด้วย solid-phase extraction (C18 SepPak Column) โดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย นำสารสกัดที่ได้ 20 ไมโครลิตรไปวิเคราะห์ด้วย high-performance liquid chromatographic technique (HPLC) (Thermo Separation Products, UK) โดยใช้ UV-visible detector (Thermo Separation Products, UK) ที่ความยาวคลื่น 235 นาโนเมตร คอลัมน์ที่ใช้คือ Waters SPHERISORB S100DS2, 250 x 4.6 mm (Waters, UK) ดำเนินการ mobile phase แบบ isocratic (60:40, 0.01M ammonium acetate buffer: Methanol (HPLC grade, Carlo Erba Reagent, UK) ที่ อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ใช้เวลาในการวิเคราะห์ตัวอย่างละ 15 นาที

1.3 การวิเคราะห์ปริมาณกรดแอสคอร์บิก พัฒนาจากวิธีของ Kafkas et al (2006) โดย นำตัวอย่างเครื่องดื่ม 10 มิลลิลิตร มาสกัดโดยวิธี liquid-liquid extraction โดยใช้ เอทานอลเป็นตัวทำละลาย นำสารสกัดที่ได้ 20 ไมโครลิตรไปวิเคราะห์โดย high-performance liquid chromatographic technique (HPLC) (Thermo Separation Products, UK) โดยใช้ UV-visible detector (Thermo Separation Products, UK) ที่ความยาวคลื่น 214 นาโนเมตร คอลัมน์ที่ใช้คือ C18 reverse phase (5 μ m), 150 x 4.6 mm (Waters, UK) ดำเนินการ mobile phase แบบ isocratic (90:10, 20 mM Potassium Phosphate, pH 3.0: Acetonitrile (HPLC grade, Carlo Erba Reagent, UK) ที่อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ใช้เวลาในการวิเคราะห์ตัวอย่างละ 20 นาที

ตารางที่ 3 ชนิดและปริมาณส่วนผสมในสูตรน้ำส้ม 25 % พาสเจอร์ไรส์ที่ผลิตในโรงงาน

ชนิดส่วนผสม	ปริมาณ (%)
1. น้ำ	83.36
2. น้ำส้มเข้มข้น	5.00
3. น้ำเชื่อมฟรักโทส	5.40
4. น้ำเชื่อมซูโครส	5.80
5. สารทำให้ขุ่น	0.14
6. โซเดียมเบนโซเอต	0.02
7. กรดซิตริก	0.04
8. กลิ่นส้ม	0.15
9. สี	0.09
รวม	100

ตารางที่ 4 น้ำส้ม 25 % พาสเจอร์ไรส์ ที่เติมโซเดียมเบนโซเอตและกรดแอสคอร์บิก ปริมาณต่าง ๆ กัน

สูตรที่	โซเดียมเบนโซเอต ^a (ppm)	กรดแอสคอร์บิก ^b (ppm)
1	0	0
2	200	0
3	0	60
4	0	120 ^c
5	200	60
6	200	120 ^c

หมายเหตุ : ^a ปริมาณโซเดียมเบนโซเอต คำนวณจากที่กฎหมายกำหนดไว้ไม่เกิน 200 มิลลิกรัมต่อเครื่องดื่ม 1 กิโลกรัมในรูปของกรดเบนโซอิก (กองควบคุมอาหาร, 2545 a)

^b ปริมาณกรดแอสคอร์บิกคำนวณจากปริมาณที่แนะนำให้บริโภคต่อวัน (Thai recommended daily intakes, Thai RDI) เท่ากับ 60 มิลลิกรัม และการกล่าวอ้างทางโภชนาการระดับสูง หรือ อุดม ซึ่งต้องมีสารอาหารตั้งแต่ร้อยละ 20 ของ Thai RDI ขึ้นไป และปริมาณหนึ่งหน่วยบริโภคของเครื่องดื่มน้ำผลไม้เท่ากับ 200 มิลลิลิตร (วิธีคำนวณ = $20/100 \times 60 \times 1,000/200 = 60 \text{ mg/L} = 60 \text{ ppm}$) (กองควบคุมอาหาร, 2541)

^c ปริมาณที่เติมเป็นสองเท่าของ b เพื่อทดแทนการสูญเสียเนื่องจากความร้อน

1.4 การวิเคราะห์ปริมาณทองแดงและเหล็กใช้วิธีของ AOAC (2002) โดยย่อยตัวอย่าง 2 กรัม ด้วย 30 % hydrogen peroxide 2 มิลลิลิตร และ nitric acid 5 มิลลิลิตร ในภาชนะปิดด้วยเตาไมโครเวฟนาน 22 นาที (power 500 watts) ทำให้เย็น ถ่ายใส่ฟลาสขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน วิเคราะห์ทองแดงและเหล็กด้วยเครื่อง Flame atomic absorption spectrophotometer

2 ผลิตน้ำส้ม 25 % พาสเจอร์ไรส์ เติมโซเดียมเบนโซเอต กรดแอสคอร์บิก ตามปริมาณที่ได้ศึกษาในข้อ 1 ปรับค่าพีเอชผลิตภัณฑ์ เป็น 2, 3, 4 และเท่ากับที่ผลิตในโรงงาน

ด้วยกรดซิทริก นำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาวิเคราะห์ เบนซีน กรดเบนโซอิก กรดแอสคอร์บิก ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (degree brix) ค่าพีเอช และเปอร์เซ็นต์กรด เล็กพืเอชของ ผลิตภัณฑ์ที่ทำให้เกิดเบนซีนสูงสุดเพื่อศึกษาต่อในข้อ 3

3 ผลิตภัณฑ์ 25 % พาสเจอไรส์ เดิมโซเดียมเบนโซเอต และกรดแอสคอร์บิกตาม ปริมาณที่ได้ศึกษาในข้อ 1 ปรับค่าพีเอชตามผลการศึกษาในข้อ 2 แปรอุณหภูมิและเวลาฆ่าเชื้อ ผลิตภัณฑ์เป็น อุณหภูมิ 100 °ซ นาน 10 และ 20 นาที 90 °ซ นาน 15, 20 และ 30 นาที นำ ผลิตภัณฑ์ที่ได้มาวิเคราะห์ เบนซีน กรดเบนโซอิก กรดแอสคอร์บิก ปริมาณของแข็งที่ละลาย ได้ทั้งหมด (degree brix) ค่าพีเอช และเปอร์เซ็นต์กรด เล็กสภาวะการฆ่าเชื้อที่ทำให้เกิดเบนซีน สูงสุดเพื่อศึกษาต่อในข้อ 4

4 ผลิตภัณฑ์ 25 % พาสเจอไรส์ เดิมโซเดียมเบนโซเอต กรดแอสคอร์บิก ตาม ปริมาณที่ได้ศึกษาในข้อ 1 ปรับค่าพีเอชด้วยกรดซิทริกตามข้อ 2 และฆ่าเชื้อผลิตภัณฑ์ตามข้อ 3 เก็บผลิตภัณฑ์ในสภาวะที่แตกต่างกันดังนี้คือ อุณหภูมิตู้เย็น (4 °ซ), อุณหภูมิห้อง (35 °ซ) และอุณหภูมิ 45 °ซ ในสภาวะที่มี และไม่มีแสงสว่าง นำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาวิเคราะห์ เบนซีน กรดเบนโซอิก กรดแอสคอร์บิก ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (degree brix) ค่าพีเอช และเปอร์เซ็นต์กรดที่ระยะเวลาการเก็บนาน 1, 15, 30, 45, 60, 75 และ 90 วัน

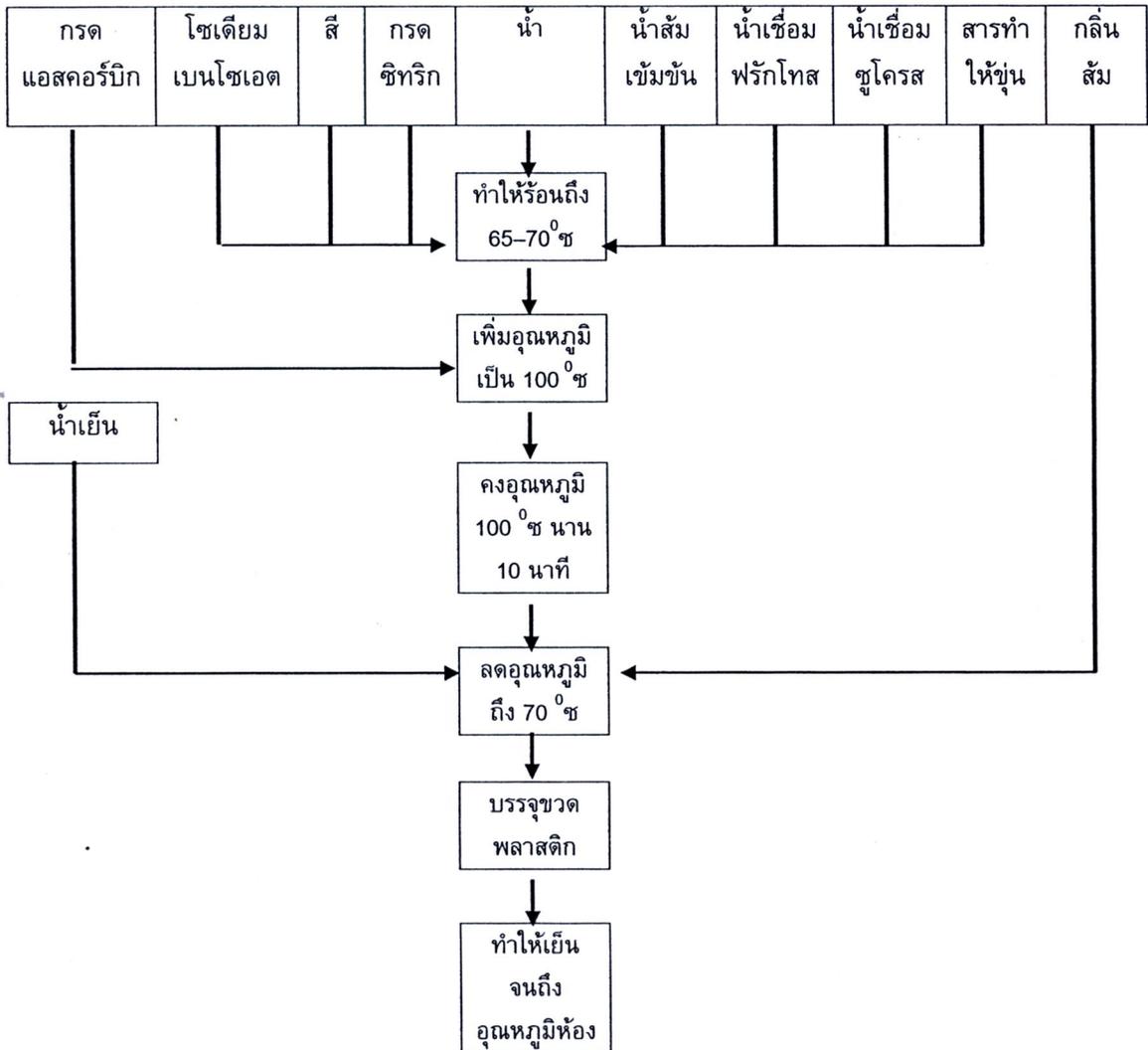
5 ศึกษาชนิดและปริมาณสารจับไอออนโลหะ (chelating agent) ในผลิตภัณฑ์น้ำส้ม 25 % พาสเจอไรส์ ตามสภาวะที่ได้จากการศึกษาข้อ 1 - 4 โดยใช้ส่วนผสมดังตารางที่ 3 และเพิ่มกรดแอสคอร์บิกเป็น 120 ppm ใช้สารจับไอออนโลหะ 2 ชนิด คือ Disodium ethylene diamine tetraacetic acid (disodium. EDTA) และ Sodium hexametaphosphate (SHMP) แปรปริมาณสารชนิดแรก และชนิดที่สองเท่ากับ 75, 150 และ 500, 1000 มิลลิกรัมต่อเครื่องดื่ม 1 กิโลกรัม เดิมโลหะหนัก 2 ชนิดได้แก่ ทองแดง ในรูปสารประกอบคอปเปอร์ซัลเฟต (copper sulfate, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) และ เหล็ก ในรูปสารประกอบเฟอร์รัสซัลเฟต (ferrous sulfate, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) โดยคำนวณเป็นปริมาณทองแดง และเหล็กเท่ากับ 5 และ 15 ppm ตามลำดับ ซึ่งเป็นปริมาณสูงสุดที่อนุญาตให้ตรวจพบได้ในเครื่องดื่มตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับ ที่ 214 (กองควบคุมอาหาร, 2543) (ตารางที่ 5) วิเคราะห์ปริมาณโลหะหนัก (ทองแดง และ เหล็ก) เริ่มต้นในผลิตภัณฑ์ เก็บผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิ 45 °ซ ในสภาวะที่มีแสงสว่าง วิเคราะห์ ปริมาณเบนซีน กรดเบนโซอิก กรดแอสคอร์บิก ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (degree brix) ค่า พีเอช และเปอร์เซ็นต์กรด ที่ระยะเวลาเก็บนาน 1 และ 30 วัน

6. การวิเคราะห์ทางสถิติ ใช้ซอฟต์แวร์สำเร็จรูป Microsoft Office Excel 2003 (Microsoft Corp., USA) ในการจัดการข้อมูลเบื้องต้น จากนั้น ใช้ Minitab V.14 (Minitab Inc., USA) ในการคำนวณค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากผลการวิเคราะห์ปริมาณกรด เบนโซอิก กรดแอสคอร์บิก และเบนซีน แสดงผลในรูปแบบของค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

7. สถานที่และระยะเวลาในการทำวิจัย

สถานที่ : ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง

ระยะเวลา : สิงหาคม 2552 - กุมภาพันธ์ 2554



ภาพที่ 5 ขั้นตอนการผลิตน้ำส้ม 25 % พาสเจอร์ไรส์

ตารางที่ 5 ปริมาณโลหะหนัก และสารจับเอนโลหะที่เติมในน้ำส้ม 25 % ฟอสเฟอไรต์

สูตรที่	เหล็ก (ppm)	ทองแดง (ppm)	Disodium. EDTA (ppm)	Sod.hexametaphosphate (ppm)
1	0	0	0	0
2	0	0	75	0
3	0	0	150	0
4	0	0	0	500
5	0	0	0	1000
6	15	0	0	0
7	15	0	75	0
8	15	0	150	0
9	15	0	0	500
10	15	0	0	1000
11	0	5	0	0
12	0	5	75	0
13	0	5	15	0
14	0	5	0	500
15	0	5	0	1000