ภาคผนวก ข
การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

1. การวิเคราะห์หาปริมาณกรด (AOAC. 2000)

สารเคมี

1. โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 N
2. ฟีนอล์ฟทาลีน

วิธีวิเคราะห์

1. เตรียมตัวอย่างมะม่วงแผ่น10gในน้ำกลั่นคนให้ละลายแล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 ml
2. กรองเอาส่วนที่เป็นน้ำออกมาใช้ ไตเตรทโดยใช้กระดาษกรองเบอร์ 4
3. ดูดตัวอย่างขนาด 30 ml ลงใน Flask ขนาด 100 ml
4. หยดฟีนอล์ฟทาลีน 0.3 ml/100 ml. sol^{n} 2-3 หยด แล้วไตเตรทกับโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 N จุดยุติจะเป็นสีชมพูนาน 30 วินาที
5. บันทึกปริมาณ ml ของโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 N แล้วนำไปคำนวณหาปริมาณกรด
6. การคำนวณหาร้อยละปริมาณกรดจากสูตร

$$\text{การหาปริมาณกรด (\%) } W = \frac{V \times N \times \text{Factor of the cid} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}}$$

W = น้ำหนักกรดในตัวอย่าง

V = ปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไตเตรท (ml)

N = ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (N)

Factor : Citric cid monohydrate

2. การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซิง (Lane and Eynon; AOAC, 2000)

สารเคมี

1. Fehling's solution เตรียมได้จากคอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$) 69.28 g ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้สารละลาย 1000 ml เก็บในขวดสีชา
2. Fehling's B solution เตรียมได้จากโปแตสเซียมโซเดียมตาร์เตรต ($KNC_4H_4O_4.4H_2O$) 346 g และโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 100gปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้สารละลาย1000 ml เก็บในขวดสีชา
3. 1% Methylene blue เตรียมได้จาก Methylene blue 1 g ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้สารละลาย 100 ml เก็บในขวดสีชา

4. 10% Potassium oxalate solution เตรียมได้จาก Potassium oxalate 10 g ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้สารละลาย 100 ml เก็บในขวดสีชา

5. 10% Neutral lead acetate solution เตรียมได้จาก Neutral lead acetate 10 g ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้สารละลาย 100 ml เก็บในขวดสีชา

6. Standard glucose solution เตรียมได้จากglucose อบแห้ง 0.2 g ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้สารละลาย 100 ml

การคำนวณหาค่า F โดยใช้ Standard Method

1. Fehling's solution 5 ml + Fehling's B solution 5 ml + Standard glucose solution 24 ml ในขวดขนาด 100 ml

2. ต้มให้เดือดอย่างเร็วนาน 2 นาที หยด 1% Methylene blue 2-3 หยด ได้สารละลายสีน้ำเงิน

3. ไตเตรทโดยใช้ Standard glucose solution จนถึงจุดยุติ ซึ่งเป็นสีแดงอิฐ การไตเตรทต้องเสร็จภายใน 3 นาที ระหว่าง ไตเตรท ต้องให้สารละลายในขวดเดือดตลอดเวลา พร้อมเขย่าให้เข้ากันตลอด

4. บันทึกจำนวน ml ของ Standard glucose solution ที่ใช้ไตเตรท และคำนวณค่า Factor ชอง Fehling's solution

เมื่อทำการทดลองแล้ว พบว่าปริมาณ Standard glucose solution ที่ไตเตรทได้เท่ากับ 26 ml

$$\text{การคำนวณค่า F} = \frac{\text{ปริมาณ Standard glucose solution ที่ใช้ไตเตรท(ml) x น้ำหนัก glucose(g)}}{100}$$

$$=(26 \times 0.2)/100$$

$$=0.052$$

การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซิง

1. ชั่งมะม่วงแผ่นหนัก 5 กรัม + น้ำกลั่น 100 ml ใน flask ขนาด 250 ml

2. ต้มให้เดือดนาน 1 ชั่วโมง เติม 10 % Neutral lead acetate solution 2 ml เขย่าให้เข้ากัน

3. ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที เติม 10% Potassium oxalate solution ในปริมาณน้อยที่สุดเพื่อตกตะกอนNeutral lead acetate solution ที่มากเกินพอ แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 250ml

4. กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 แล้วแบ่งเป็น 2 ส่วน

5. ส่วนแรกใช้หาน้ำตาลรีดิวซิง อีกส่วนเก็บไว้หาน้ำตาลทั้งหมด

6. ไตเตรท กับ Fehling's solution เช่นเดียวกับการหาค่ามาตรฐานของ Fehling's solution

7. บันทึกจำนวน ml ของสารละลายตัวอย่างที่ใช้ในการไตเตรทตั้งแต่ต้นจนถึงจุดยุติ

$$\%\text{Reducing sugar} = \frac{F \times 100 \times 250}{G \text{ of sample} \times \text{ปริมาตรของสารละลายตัวอย่างที่ใช้ไตเตรท}}$$

3. การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Lane and Eynon; AOAC, 2000)

1. นำ Filtrate ที่ได้จากการเตรียมตัวอย่างในการหา Reducing sugar มา 50 ml ใส่ลงใน flask ขนาด 250 ml

2. เติมสารละลาย HCl (1:1) 10 ml ต้มให้เดือดนาน 10 นาที

3. ทิ้งให้เย็นลง และทำให้เป็นกลางด้วย 50% NOH

4. เติมน้ำกลั่นให้ครบ 250 ml

5. นำตัวอย่างที่ได้มาไตเตรทกับ Fehling's solution เช่นเดียวกับการหาค่ามาตรฐานของ Fehling's solution

6. บันทึกจำนวน ml ของสารละลายตัวอย่างที่ใช้ในการไตเตรทตั้งแต่ต้นจนถึงจุดยุติ

$$\%\text{Total sugar} = \frac{F \times 100 \times 250 \times 250}{g \text{ of sample} \times \text{ปริมาตรของสารละลายตัวอย่างที่ใช้ไตเตรท}}$$

4. การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน (AOAC. 2000)

สารเคมี

ปิโตรเลียมอีเธอร์

วิธีวิเคราะห์

1. นำตัวอย่างมะม่วงแผ่นที่บดแล้ว 3-4 กรัม ไปอบที่อุณหภูมิ 103$\pm$2 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง หรือได้น้ำหนักคงที่

2. ชั่งตัวอย่างจากข้อ 1 ประมาณ 3-4 กรัม (ให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน) ห่อด้วยกระดาษกรอง ใส่ลงไปใน thimble อุดปาก thimbleด้วยสำลีที่สกัดไขมันออกแล้ว

3. นำ thimble เข้าเครื่องสกัดไขมัน แล้วเติมปิโตรเลียมอีเธอร์ ในปริมาณที่เพียงพอที่จะให้เกิดการสกัดที่สมบูรณ์ลงใน flask ที่อบแห้งและชั่งน้ำหนักที่แน่นอนแล้ว นำ flask และชุดสกัดต่อเข้ากับ condenser ทำการสกัดใช้เวลาประมาณ 1-2 ชั่วโมง

4. แยก flask และชุดสกัดออกจาก condenser เทของแข็งออกจาก thimble นำมาบดด้วยปิโตรเลียมอีเธอร์อีกครั้งเพื่อสกัดไขมันในของแข็งออกมาให้ได้มากที่สุด

5. เทของแข็งที่สกัดมากลับเข้า thimble อีกครั้ง เริ่มทำการสกัดเช่นเดิมโดยเติมปิโตรเลียมอีเธอร์ลงไปอีก ใช้สำลีที่สกัดแล้วอุด thimbleไว้ สกัดต่ออีกครั้งโดยใช้เวลาประมาณ 1-2 ชั่วโมง

6. นำ flaskไประเหยปิโตรเลียมอีเธอร์ โดยอบในตู้อบอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนัก

7. คำนวณหาร้อยละไขมันจากสูตร

$$\text{ปริมาณไขมัน (\%)} = \frac{\text{ปริมาณไขมันที่สกัดได้}}{100 - \text{ปริมาณความชื้น}} \times 100$$

5. การวิเคราะห์หาปริมาณ Total Dietry fiber (AOAC. 2000)

สารเคมี

1. ethanol 95% (v/v)
2. ethanol 78% (v/v)
3. acetone
4. phosphate buffer (0.08 M), pH 6.0
5. Termmyl (heat – stable) – amylase No. 3306, Sigma Chemical Co เก็บในตู้เย็น
6. Protease No. 9913, Sigma Chemical Co เก็บในตู้เย็น
7. Celite No.C8656, Sigma Chemical Co
9. สารละลาย NOH เข้มข้น 0.1575 N
10. สารละลาย HCl เข้มข้น 0.325 N

วิธีการ

1. เตรียมตัวอย่างโดยการอบแห้งที่อุณหภูมิ 105 ^{o}C เป็นเวลา 13 ชั่วโมง (อบค้างคืน) บดให้ละเอียดแล้วทิ้งให้เย็นในเดสซิเคสเตอร์ ถ้าตัวอย่างมีไขมันมากกว่าร้อยละ 10 ต้องสกัดไขมันออกโดยใช้ปิโตรเลียมอีเธอร์ ในอัตราส่วน 25 ml ต่ออาหารแห้ง 1 g โดยสกัด 3 ครั้งก่อนบด

2. ชั่งตัวอย่างแห้ง 1 กรัม ให้รู้น้ำหนักที่แน่นอน (ชั่งละเอียดถึง 0.1 ml) โดยน้ำหนักของตัวอย่าง 2 ซ้ำต้องไม่ต่างกันเกิน 20 ml และทำ blank ควบคู่กันไปด้วย

3. ใส่ตัวอย่างในบีกเกอร์ขนาด 500 ml แล้วเติมสารละลาย phosphate buffer 50 ml เติม Termmyl 0.1 ml ปิดบีกเกอร์ด้วยอลูมิเนียมฟอยด์แล้วต้มใน water bath ที่อุณหภูมิ 95-100 ^{o}C เป็นเวลา 30 นาที เขย่าบีกเกอร์ทุก 5 นาที

4. ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับpH เป็น 7.40±2 ด้วยสารละลาย NOH 0.2575 N 10 ml แล้วเติม Protease 5 ml ปิดบีกเกอร์ด้วยอลูมิเนียมฟอยด์แล้วต้มใน water bath ที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 30 นาที เขย่าบีกเกอร์ทุก 5 นาที

5. ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับpH เป็น 4.0-4.6 ด้วยสารละลาย HCl 0.325 N 10 ml แล้วเติม myloglucosidse 0.3 ml ปิดบีกเกอร์ด้วยอลูมิเนียมฟอยด์แล้วต้มใน water bath ที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 30 นาที เขย่าบีกเกอร์ทุก 5 นาที

6. เติม EtoH 95% 20ml ที่อุณหภูมิ 60 °C ลงในบีกเกอร์ตัวอย่างที่ย่อยด้วยเอนไซม์แล้ว เพื่อตกตะกอนส่วนที่เป็น Soluble Dietry Fiber ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที

7. ชั่ง crucible ที่ใส่ celite ให้รู้น้ำหนักที่แน่นอน จากนั้นล้างด้วย EtoH 78 % แล้วต่อ crucible เข้ากับเครื่องปั๊ม (suction) แล้วถ่ายสารที่ย่อยได้จากข้อ 6 ลงกรองเป็นเวลา 30 นาที

8.ล้าง residue ด้วย EtoH 78% 20 ml 3 ครั้งEtoH 98% 20ml 2ครั้ง และ acetone 10 ml 2 ครั้ง

9.อบ residueที่ 100 °C เป็นเวลาประมาณ 16 ชั่วโมง (อบค้างคืน) แล้วทิ้งให้เย็นที่เดสซิเคเตอร์ชั่งน้ำหนักให้รู้แน่นอน หักลบน้ำหนัก crucible และ celite ออกเมื่อคำนวณน้ำหนัก residue ที่ได้

10. หาน้ำหนักปริมาณโปรตีน และปริมาณเถ้าจากตัวอย่าง เพื่อนำมาหักลบออกจากน้ำหนัก residue ที่ได้ จึงจะได้เส้นใยอาหารรวม (Total Dietry Fiber)

การคำนวณ

B =blank (ml)

= น้ำหนักของ residue – P_B- A_B

เมื่อน้ำหนักของ residue = ค่าเฉลี่ยของน้ำหนัก residue (ml) 2 ซ้ำทำจาก blank

P_B=น้ำหนักของโปรตีน (ml)

A_B =น้ำหนักของเถ้า (ml)

%TDF = [(น้ำหนักของ residue – P- A - B)/น้ำหนักของตัวอย่าง]*100

เมื่อ น้ำหนัก residue = ค่าเฉลี่ยของตัวอย่าง 2 ซ้ำ

P = น้ำหนักของโปรตีน (ml) จากตัวอย่าง

น้ำหนักของตัวอย่าง=ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักตัวอย่าง (ml) 2 ซ้ำ

6. การวิเคราะห์ปริมาณเพคติน (AOAC. 1995)

สารเคมีที่ใช้

1. แอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้น 30%,80% และ 95% (v/v)
2. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10 %(w/v)

วิธีการวิเคราะห์

1. ชั่งน้ำหนักตัวอย่าง(เนื้อมะม่วง) 5 กรัม + แอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้น 95%โดยใช้อัตราส่วนระหว่าง ตัวอย่าง : แอลกอฮอล์ เป็น 1:3 โดยปริมาตร ทำการผสมลงในเครื่องผสมเป็นเวลา 5 นาที จึงนำมา reflux

2. กรองเก็บกากของตัวอย่างมาแช่ในแอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้น 30% โดยใช้กากของตัวอย่าง: แอลกอฮอล์ในอัตราส่วน 1: 2 โดยปริมาตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที

3. กรองเก็บกากของตัวอย่างมาแช่ในแอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้น 30% ทำซ้ำแบบเดิม 2 ซ้ำ แล้วจึงล้างกากครั้งสุดท้ายด้วยแอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้น 95% 30 ml

4. นำกากที่ได้มาเติมน้ำกลั่น 100 ml ปรับpH เป็น 2 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที นำไปต้มที่ water bath ที่อุณหภูมิ 80 ^{O}C นาน 1 ชั่วโมงแล้วจึงกรองกากตัวอย่างผ่านใยแก้ว

5. นำกากของตัวอย่างที่ผ่านการสกัดเพคตินในครั้งแรกนี้ใส่ในบีกเกอร์แล้วเติมน้ำกลั่นอีก 50 ml แล้วต้มใน water bath ที่อุณหภูมิ 80 ^{O}C นาน 10 นาที

6. กรองสารละลายเพคตินผ่านใยแก้ว แล้วล้างกากของตัวอย่างด้วยน้ำร้อนอีก 50 ml

7. เก็บสารละลายเพคติที่กรองได้รวมกันทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติมแอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้น 95% และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น ลงในสารละลายเพคติน โดยใช้อัตราส่วนของแอลกอฮอล์: สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น: สารละลายเพคติน เป็น 45:1:40โดยปริมาตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 ชั่วโมง

8. กรองตะกอนเพคตินผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ที่ทราบน้ำหนักแน่นอน แล้วโดยล้างตะกอนเพคตินด้วยแอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้น 80%

9. นำไปอบในตู้อบที่ควบคุมอุณหภูมิ 105 ^{O}C จนกระทั่งน้ำหนักคงที่

10. คำนวณหาปริมาณของเพคตินจากสูตร

$$\text{ปริมาณเพคติน(\%)} = \frac{\text{น้ำหนักของตัวอย่างก่อนอบ-น้ำหนักของตัวอย่างหลังอบ}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}} \times 100$$

7. การหาปริมาณแป้ง (AOAC. 1995)

1. เตรียมตัวอย่างมะม่วงแผ่น 10gในน้ำกลั่นคนให้ละลายแล้วปรับปริมาตรให้ได้100 ml
2. กรองเอาส่วนที่เป็นน้ำออกมาใช้ ไตเตรทโดยใช้กระดาษกรองเบอร์ 4
3. ดูดตัวอย่างขนาด 30 ml ลงใน Flask ขนาด 100 ml
4. เติมสารละลาย H_2SO_4 และ$KMnO_4$ ความเข้มข้น 10%จนกระทั่งสารละลายใสไม่มีสี
5. นำสารละลายที่ได้ไปใส่ใน Porlarimetric tube
6. นำค่าสารละลายที่ได้ไปวัดมุมค่าการหมุน

8. การเตรียมสารปรับปรุงเนื้อสัมผัสเพื่อใช้ในการพัฒนามะม่วงแผ่น

1. สารประเภทไฮโดรคอลลอยด์ ในระดับความเข้มข้นร้อยละ 2 (โดยปริมาตร) โดยชั่งน้ำหนักของสารประเภทไฮโดรคอลลอยด์ (ผงวุ้น เพคติน แลเจลาติน) ที่ต้องการ 2 กรัม+น้ำเปล่า 100 กรัม คนให้เข้ากัน นำไปให้ความร้อนจนกระทั่งส่วนผสมละลาย

2. แป้ง ในระดับความเข้มข้นร้อยละ 30 (โดยปริมาตร)โดย ชั่งน้ำหนักแป้งมันสำปะหลังหรือแป้งสาลีเอนกประสงค์มา 30 g +น้ำเปล่า 100 ml คนให้เข้ากัน แล้วนำไปให้ความร้อนจนกระทั่งได้สารละลายแป้งที่ข้นหนืด