บทที่ 3
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบ

ผลลำไยพันธุ์ดอชั้นมาตรฐาน A ที่บรรจุในตะกร้าพลาสติก น้ำหนักรวมตะกร้า 11 กิโลกรัม และผ่านการรมด้วยก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ได้ซื้อมาจากผู้ประกอบการค้าลำไยเพื่อการส่งออก โดยในการทดลองครั้งที่ 1 เป็นผลลำไยในฤดูที่ได้รับความอนุเคราะห์ มาจาก บริษัท อินเตอร์เฟรช จำกัด จำนวน 3 ตะกร้าที่ผ่านการรมด้วยก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์เมื่อวันที่ 24 สิงหาคม 2547 นำมาทดลองภายหลังจากผ่านการรมแล้วไม่เกิน 12 ชั่วโมง ส่วนในการทดลองครั้งที่ 2 เป็นผลลำไยนอกฤดูที่ผ่านการรมด้วยก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์เมื่อวันที่ 1 พฤศจิกายน 2547 นำมาทดลองภายหลังจากผ่านการรมแล้ว 12 ชั่วโมง โดยคัดเลือกเอาเฉพาะผลลำไยที่ดีและมีขนาดผลสม่ำเสมอกัน

3.2 วิธีทดลอง

บรรจุผลลำไยลงในตะกร้าพลาสติกที่ใช้บรรจุทางการค้าขนาดกว้าง x ยาว x สูง เท่ากับ 15 x 33 x 10 เซนติเมตร โดยบรรจุตะกร้าละ 1.5 กิโลกรัม และแบ่งในตะกร้าออกเป็น 3 ช่องๆละ 0.5 กิโลกรัม (จำนวนผลประมาณ 45 – 53 ผล) หลังจากนั้นนำตะกร้าผลลำไยไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5±1 และ 10±1°ซ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซึ่งแต่ละซ้ำประกอบด้วยผลลำไย 0.5 กิโลกรัม และเก็บรักษาเป็นระยะเวลานาน 8 สัปดาห์ แล้วสุ่มตัวอย่างออกมาทุกสัปดาห์เพื่อวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ ทางเคมี และกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส

3.3 การวางแผนการทดลอง

วิเคราะห์ค่าเฉลี่ยระหว่างผลลำไยที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5±1 และ 10±1°ซ ในแต่ละสัปดาห์แบบ T – test (Two – sample T – test)

ส่วนอิทธิพลของแต่ละปัจจัยทำการวิเคราะห์ผลแบบ 2 × 9 factorial in CRD โดยปัจจัยที่ 1 คือ อุณหภูมิการเก็บรักษา (5±1 และ 10± 1°ซ) ส่วนปัจจัยที่ 2 คือ ระยะเวลาการเก็บรักษา และทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan' Multiple range test ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS V.10.0.1 (อิศรพงษ์, 2544)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4 การวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ

3.4.1 เปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนัก

ชั่งน้ำหนักผลลำไยทุกสัปดาห์ด้วยเครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Analytical balance, Satorius; Model A Germany) โดยใช้ผลลำไยประมาณ 0.5 กิโลกรัมต่อซ้ำ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนัก

$$\text{เปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนัก} = \frac{(\text{น้ำหนักเริ่มต้น} - \text{น้ำหนัก ณ. วันที่ชั่ง})}{\text{น้ำหนักเริ่มต้น}} \times 100$$

3.4.2 เปอร์เซ็นต์การเน่าเสียโดยจำนวนผล

พิจารณาการเน่าเสียของผลลำไยที่โดยนับจำนวนผลที่เน่าเสีย แล้วคิดเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์การเน่าเสียต่อจำนวนผลลำไยทั้งหมด ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การเน่าเสียโดยจำนวนผล

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเน่าเสียโดยจำนวนผล} = \frac{\text{จำนวนผลลำไยที่เน่าเสียในวันที่ตรวจ}}{\text{จำนวนผลลำไยทั้งหมด}} \times 100$$

3.4.3 เปอร์เซ็นต์การเน่าเสียโดยน้ำหนัก

พิจารณาจากการเน่าเสียของผลลำไยโดยการชั่งน้ำหนักผลที่เน่าเสีย แล้วคิดเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์การเน่าเสียต่อน้ำหนักผลลำไยทั้งหมด ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การเน่าเสียโดยน้ำหนัก

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเน่าเสียโดยน้ำหนัก} = \frac{\text{น้ำหนักผลลำไยที่เน่าเสียในวันที่ตรวจ}}{\text{น้ำหนักผลลำไยทั้งหมด}} \times 100$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4.4 การวัดสีเปลือกด้านนอกและด้านในของเปลือกผลลำไย และสีของเนื้อลำไย

วัดสีเปลือกด้านนอกและด้านในของเปลือกผลลำไย และสีของเนื้อลำไยโดยใช้เครื่อง Chroma meter (Chroma meter, Minolta; CR – 300 Japan) บันทึกค่าค่าเป็น L* , a* และ b* โดยใช้ผลลำไย 10 ผลต่อซ้ำ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

โดยค่า L* = The lightness factor (value)

a* และ b* = The chromaticity coordinates (Hue angle , Chroma)

นำค่า a* และ b* มาคำนวณหาค่า Chroma (C*) และ Hue angle (H°) จากสมการ

Chroma $= (a^{2} + b^{2})^{1/2}$

Hue angle $= (\tan^{-1}(b^{*} / a^{*}) / 6.2832) \times 360$ ถ้า $a^{*} > 0$ และ $b^{*} > 0$

เมื่อ L* เป็นค่าความขาว-ดำ ถ้าค่า L* มีค่าใกล้ศูนย์ หมายถึง วัตถุมีสีดำ หากค่า L* เข้าใกล้ 100 หมายถึง วัตถุมีสีขาว

a* เป็นค่าแสดงถึงสีแดงและสีเขียว เมื่อ a* มีค่าเป็นบวก หมายถึง วัตถุมีสีแดง หากค่า a* มีค่าเป็นลบ หมายถึง วัตถุมีสีเขียว

b* เป็นค่าแสดงถึงสีเหลืองและสีน้ำเงิน เมื่อ b* มีค่าเป็นบวก หมายถึง วัตถุมีสีเหลือง หากค่า b* มีค่าเป็นลบ หมายถึง วัตถุมีสีน้ำเงิน

C* เป็นค่าแสดงถึงความเข้มของสี ถ้า C* มีค่าเข้าใกล้ศูนย์ หมายถึง วัตถุมีสีเทา หากค่า C* มีค่าเพิ่มขึ้นแสดงว่าวัตถุมีความเข้มสีเพิ่มมากขึ้น

H° เป็นค่าแสดงถึงสีแท้จริงที่ปรากฏให้เห็น คำนวณให้อยู่ในรูปขององศาในวงกลม ซึ่งเริ่มตั้งแต่ 0 องศาถึง 360 องศา โดยสีในแกนหลักได้แก่ 0 องศา แสดงสีแดง – ม่วง 90 องศา แสดงสีเหลือง 180 องศา แสดงสีเขียว และ 270 องศา แสดงสีน้ำเงิน (สุคนธ์ชื่นและวรรณวิบูลย์, 2543; McGuire, 1992)

3.5 การวิเคราะห์สมบัติทางเคมี

3.5.1 ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (พีเอช) ของเปลือกลำไย

นำเปลือกลำไยมา 10 ผลต่อซ้ำ ทำให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้เครื่องปั่น (Blender, Moulinex; S648 Japan) เติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตรตั้งทิ้งไว้ 30 นาที แล้วนำมาวัดค่าความเป็นกรดเป็นด่างโดยใช้เครื่องพีเอชมิเตอร์ (Microprocessor pH meter, HANNA; Model 213 USA.) และก่อนใช้เครื่องพีเอชมิเตอร์ทุกครั้ง จะต้องผ่านการปรับค่ามาตรฐานโดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์มาตรฐานพีเอช 7.0 และ 4.0 (Buffer solution, Merck; Germany) ตามลำดับ ทำการวัดค่าตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.5.2 ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (พีเอช) ของเนื้อลำไย

นำเนื้อลำไย 10 ผลต่อซ้ำ ปั่นให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้เครื่องปั่น (Blender, National; Model MX–T2GN Japan) แล้วนำมาวัดค่าความเป็นกรดเป็นด่างโดยใช้เครื่องพีเอชมิเตอร์ (Microprocessor pH meter, HANNA; Model 213 USA.) และก่อนใช้เครื่องพีเอชมิเตอร์ควร

ตรวจสอบความถูกต้องของเครื่องวัดโดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์มาตรฐานพีเอช 7.0 และ 4.0 (Buffer solution, Merck; Germany) ตามลำดับ ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

3.5.3 ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้

นำน้ำปั่นของเนื้อลำไยที่ได้มาจากข้อ 3.5.2 มาวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้โดยใช้เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (Hand refractometer, ATAGO; Model N1 Japan) ที่วัดค่าได้ระหว่าง 0 – 32 % โดยก่อนใช้วัดตัวอย่างทุกครั้งให้ปรับค่าให้เป็น 0 ด้วยน้ำกลั่น ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ย

3.5.4 ปริมาณกรดทั้งหมดที่ไทเทรตได้

วัดปริมาณกรดทั้งหมดในตัวอย่างเนื้อลำไย โดยวิธีการไทเทรตและคำนวณผลในรูปของกรดซิตริก ตามวิธี AOAC (2000)

การเตรียมสารละลาย

ก) สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล เตรียมโดยชั่งโซเดียม-ไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide, NaOH, AR grade, Merck; Germany) จำนวน 4.00 กรัมโดยใช้เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Analytical balance, Satorius; Model A Germany) ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร นำสารละลายด่างที่ได้ไปเปรียบเทียบความเข้มข้นกับสารละลายมาตรฐาน potassium hydrogen phthalate (potassium hydrogen phthalate, $C_8H_5KO_4$, AR grade, Merck; Germany) ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล เพื่อหาความเข้มข้นที่แท้จริงของสารละลายด่าง

วิธีวิเคราะห์

นำตัวอย่างเนื้อลำไยที่ปั่นเป็นเนื้อเดียวกันจำนวน 10 กรัม เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการต้มเดือดลงไป 20 มิลลิลิตร ผสมตัวอย่างกับน้ำให้เข้ากันด้วยเครื่อง magnetic stirrer (magnetic stirrer, Whatman®; Model HPMS England) นำสารละลายตัวอย่างไปไทเทรตกับสารละลายโซเดียม-ไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล วัดค่าความเป็นกรดเป็นด่างของสารละลายที่ไทเทรตจนเครื่องพีเอชมิเตอร์(Microprocessor pH meter, HANNA; Model 213 U.S.A.) จุดยุติคือเมื่ออ่านค่าความเป็นกรดเป็นด่างได้ 8.1 บันทึกปริมาตรของสารละลายด่างที่ใช้ ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ และหาค่าเฉลี่ย นำค่าที่ได้คำนวณหาปริมาณกรดทั้งหมดที่ไทเทรตได้ในรูปของกรดซิตริกต่อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

100 กรัมของน้ำหนักสดโดยเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐาน ดังนี้ 1 มิลลิลิตรสารละลายโซเดียม-ไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล ทำปฏิกิริยาสมมูลพอดีกับกรดซิตริก 0.007 กรัม

$$\%\text{กรดทั้งหมดที่ไทเทรตได้} = \frac{\text{ความเข้มข้น NaOH (N)} \times \text{ปริมาตร NaOH (ml)} \times 0.070 \times 100}{\text{น้ำหนักของเนื้อลำไย (g)}}$$

3.5.5 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงและน้ำตาลทั้งหมด

วิเคราะห์ปริมาณโดยวิธีของน้ำตาลรีดิวซิงและน้ำตาลทั้งหมดในตัวอย่างเนื้อลำไย โดยวิธีของ Lane and Eynon ที่เรียบเรียงโดยลักขณาและนิธิยา (2544)

การเตรียมสารละลาย

ก) สารละลาย Carrez No.1 เตรียมโดยละลายซิงอะซีเตต (zinc acetate dehydrate, AR grade, Baker; U.S.A.) จำนวน 21.9 กรัม ในน้ำกลั่นที่มี glacial acetic acid (glacial acetic acid, AR grade, Merck; Germany) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

ข) สารละลาย Carrez No.2 เตรียมโดยละลายโพแทสเซียมเฟอโรไซยาไนด์ (potassium ferrocyanide, AR grade,Ajax Finechem; Australia) จำนวน 10.6 กรัมในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร

ค) สารละลาย Fehling No.1 เตรียมโดยละลายคอปเปอร์ซัลเฟต (copper sulphate, AR grade, Baker; U.S.A.) จำนวน 69.278 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

ง) สารละลาย Fehling No.2 เตรียมโดยละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์จำนวน 100 กรัม และโพแทสเซียมโซเดียมทาเทรต (potassium sodium tartrate, AR grade, Baker; U.S.A.) จำนวน 346 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

จ) สารละลายเมทิลีนบลูความเข้มข้น 1% เตรียมโดยละลายเมทิลีนบลู (methylene blue, AR grade, Merck; Germany) จำนวน 1 กรัมในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร

ฉ) สารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 6.34 นอร์มัล เตรียมโดยตวงสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (hydrochloric acid, AR grade, Merck; Germany) ปริมาตร 564.33 มิลลิลิตร ค่อยๆรินกรดลงในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

ช) สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 5 นอร์มัล เตรียมโดยชั่งโซเดียม-ไฮดรอกไซด์จำนวน 200 กรัมละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีวิเคราะห์

ชั่งตัวอย่างเนื้อลำไยที่ปั่นเป็นเนื้อเดียวกันจำนวน 10 กรัม เติมน้ำกลั่นลงไปพอประมาณให้เนื้อลำไยกระจายตัว เติม Clearing agent คือ สารละลาย Carrez No.1 และ 2 ลงไปอย่างละ 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น ตั้งทิ้งไว้ 20 นาที แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 (Whatman® no.4) เก็บสารละลายที่กรองได้ใช้วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาล ดังต่อไปนี้

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงก่อนการทำอินเวอร์ชัน

Preliminary titration

นำสารละลายตัวอย่างที่เตรียมไว้ใส่ลงในบิวเรตขนาด 50 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลาย Fehling No.1และ2 อย่างละ 5 มิลลิลิตร ใส่ในฟลาส์ขนาด 250 มิลลิลิตร ใส่แท่งแม่เหล็ก นำไปตั้งบนเครื่อง hot plate และ magnetic stirrer (hot plate and magnetic stirrer, Whatman®; Model HPMS England) จนเดือด ไทเทรตกับสารละลายน้ำตาลตัวอย่างจนสีน้ำเงินจางลง หยดสารละลายเมทิลีนบลูลงไป 1 –2 หยด ไทเทรตต่อจนสีฟ้าหายไปหมดเหลือตะกอนสีส้มแดง บันทึกปริมาตรของสารละลายน้ำตาลที่ใช้ ถ้าปริมาตรของสารละลายน้ำตาลที่ใช้อยู่ในช่วง 15 –50 มิลลิลิตร แสดงว่า สารละลายตัวอย่างมีความเข้มข้นที่เหมาะสม

Accurate titration

เมื่อเตรียมสารละลายตัวอย่างที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมแล้ว ต้องทำการไทเทรตซ้ำ เช่นเดียวกับ preliminary titration โดยปล่อยสารละลายน้ำตาลจากบิวเรตลงไปทันทีโดยใช้ปริมาตรน้อยกว่าที่ใช้ในการไทเทรต preliminary titration ประมาณ 1–2 มิลลิลิตร ปล่อยให้เดือดนาน 2 นาที หยดสารละลายเมทิลีนบลูลงไป 1–2 หยด ไทเทรตต่อจนสีฟ้าจางหายไปหมดเหลือตะกอนสีส้มแดง บันทึกปริมาตรของสารละลายน้ำตาลที่ใช้ ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ นำปริมาณสารละลายน้ำตาลที่ใช้มาหาค่าเฉลี่ยแล้วนำไปเปรียบเทียบหาปริมาณน้ำตาลในสารละลายตัวอย่างจากตารางมาตรฐาน (ภาคผนวก ค.)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงหลังการทำอินเวอร์ชัน

ปิเปตสารละลายตัวอย่างมา 15 มิลลิลิตร ใส่ในฟลาส์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 6.34 นอร์มัล ลงไป 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปไฮโดรไลซ์ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath, Gallenkamp; England) ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้น

นำมาทำให้เย็นทันที แล้วปรับค่าพีเอชให้เป็นกลางด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 5 นอร์มัล แล้วปรับปริมาตรสารละลายให้ได้ 250 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำสารละลายตัวอย่างนี้ใส่ลงในบิวเรตแล้วทำการไทเทรตกับสารละลาย Fehling No.1 และ 2 เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงก่อนการทำอินเวอร์ชัน ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ นำปริมาณสารละลายน้ำตาลที่ใช้มาหาค่าเฉลี่ยแล้วนำไปเปรียบเทียบหาปริมาณน้ำตาลในรูป invert sugar จากตารางมาตรฐาน คำนวณปริมาณน้ำตาล ดังนี้

น้ำตาลซูโครส (%) $= (D_2 - D_1) \times 0.95$

น้ำตาลทั้งหมด (%) $=$ % น้ำตาลซูโครส $+ D_1$

เมื่อ D_1 = % น้ำตาลรีดิวซิงก่อนการทำอินเวอร์ชัน

D_2 = % น้ำตาลรีดิวซิงหลังการทำอินเวอร์ชัน

3.5.6 ความชื้นที่เปลือกผลลำไย

วิเคราะห์โดยวิธีการอบแห้งตามวิธีที่เรียบเรียงโดยลักขณาและนิธิยา (2544)

อบ moisture can ให้แห้งสนิทในตู้อบลมร้อน (hot air oven, Memmert; Um 100 – 800 Germany) ประมาณ 20–30 นาที ทำให้เย็นใน desiccator และชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอนของ moisture can ด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Analytical balance, Satorius; Germany)

ชั่งตัวอย่างเปลือกลำไยให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 5 กรัม (จากลำไย 10 ผล) ใส่ลงใน moisture can ที่ผ่านการอบแห้งและทราบน้ำหนักแล้ว นำไปอบในตู้อบลมร้อนควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 100 – 105 องศาเซลเซียส นานประมาณ 3 ชั่วโมง นำออกมาจากตู้อบลมร้อน ปล่อยให้เย็นใน desiccator แล้วชั่งหาน้ำหนัก นำไปอบซ้ำหลายๆครั้งจนได้น้ำหนักคงที่ ซึ่งค่าที่ได้จะต้องไม่แตกต่างกันเกิน 0.05 กรัม ชั่งน้ำหนักของของแข็งที่เหลืออยู่ คำนวณน้ำหนักของน้ำที่หายไปและคำนวณหา % ความชื้นได้ ดังนี้

$$\%\text{ความชื้น} = \frac{\text{น้ำหนักที่หายไป}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างที่ใช้}} \times 100$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.5.7 การวิเคราะห์หาปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์ตกค้างที่เปลือกลำไย

ทำการวิเคราะห์ตามวิธีของ Optimized Monier – Williams

หลักการวิเคราะห์

เป็นการกลั่นแบบ reflux โดยให้กรดไฮโดรคลอริกทำปฏิกิริยากับสารประกอบของซัลเฟอร์ไดออกไซด์ที่อยู่ในอาหาร ให้ได้ก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ในรูปอิสระออกมา และใช้ก๊าซไนโตรเจนซึ่งเป็นก๊าซเฉื่อยเป็นตัวพาซัลเฟอร์ไดออกไซด์ออกมาเก็บในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เกิดเป็นกรดซัลฟิวริก

ขั้นตอนการไทเทรตเป็นการนำกรดซัลฟิวริกที่ได้จากการกลั่นไปหาความเข้มข้น โดยไทเทรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ โดยมีฟีนอลเรดเป็นอินดิเคเตอร์

การเตรียมสารละลาย

ก) สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ เตรียมโดยชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์จำนวน 4 กรัม ละลายน้ำกลั่น ใส่ในขวดปริมาตรขนาด 1,000 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น นำสารละลายด่างที่ได้ไปเปรียบเทียบความเข้มข้นกับสารละลายมาตรฐาน potassium hydrogen phthalate ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล เพื่อหาความเข้มข้นที่แท้จริงของสารละลายด่าง

ข) สารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 4 โมลาร์ เตรียมโดยตวงสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 37% ปริมาตร 662 มิลลิลิตร ค่อยๆ รินกรดลงในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 2,000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

ค) สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 3% เตรียมโดยนำไฮโดรเจนเปอร์-ออกไซด์ความเข้มข้น 30% (hydrogen peroxide 30%, Merck; Germany) จำนวน 100 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปริมาตร 1,000 มิลลิลิตรปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

ง) สารละลายเมทิลเรดความเข้มข้น 0.25% โดยชั่งสารเมทิลเรด (methyl red, AR grade, Merck; Germany) จำนวน 0.25 กรัม ละลายในเอทานอล 95% แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตรด้วยเอทานอล 95% (ethanol 95%, AR grade, Baker; USA.)

จ) สารละลายเอทานอลความเข้มข้น 5% โดยนำเอทานอล 95% จำนวน 105 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปริมาตรขนาด 2,000 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำกลั่น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีวิเคราะห์

ชั่งน้ำหนักเปลือกลำไย 30 กรัมใส่ในเครื่องปั่น (Blender, National; Model MX–T2GN Japan) เติมสารละลายเอทานอล 5% ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใส่ในเครื่องปั่น ปั่นรวมกันนาน 15 วินาที นำตัวอย่างเปลือกลำไยที่ปั่นละเอียดแล้วใส่ในขวด 3 คอทางท่อหลอดเก็บตัวอย่างอาหาร พร้อมกับเติมน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร และสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 4 โมลาร์ จำนวน 90 มิลลิลิตรลงไป จากนั้นเติมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 3% จำนวน 50 มิลลิลิตร และสารละลายเมทิลเรด 1–2 หยดลงในหลอดเก็บสารละลายที่กลั่นได้ และนำไปไทเทรตกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์จนสารละลายมีสีเหลือง สวมท่อก๊าซไนโตรเจนที่ท่อต่อก๊าซไนโตรเจนปรับอัตราการไหลของก๊าซให้อยู่ในระดับ 200 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจดูข้อต่อต่างๆให้แน่นเพื่อป้องกันการสูญเสียก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ขณะกลั่น เปิดเตาให้ความร้อน (heating mantle, Whatman®; Model HMFT England) เพื่อทำการกลั่น ประมาณ 1 ชั่วโมง 50 นาที ถ้าตัวอย่างมีซัลเฟอร์ไดออกไซด์สารละลายในหลอดเก็บสารละลายจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีชมพู เมื่อกลั่นจนครบ 1 ชั่วโมง 50 นาทีแล้วให้ปิดเตาและนำท่อก๊าซไนโตรเจนออก นำสารละลายในหลอดเก็บสารละลายไปไทเทรตกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์จนสารละลายมีจุดยุติเป็นสีเหลือง บันทึกปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ แล้วคำนวณหาปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์

$$\text{ปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (ppm)} = \frac{32.03 \times V \times M \times 1000}{W}$$

เมื่อ 32.03 = น้ำหนักกรัมสมมูลของซัลเฟอร์ไดออกไซด์

V = ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ (มิลลิลิตร)

M = จำนวนโมลของโซเดียมไฮดรอกไซด์ (โมลาร์)

W = น้ำหนักตัวอย่างที่ใช้ (กรัม)

3.5.8 การวิเคราะห์หาปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์ตกค้างที่เนื้อลำไย

ทำการวิเคราะห์ตามวิธีของ Optimized Monier – Williams โดยชั่งน้ำหนักเนื้อลำไย 100 กรัมแล้วทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับการวิเคราะห์หาปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์ตกค้างที่เปลือกลำไยตามข้อ 3.5.7

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.5.9 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส

ดัดแปลงวิธีวิเคราะห์จากวิธีการของ Jiang (1999)

หลักการวิเคราะห์

$$\text{catechol} + O_2 \longrightarrow \text{4-methyl-o-benzoquinone}$$

ซึ่งปฏิกิริยานี้จะถูกกระตุ้นโดยเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส

การเตรียมสารละลาย

ก) สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 6.4

- เตรียมสารละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ โดยชั่งโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (sodium dihydrogen phosphate dihydrate, AR grade, Fisher; England) น้ำหนัก 15.6010 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตรโดยใช้ขวดปรับปริมาตร

- เตรียมสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ โดยชั่งไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (disodium hydrogen orthophosphate anhydrous, AR grade, Fisher; England) น้ำหนัก 8.8995 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 500 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดปรับปริมาตร

เตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 6.4 โดยนำสารละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 735 มิลลิลิตร เติมสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 265 มิลลิลิตร ปรับพีเอชของสารละลายผสมให้ได้เท่ากับ 6.4

ข) สารละลาย Catechol ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

เตรียมโดยชั่ง catechol (catechol, AR grade, Fluka; Swizerland) น้ำหนัก 5.5050 กรัม ละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1โมลาร์ พีเอช 6.4 ปรับปริมาตรให้ครบ 250 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การสกัดเอนไซม์

สกัดเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยนำเปลือกลำไยจำนวน 3 กรัมจากลำไย 6 ผล บดให้ละเอียดในโกร่งที่แช่เย็น เติมสารละลายสกัด (extraction solution) ในอัตราส่วนปริมาตรสารละลายสกัดต่อน้ำหนักเปลือกของผลลำไย เท่ากับ 8 : 1 ซึ่งสารสกัดนี้ประกอบด้วยสารละลาย

ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 6.4 และ Polyvinyl pyrrolidone (polyvinyl – pyrrolidone K30, AR grade, Fluka; USA.) 1% บดให้เข้ากันอีกครั้งและปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร เก็บไว้ค้างคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วปั่นตัวอย่างให้ตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge, Hettich; Rotina 46R Germany) ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ภายหลังการหมุนเหวี่ยงนำเฉพาะของเหลวใส (supernatant) ซึ่งเป็น crude enzyme ไปใช้ในการวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ และปริมาณโปรตีน

การวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์

การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์ (assay mixture) โดยปิเปตสารละลาย catechol ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1โมลาร์ พีเอช 6.4 มาปริมาตร 3 มิลลิลิตร จากนั้นเติม crude enzyme ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงใน Cuvette tube ผสมให้เข้ากัน แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโทมิเตอร์ (ThermoSpectronic, Biomate5; USA.) ที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงทุกๆ 30 วินาที เป็นเวลา 5 นาที นำค่าที่วัดได้ เขียนกราฟระหว่างระยะเวลากับค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสที่มีอยู่ในตัวอย่างในช่วงกราฟที่มีความชันเป็นเส้นตรง

กำหนดให้กิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส 1 หน่วย เท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร เพิ่มขึ้น 0.001 หน่วย ในเวลา 1 นาที ที่ค่าพีเอช 6.4 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แล้วคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส เป็นจำนวนหน่วยต่อนาทีต่อมิลลิกรัมของโปรตีน

3.5.10 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford Protein Assay (Bradford, 1976)

การเตรียมสารละลาย

ก) สารละลายโปรตีนมาตรฐานความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เตรียมโดยชั่งสารโปรตีน BSA (Bovine serum albumin, Fluka; Swizerland) น้ำหนัก 0.005 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดปรับปริมาตร แล้วนำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 0, 5, 10, 20, 30, 40 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ข) สารละลายสีย้อม

เตรียมโดยชั่ง coomassie brilliant blue G-250 (coomassie brilliant blue G-250, AR grade,

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

Sigma; USA.) ละลายในเอทานอล 99.5% (ethanol 95%, AR grade, Baker; USA.) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร เติมกรดฟอสฟอริกความเข้มข้น 85% (phosphoric acid, AR grade, Merck; Germany) ลงไป 50 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น โดยใช้ขวดปรับปริมาตร

การสร้างกราฟมาตรฐานโปรตีน

ปิเปตสารละลายโปรตีนมาตรฐานความเข้มข้น 0, 5, 10, 20, 30, 40 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ มาอย่างละ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองความเข้มข้นละ 3 หลอด ส่วนหลอดที่ความเข้มข้น 0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเป็น blank ทำเพียงหลอดเดียว รวมเป็น 19 หลอด จากนั้นเติมสารละลายสีย้อมปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโทมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนกับค่าการดูดกลืนแสง โดยให้แกน x เป็นปริมาณความเข้มข้นของ BSA (ไมโครกรัม) ส่วนแกน y เป็นค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

นำสารละลาย crude enzyme ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายสีย้อมปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน วางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 นาที แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโทมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเปรียบเทียบหาระดับความเข้มข้นของโปรตีนจากกราฟมาตรฐาน (ภาพที่ 3.1)

การคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์

ก) วิธีคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส

กำหนดให้กิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส 1 หน่วย เท่ากับ ปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร เพิ่มขึ้น 0.001 หน่วย ในเวลา 1 นาที ที่ค่าพีเอช 6.4 จะได้กิจกรรมของเอนไซม์ เท่ากับ A หน่วย

สารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้ 0.1 มิลลิลิตร มีกิจกรรม เท่ากับ A หน่วย
สารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้ 1 มิลลิลิตร มีกิจกรรม เท่ากับ A / 0.1 หน่วย = B หน่วย
แสดงว่าสารละลายเอนไซม์มีกิจกรรมของเอนไซม์ เท่ากับ B หน่วย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ข) วิธีการคำนวณหาปริมาณของโปรตีน

นำค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้จากเครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ไปเปรียบเทียบหาปริมาณโปรตีนจากกราฟโปรตีนมาตรฐาน

สารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้ 1000 ไมโครลิตร มีโปรตีนที่ละลายได้ C ไมโครกรัม

สารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้ 1 ไมโครลิตร มีโปรตีนที่ละลายได้ C / 1000 ไมโครกรัม = D

แสดงว่าสารละลายเอนไซม์มีโปรตีน เท่ากับ D ไมโครกรัม / ไมโครลิตร

หรือ เท่ากับ D มิลลิกรัมกรัม / มิลลิลิตร

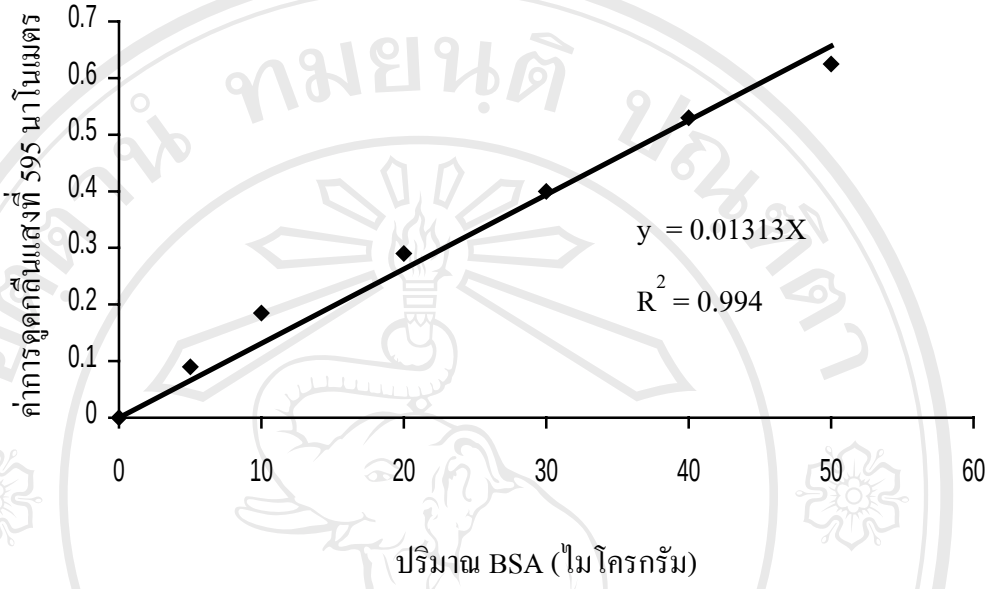
ค) วิธีคำนวณหา specific activity ของเอนไซม์

$$\text{specific activity ของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส} = \frac{\text{กิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส}}{\text{ปริมาณโปรตีนในหน่วยมิลลิกรัม}}$$

$$= B / D$$

ค่า specific activity ของเอนไซม์มีหน่วยเป็น หน่วย / นาที/ มิลลิกรัมของโปรตีน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 3.1 กราฟมาตรฐานโปรตีน

3.5.11 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด

ดัดแปลงวิธีวิเคราะห์จากวิธีการของ Hyodo *et al* .(1978) และ Ketsa and Atantee (1998)

การเตรียมสารละลาย

ก) สารละลายฟีนอลมาตรฐานความเข้มข้น 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมโดยชั่งสาร gallic acid (gallic acid, AR grade, Merck; Germany) น้ำหนัก 0.04 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดปรับปริมาตร แล้วนำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 และ 100ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ข) สารละลายเอทานอลความเข้มข้น 80% เตรียมโดยตวงเอทานอล 99.5% (ethanol 95%, AR grade, Baker; USA.) ปริมาตร 800 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 998 มิลลิลิตร

ค) สารละลาย Folin – Ciocaltea Reagent ความเข้มข้น 10% เตรียมโดยตวง Folin –

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Ciocaltea reagent (Folin –Ciocaltea reagent, AR grade, Merck; Germany) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดปรับปริมาตร

ง)สารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 7.5% เตรียมโดยชั่งโซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbornate anhydrous, AR grade, Fisher; England) น้ำหนัก 75 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดปรับปริมาตร

การสร้างกราฟมาตรฐานฟีนอล

ปิเปตสารละลายฟีนอลมาตรฐานความเข้มข้น 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ มาอย่างละ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองความเข้มข้นละ 3 หลอด ส่วนหลอดที่ความเข้มข้น 0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็น blank รวมเป็น 19 หลอด จากนั้นเติมสารละลาย Folin – Ciocaltea Reagent ความเข้มข้น 10% ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 8 นาที จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 7.5% ปริมาตร 4 มิลลิลิตรลงไป ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโทมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณ gallic acid กับค่าการดูดกลืนแสง โดยให้แกน x เป็นปริมาณความเข้มข้น ของ gallic acid (ไมโครกรัม) ส่วนแกน y เป็นค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร

การสกัดสารประกอบฟีนอลจากเปลือก

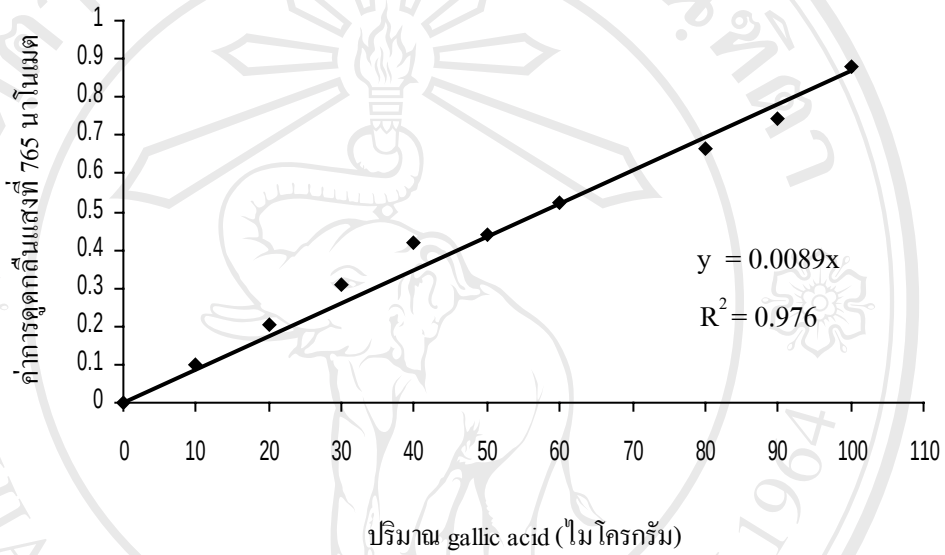
โดยนำเปลือกผลลำไยจำนวน 3 กรัม จากลำไย 6 ผล บดให้ละเอียดในโกร่งที่แช่เย็น เติมสารละลายเอทานอล ความเข้มข้น 80% ที่เย็นลงไปปริมาตร 12 มิลลิลิตร แล้วนำตัวอย่างให้ตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ภายหลังการหมุนเหวี่ยงนำเฉพาะของเหลวใสไปวัดปริมาณทั้งหมด และใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด

นำของเหลวใสที่สกัดได้มาเจือจางลง 10 เท่า และนำสารละลายที่เจือจางแล้วมา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลาย Folin – Ciocaltea Reagent ความเข้มข้น 10% ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 8 นาที จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 7.5% ปริมาตร 4 มิลลิลิตรลงไป ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง นำ

ไปวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโทมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปเปรียบเทียบหาปริมาณของสารประกอบฟีนอลจากกราฟมาตรฐาน (ภาพที่ 3.2)



ภาพที่ 3.2 กราฟมาตรฐานสารประกอบฟีนอล

การคำนวณหาสารประกอบฟีนอลทั้งหมด

นำค่าที่อ่านได้จากสารประกอบฟีนอลมาตรฐานที่เตรียมไว้ในขั้นตอนการสร้างกราฟมาตฐานมาคำนวณหาสูตรสมการเส้นตรง ได้ดังนี้

$y = 0.0089 x$

โดย y คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้

x คือ ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดในเปลือกลำไย (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

จากนั้นนำค่า xที่อ่านได้ มาคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดในเปลือกกลำไย

สารละลายปริมาตร 1 มิลลิลิตร มีสารประกอบฟีนอลทั้งหมด x มิลลิกรัม

สารประกอบฟีนอลได้มาจากการเจือจาง 10 เท่าโดยปริมาตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

แสดงว่าสารละลายมีสารประกอบฟีนอลทั้งหมด $x \times 10$ มิลลิกรัม / มิลลิลิตร $= Y$

สารที่สกัดได้มีปริมาตรเฉลี่ย a มิลลิลิตร

แสดงว่าสารละลายมีสารประกอบฟีนอลทั้งหมด $Y \times a$ มิลลิกรัม $= Z$

สารประกอบฟีนอลได้มาจากตัวอย่างเปลือกลำไย 3 กรัม

เปลือกลำไย 3 กรัม มีสารประกอบฟีนอลทั้งหมด Z มิลลิกรัม

เปลือกลำไย 1 กรัม มีสารประกอบฟีนอลทั้งหมด $Z / 3$ มิลลิกรัม

รายงานผลสารประกอบฟีนอลทั้งหมดในหน่วย มิลลิกรัม / กรัมน้ำหนักสด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved