บทที่ 3
อุปกรณ์ สารเคมีและวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์

1. Freeze dry vacuum (LABCONCO : Freeze drying system/Free zone 4.5, USA)
2. Hot air oven (Memmert : UE 400, Germany)
3. Differential Scanning Calorimeter (Perkin Elmer : Daimond DSC, USA)
4. Water activity meter (Aqua Lab : Series3, USA)
5. Color meter (Minolta : CR-300, Japan)
6. Centrifuge (Heraeus : Megafuge 1.0R, Germany)
7. Incubator (Heraeus : B 6000 series, Germany)
8. UV/VIS spectrometer (Agilent : 8453, Germany)
9. ICP-MS (Perkin Elmer : 4300 DV, Japan)
10. Electronic balance (Mettler-Toledo : AB204-S, Switzerland)

3.2 สารเคมี

1. Maltodextrin DE 11 (Biochemika grade : Fluka, Germany)
2. Maltodextrin DE 18 (Biochemika grade : Fluka, Germany)
3. Lithium Chloride (LiCl) (Laboratory : Ajax Finechem, Australia)
4. Potassium Acetate (CH_3COOK) (Laboratory : Ajax Finechem, Australia)
5. Magnesium Chloride ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) (Laboratory : Ajax Finechem, Australia)
6. Potassium Carbonate (K_2CO_3) (Laboratory : Ajax Finechem, Australia)
7. Magnesium Nitrate ($Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$) (Laboratory : Ajax Finechem, Australia)
8. Sodium Chloride (NaCl) (Laboratory : Ajax Finechem, Australia)
9. Potassium Chloride (KCl) (Laboratory : Ajax Finechem, Australia)
10. Potassium Iodide (KI) (Laboratory : Ajax Finechem, Australia)
11. Potassium Nitrate (KNO_3) (Laboratory : Ajax Finechem, Australia)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

12. Sodium Hydroxide (NaOH) (AR grade : MERCK, Germany)
13. Hydro Chloric acid (HCl) (AR grade : MERCK, Germany)
14. Nitric acid (HNO_3) (AR grade : MERCK, Germany)
15. Hydrogenperoxide (H_2O_2) (AR grade : MERCK, Germany)
16. Potassium Hexacyanoferrate(II)-3- Hydrate ($K_4Fe(CN)_6 \cdot H_2O$) (AR grade : Riedel-de Haen, Germany)
17. Zinc Sulfate ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) (AR grade : AnalaR, England)
18. Copper (II) Sulfate pentahydrate ($CuO_4S \cdot 5H_2O$) (AR grade : MERCK, Germany)
19. Potassium sodium tartard tetrahydrate ($C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$) (AR grade : MERCK, Germany)
20. phenolphthalein indicator (AR grade : MERCK, Germany)
21. P-toluidine (AR grade : Fluka, Germany)
22. Barbituric acid (AR grade : MERCK, Germany)

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การเตรียมตัวอย่างน้ำผึ้งผงด้วยวิธีทำแห้งแบบเยือกแข็ง

เติมมอลโทเด็กซ์ทรินในตัวอย่างน้ำผึ้งดอกลำไยจากบริษัท บีโปรดักส์ จำกัด (อายุการเก็บ ณ วันที่วิเคราะห์ : 45 วัน) ในสัดส่วน 30, 40 และ 50% ของของแข็งทั้งหมดในน้ำผึ้ง โดยศึกษาการใช้มอลโทเด็กซ์ทรินที่มีค่า DE 2 ระดับ คือ DE 11 และ DE 18 จากนั้นนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20°C เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง (Miao and Roos, 2006) จากนั้นนำไปทำให้แห้งแบบแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -45°C ภายใต้สภาวะสุญญากาศที่ความดัน $<133x10^{-3}$ mbar เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง นำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาบดให้ละเอียด และทำการบรรจุลงขวดสีชา เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะทำการวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ วางแผนการทดลองแบบ Factorial in Completely Randomize Design (Factorial in CRD)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3.2 ศึกษาผลของระดับของ DE และปริมาณของมอลโทเด็กซ์ทรินที่มีต่อคุณภาพของน้ำผึ้งผง

3.3.2.1 ศึกษาสมบัติทางเคมี

(1) วิเคราะห์ค่า a_w

นำน้ำผึ้งผงมาวิเคราะห์ค่า a_w โดยใช้น้ำผึ้งผงใส่ในตลับให้มีปริมาณของ น้ำผึ้งผง 3 ใน 4 ของตลับ จากนั้นนำตลับที่มีน้ำผึ้งผงเข้าไปวัดค่า a_w ในเครื่องวัดค่า a_w ที่อุณหภูมิห้อง (Chirife *et al*., 2006)

(2) วิเคราะห์ค่าปริมาณความชื้น

นำน้ำผึ้งผงมาวิเคราะห์ปริมาณความชื้น โดยดัดแปลงวิธีวิเคราะห์จากวิธีของ AOAC (2000) คือ ใช้น้ำผึ้งผงปริมาณประมาณ 2-5 g ใส่ใน aluminium can ที่อบและชั่งน้ำหนักก่อนอบ นำเข้าไปอบใน hot air oven ที่อุณหภูมิ 101°C โดยอบเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง นำออกมาทำให้เย็นใน dessicator เป็นเวลา 30-45 นาที ชั่งน้ำหนักหลังอบ คำนวณหาปริมาณความชื้น ดังแสดงในภาคผนวก ก-1 (ภาคผนวก ก)

(3) วิเคราะห์ลักษณะ Sorption isotherm

นำน้ำผึ้งผงมาวิเคราะห์ลักษณะ sorption isotherm โดยใช้วิธีของ Debnath *et al*. (2002) โดยเก็บตัวอย่างน้ำผึ้งผงใน dessciator ที่มีการควบคุมความชื้นสัมพัทธ์ภายในภาชนะด้วยสารละลายเกลืออิ่มตัว ศึกษาที่ระดับความชื้นสัมพัทธ์ (RH) ช่วง 0.1-0.9 โดยใช้สารละลายเกลือ คือ LiCl, CH_3COOK, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, K_2CO_3, $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$, $NaNO_2$, NaCl, KCl และ KNO_3 ตามลำดับ เมื่อน้ำผึ้งผงปรับเข้าสู่สภาวะสมดุล (ใช้เวลาประมาณ 1 สัปดาห์) จึงนำตัวอย่างไปวิเคราะห์ความชื้น โดยสร้าง sorption isotherm จากความสัมพันธ์ของความชื้น และ a_w เท่ากับ RH/100 ที่สภาวะสมมูล

3.3.2.2 ศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพ

(1) วิเคราะห์ค่า T_g

นำน้ำผึ้งผงมาวิเคราะห์ค่า T_g ตามวิธีของ Silva *et al*. (2006) โดยใช้ปริมาณ 10-20 mg ใส่ใน aluminium pan นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง DSC โดยกำหนดให้อุณหภูมิคงที่ที่ 25°C เป็นเวลา 10 นาที ทำให้ตัวอย่างเย็นลงจาก 25°C ไปจนถึง -80°C ในอัตรา 40°C/min จากนั้น คงอุณหภูมิไว้ที่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

-80°C เป็นเวลา 5 นาที และให้ความร้อนจากอุณหภูมิ -80°C จนถึง 80°C ในอัตรา 10°C/min วิเคราะห์ค่า T_g จาก thermogram โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปของ DSC วิเคราะห์ตัวอย่าง 2 ซ้ำ

(2) วิเคราะห์ค่าสีโดยใช้ระบบ CIE L* a* b*

นำน้ำผึ้งผงมาวิเคราะห์ค่าสีระบบ CIE L* a* b* (Commission International de I' Eclairage) โดยอ้างอิง และดัดแปลงเล็กน้อยจากวิธีของ Fernandez (2003) โดยนำตัวอย่างมาวิเคราะห์ด้วยเครื่องวัดค่าสี Minolta (CR-300, Japan) ระบบ CIE L* a* b*

(3) วิเคราะห์ความสามารถในการละลาย

นำน้ำผึ้งผงมาวิเคราะห์ค่าความสามารถในการละลายโดยใช้วิธีของ Shittu and Lawal (2007) ใช้ปริมาณประมาณ 5 g ใส่ใน centrifuge tube เติมน้ำ 50 mL ผสมให้ละลายที่อุณหภูมิ 30°C แล้วนำไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 rpm นาน 10 นาที เทของเหลวส่วนที่ใส (supernatant) ใส่ใน aluminium can อบที่อุณหภูมิ 105°C เวลานาน 24 ชั่วโมง คำนวณหาความสามารถในการละลาย (%) ดังแสดงในภาคผนวก ก-2 (ภาคผนวก ก)

(4) วิเคราะห์ค่าความสามารถในการไหล โดยใช้วิธีวัดมุมกอง

นำน้ำผึ้งผงมาวิเคราะห์ค่าความสามารถในการไหลด้วยวิธีวัดมุมกองตามวิธีของ Shittu and Lawal (2007) โดยใส่ลงไปใน cylinder ขนาด 250 mL โดยให้ตัวอย่างมีปริมาณอยู่ที่จุด 200 mL ปิดฝาให้สนิท นำไปแขวนไว้ที่ชุดขาตั้ง หมุนคว่ำ cylinder ให้ส่วนปลาย cylinder อยู่ห่างสูงจากพื้น 20 cm เปิดฝาออกปล่อยให้ตัวอย่างไหลตกตามแรงโน้มถ่วงจนหมด คำนวณหาค่ามุมกอง (θ) ดังแสดงในภาคผนวก ก-3 (ภาคผนวก ก)

วิเคราะห์ 3 ซ้ำ หาค่าเฉลี่ยและวิเคราะห์ความแปรปรวนข้อมูลโดยใช้ ANOVA (analysis of variance) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยในแต่ละสิ่งทดลองโดยวิธี Duncan's New multiple Range Test

3.3.2.3 ศึกษาสมบัติทางประสาทสัมผัส

ศึกษาการยอมรับทางประสาทสัมผัสด้วยวิธี nine point hedonic scale test โดยเตรียมตัวอย่างน้ำผึ้งผงชงละลายน้ำในอัตราส่วนน้ำผึ้งผง 2 g ต่อน้ำ 10 mL (กระทรวงอุตสาหกรรม, 2530) โดยใช้น้ำที่อุณหภูมิ 30°C ใช้ผู้ทดสอบจำนวน 50 คน ทดสอบการยอมรับทางด้านสี กลิ่น รสหวาน ความเป็นเนื้อเดียว และความชอบโดยรวม โดยให้คะแนนระดับความชอบจากตัวเลข 1 ถึง 9 โดยระดับ 1 หมายถึง ไม่ชอบเลย จนถึงระดับ 9 หมายถึงชอบมากที่สุด วิเคราะห์ผลทางสถิติหา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ค่าเฉลี่ยและวิเคราะห์ความแปรปรวนข้อมูลโดยใช้ ANOVA (analysis of variance) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยในแต่ละสิ่งทดลองโดยวิธี Duncan's New multiple Range Test

3.3.3 การคัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมต่อการแห้งแบบแช่เยือกแข็งของน้ำผึ้งผสมมอลโทเด็กซ์ทริน

นำผลจากการวิเคราะห์ทางสถิติในแต่ละการทดลองจากข้อ 3.3.2 มาคัดเลือกหาสภาวะที่มีสมบัติที่เหมาะสมที่สุด โดยพิจารณาดังต่อไปนี้คือ ค่า a_w ความชื้น และความสามารถในการไหลที่มีค่าต่ำที่สุด สำหรับค่า T_g ความสามารถในการละลาย และการยอมรับทางประสาทสัมผัสที่มีค่าสูงที่สุด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ส่วน sorption isotherm พิจารณาจากความสัมพันธ์ของความชื้น และ a_w ที่มีความชื้นต่ำสุดในแต่ละระดับความชื้นสัมพัทธ์ช่วง a_w 0.1-0.9

3.3.4 ศึกษาทางคุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่มีระดับมอลโทเด็กทรินซ์ที่เหมาะสมและยอมรับที่สุด

3.3.4.1 ศึกษาคุณภาพทางจุลชีววิทยา

(1) จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (Total bacteria count)

นำตัวอย่างที่ได้จากขั้นตอน 3.3.3 มาวิเคราะห์หาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด โดยใช้ตัวอย่าง 1 g เติม butterfield's phosphate-buffered dilution water (BPB) 9 mL ตัวอย่างที่ได้จะมีความเจือจาง 10^{-1} ทำการเจือจางตัวอย่างเป็น 10^{-2} และ 10^{-3} หรือความเจือจางที่เหมาะสม ดูดตัวอย่างทดสอบ 1 mL จากการเจือจางที่เหมาะสม ใส่ลงบนจานเพาะเชื้อ เทอาหาร plate count agar (PCA) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่อยู่ในช่วง 25-250 cfu/g (BAM, 2001)

(2) จำนวนแบคทีเรียโคลิฟอร์ม

นำตัวอย่างที่ได้จากขั้นตอน 3.3.3 มาวิเคราะห์หาจำนวนแบคทีเรียโคลิฟอร์มโดยใช้ตัวอย่าง 1 g เติม butterfield's phosphate-buffered dilution water (BPB) 9 mL ตัวอย่างที่ได้จะมีความเจือจาง 10^{-1} ทำการเจือจางตัวอย่างเป็น 10^{-2} และ 10^{-3} ดูดตัวอย่างเจือจางที่10^{-1}, 10^{-2} และ 10^{-3} มา 1 mL ลงใน อาหาร lauryl tryptose broth (LST) การเจือจางละ 3 หลอด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำหลอดที่มีฟองแก๊สในหลอดดักแก๊สและอาหารขุ่นมาทำการทดสอบการยืนยันผลหาแบคทีเรียโคลิฟอร์มโดยถ่ายเชื้อ 1 loop จากหลอด LST ที่มีแก๊สลงในอาหาร brilliant green lactose bile (BGLB) broth 2% ตรวจสอบหลอดที่มีแก๊สในหลอดดักแก๊สของอาหาร BGLB แสดงว่าหลอดนั้นตรวจพบแบคทีเรียโคลิฟอร์ม นับจำนวนหลอดของแต่ละความเข้มข้นที่ตรวจ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

พบแบคทีเรียโคลิฟอร์ม จากนั้นไปเทียบกับตาราง MPN 3:3:3 ดังแสดงในตารางภาคผนวก ข-8 (BAM, 2002)

(3) จำนวนยีสต์ และรา

นำตัวอย่างที่ได้จากขั้นตอน 3.3.3 มาวิเคราะห์หาจำนวนยีสต์ และรา โดยใช้ตัวอย่าง 1 g เติม peptone dilution water ตัวอย่างที่ได้จะมีความเจือจาง 10^{-1} ทำการเจือจางตัวอย่างเป็น 10^{-2} และ 10^{-3} หรือความเจือจางที่เหมาะสม ดูดตัวอย่างทดสอบ 1 mL จากการเจือจางที่เหมาะสม ใส่ลงบนจานเพาะเชื้อ เทอาหาร dichloran 18% glycerol (DG18) agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 5 วัน นับจำนวนโคโลนีที่อยู่ในช่วง 10-150 cfu/g (BAM, 2001)

3.3.3.2 ศึกษาคุณภาพทางเคมี

(1) การวิเคราะห์ Reducing Sugar

นำตัวอย่างที่ได้จากขั้นตอน 3.3.3 มาวิเคราะห์ค่า reducing sugar โดยวิธีของ AOAC (2000) ใช้ตัวอย่าง 2 g ใส่ลงใน ขวดวัดปริมาตรขนาด 250 mL และเติมน้ำกลั่น 2 ใน 3 ส่วนของปริมาตร เติม Carrez I และ Carrez II อย่างละ 5 mL หลังจากนั้นเขย่าให้เข้ากัน และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 41 นำส่วนที่กรองได้ 20 - 50 mL ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 100 mL ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 mL ปิเปตมา 20–50 mL 4 เติม Fehling's solution 50 mL และเติมน้ำกลั่น ให้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 100 mL ปิดฝาด้วยกระจกนาฬิกาและนำไปวางบนเตาไฟฟ้า กรองผ่าน crucible ภายในใส่กระดาษกรองเบอร์ GF/A ใช้ suction flask และล้างตะกอนของ cuprous oxide ด้วยน้ำร้อน จากนั้นล้างด้วย ethanol 10 mL อบ crucible ในตู้อบที่ 103°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นและชั่งน้ำหนักจดบันทึก คำนวณค่า reducing sugar ในรูปของ invert sugar (g/100 g) ดังแสดงในภาคผนวก ก-4

(2) การวิเคราะห์ Acidity

นำตัวอย่างที่ได้จากขั้นตอน 3.3.3 มาวิเคราะห์ค่า acidity โดยใช้ตัวอย่าง 10 g เติม น้ำกลั่นที่ผ่านการต้ม หยด phenolphthalein indicator 2-3 หยด นำไปปั่นด้วย magnetic stirrer วัดค่า pH ทำการไตเตรตด้วย 0.05 M NaOH จนได้ pH 8.5 เติม 0.05 M NaOH ลงไป 10 mL ทำการไตเตรตกับ 0.05 M HCl จนได้ pH เท่ากับ 8.3 บันทึกปริมาตร 0.05 M HCl ที่ใช้ในการไตเตรต คำนวณค่า acidity ในรูป milliequivalent/kg ดังแสดงในภาคผนวก ก-5 (AOAC, 2000)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(3) การวิเคราะห์ Hydroxymethylfurfural

นำตัวอย่างที่ได้จากขั้นตอน 3.3.3 มาวิเคราะห์ค่า hydroxymethylfurfural โดยใช้ตัวอย่าง 10 g เติมน้ำกลั่น 20 mL แล้วเทใส่ Volumetric flask ขนาด 50 mL ปรับปริมาตรจนครบ 50 mL ด้วยน้ำกลั่น ดูดมา 2 mL เติม 5 mL P-toluidine และ 1 mL Barbituric acid ตามลำดับลงในหลอดทดลองผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่า absorbance ด้วยเครื่อง UV/VIS spectrometer ทันทีที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร คำนวณหาค่า hydroxymethylfurfural ดังแสดงในภาคผนวก ก-6 (กระทรวงอุตสาหกรรม, 2539)

(4) การวิเคราะห์สารหนู (Arsenic : As)

นำตัวอย่างที่ได้จากขั้นตอน 3.3.3 มาวิเคราะห์ปริมาณสารหนู โดยใช้ตัวอย่าง 1 g เติมกรดไนตริกเข้มข้น 5 mL และเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 1 mL นำไปต้มบน hot plate ให้เหลือปริมาตรน้อยที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้ก่อนเกิดการตกตะกอน ล้างด้วย DI water กรองสารละลายถ้ามีตะกอน ถ่ายสารละลายที่กรองแล้วใส่ขวดปริมาตรขนาด 25 mL ชะด้วย DI water 2 ครั้ง ใส่ในขวดปริมาตร ทิ้งให้เย็น เจือจางจนถึงขีดปริมาตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวิเคราะห์ปริมาณสารหนูด้วยเครื่อง Inductively Coupled Plasma-Mass Spectroscopy (ICP-MS) (AOAC, 2000)

(5) การวิเคราะห์สารตะกั่ว (Lead : Pb)

นำตัวอย่างที่ได้จากขั้นตอน 3.3.3 มาวิเคราะห์ปริมาณสารตะกั่ว โดยใช้ตัวอย่าง 1 g เติมกรดไนตริกเข้มข้น 5 mL และเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 1 mL นำไปต้ม บน hot plate ให้เหลือปริมาตรน้อยที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้ก่อนเกิดการตกตะกอน ล้างด้วย DI water กรองสารละลายถ้ามีตะกอน ถ่ายสารละลายที่กรองแล้วใส่ขวดปริมาตรขนาด 25 mL ชะด้วย DI water 2 ครั้งใส่ในขวดปริมาตร ทิ้งให้เย็น เจือจางจนถึงขีดปริมาตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวิเคราะห์ปริมาณสารตะกั่วด้วยเครื่อง Inductively Coupled Plasma-Mass Spectroscopy (ICP-MS) (AOAC, 2000)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved