

บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

3.1.1 วัสดุดิบ

1. มะนาวพันธุ์เป็นอายุ 14–15 สัปดาห์ จากสวนเทพรรษา ตำบลตะลุง อำเภอเมือง จังหวัดลพบุรี ผลมะนาวจะต้องมีเปลือกสีเขียว เส้นผ่านศูนย์กลางของผลในแนวนอน 5-6 เซนติเมตร และในแนวตั้ง 4-5 เซนติเมตร (ภาคผนวก ก.)

3.1.2 สารเคมี

1. สารลิโมนินมาตรฐาน (Standard limonin) (Limonin; HPLC grade, SIGMA, USA.)
2. วิตามินซีมาตรฐาน ชนิดใช้สำหรับการวิเคราะห์ (Ascorbic acid; AR grade, SIGMA, USA.)
3. แอซีโตนไทรล์ ชนิดใช้สำหรับการวิเคราะห์ (Acetonitrile; CH₃CN, HPLC Grade LAB SCA, Thailand.)
4. เททระไฮโดรฟูแรน ชนิดใช้สำหรับการวิเคราะห์ (Tetrahydrofuran; C₄H₈O, HPLC Grade, LAB SCAN, Thailand.)
5. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 N (0.1 N NaOH, J.T.Baker, USA.)
6. เมทานอล ชนิดใช้สำหรับการวิเคราะห์ (Methanol; CH₃OH, HPLC Grade, LAB SCAN, Thailand.)
7. ไอโอดีน (Iodine; I₂, AR grade, Ajax Finechem, Thailand.)
8. โพแทสเซียมไอโอไดด์ (Potassium iodide; KI, AR grade, Ajax Finechem, Thailand.)
10. กรดซัลฟิวริกเข้มข้น (Sulfuric acid concentrate; H₂SO₄, AR grade, LAB SCAN, Thailand.)
12. เฮกเซน (Hexane; C₆H₁₄, HPLC grade, LAB SCAN, Thailand.)

3.1.3 อุปกรณ์

3.1.3.1 อุปกรณ์ในการลวกมะนาว เตรียมน้ำมะนาว และเปลือกมะนาว

1. ที่บีบน้ำมะนาวแบบบีบกด (Juice extractor)(ภาคผนวก ก.)
2. เทอร์โมมิเตอร์
3. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath, Memmert: Model WB14, Germany)
4. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Electronic analytical balance , Sartorius : A120S, Germany)
5. เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงพร้อมทำความเย็น (Centrifuge High speed Refrigerated, Andreas Hettich, Universal 32 R, Germany.)
6. เครื่องวัดปริมาตรแบบอัติโนมติ 100-1000 ไมโครลิตร (Micropipete Set accuracy ± 0.5 , Brand GmbH Co., Ltd.)
7. เครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary Evaporation Buchi Labortechnik AG, Germany.)
8. อ่างน้ำแข็ง
9. ขวดเก็บตัวอย่างสีชา ฝาเกลียว ขนาดจุ 7.5 มิลลิลิตร.
10. อุปกรณ์เครื่องแก้ว
11. เครื่องครัวที่จำเป็น เช่น มีด เขียง หม้อเสตนเลส

3.1.3.2 อุปกรณ์ในการตรวจวัด

1. เครื่องแก้วและอุปกรณ์ต่างๆ ในการวิเคราะห์ทางเคมี
2. เครื่อง High performance liquid chromatography (Shimadzu LC-10 AD_{vp})
3. C₁₈ Cartridge (Solid PhaseExtraction; Varian, Inc. Australia)
4. เครื่องวัดสี (Chormameter; Minolta camera, Chroma Meter CR-300, Japan)
5. มาตรฐานวัดความเป็นกรด-เบส (pH meter; Sartorius: PB10, Germany)
6. เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด(Pocket Refractometer; PAL- α , ATAGO, Japan.)

3.1.4 อุปกรณ์และเครื่องประมวลผลข้อมูล

1. ไมโครคอมพิวเตอร์
2. โปรแกรมประมวลผลทางสถิติสำเร็จรูป SPSS Version 11.5

งานวิจัยในครั้งนี้เป็นการศึกษาผลของอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ลวกผลมะนาวต่อปริมาณสารลิโมนินที่เปลือกและในน้ำมะนาวที่คั้นได้ด้วยที่คั้นน้ำมะนาว รวมทั้งปริมาณวิตามินซีในน้ำมะนาวที่คั้นได้ด้วยที่คั้นน้ำมะนาว โดยการศึกษานี้จะใช้มะนาวพันธุ์แป้นอายุ 14 – 15 สัปดาห์ แบ่งการวิจัยเป็น 2 ตอน คือ

ตอนที่ 1 การศึกษาปริมาณสารลิโมนินในเปลือกมะนาว น้ำมะนาวที่คั้นได้ด้วยที่คั้นน้ำมะนาว และวิตามินซีในน้ำมะนาวที่คั้นได้ด้วยที่คั้นน้ำมะนาว โดยผลไม่ผ่านการลวก

ตอนที่ 2 การศึกษาปริมาณสารลิโมนินในเปลือกมะนาว น้ำมะนาวที่คั้นได้ด้วยที่คั้นน้ำมะนาว และวิตามินซีในน้ำมะนาวที่คั้นได้ด้วยที่คั้นน้ำมะนาว โดยที่ผลผ่านการลวกที่อุณหภูมิและเวลาต่างกัน

3.2 วิธีการศึกษา

3.2.1 คุณภาพของวัตถุดิบ และการศึกษาปริมาณสารลิโมนิน และวิตามินซีในมะนาวพันธุ์แป้น
ศึกษาปริมาณสารลิโมนิน ในน้ำมะนาวที่คั้นได้ด้วยที่คั้นน้ำมะนาว เปลือกมะนาว และวิตามินซีในน้ำมะนาวที่คั้นได้ด้วยที่คั้นน้ำมะนาว ที่ได้จากผลสดไม่ผ่านการลวกผล โดยศึกษาดังนี้

1. ปริมาณสารลิโมนินที่เปลือกมะนาว และในน้ำมะนาวที่คั้นได้ด้วยที่คั้นน้ำมะนาว ที่ผลถูกปอกเปลือกและลอกในส่วนของอัลบิโดออกจนหมด และน้ำมะนาวที่คั้นได้ด้วยที่คั้นน้ำมะนาว และผลไม่ได้ ปอกเปลือก
2. ปริมาณวิตามินซีในน้ำมะนาวที่คั้นได้ด้วยที่คั้นน้ำมะนาว โดยที่ปอกเปลือกผลและลอกในส่วนของอัลบิโดออกจนหมด และน้ำมะนาวที่คั้นน้ำมะนาวโดยผลไม่ได้ปอกเปลือก
3. น้ำมะนาวที่ได้จากการคั้นน้ำมะนาวที่ผลได้ปอกเปลือก และไม่ปอกเปลือก นำมาวิเคราะห์ ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดซิตริก ความเป็นกรด-ด่างค่า L a^* b^* และค่าของแข็งที่ละลายได้

ทำการทดลอง 5 ซ้ำแต่ละซ้ำทำอีก 3 ซ้ำ โดยแต่ละซ้ำใช้มะนาว 10 ลูก คั้นน้ำมะนาวมารวมกัน รวมทั้งปอกเปลือกและส่วนอัลบิโด(เนื้อเยื่อส่วนที่มีสีขาว ลักษณะฟู นุ่ม ดังภาพ 2.3) นำมารวมกัน แล้วนำมาวิเคราะห์ดังวิธีการต่อไปนี้

การศึกษาสมบัติทางเคมีและสมบัติทางกายภาพของเปลือกมะนาว และน้ำมะนาว

- 1). การวิเคราะห์ปริมาณสารลิโมนินในเปลือกมะนาว และในน้ำมะนาวใช้วิธีของ Shaw and Wilson (Guiwen Cheng, 2005) (ภาคผนวก ข.) ใช้เครื่อง HPLC ใช้ระบบ reverse phase
 - Column Microsorb C_{18} ขนาด 150mm x 4.6 mm อนุภาคที่บรรจุใน column ขนาด 5 μ m
 - C_{18} Guard column ขนาด 30mm x 2 mm อนุภาคที่บรรจุใน column ขนาด 5 μ m
 - Detector UV-visible ใช้ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร

- Flow rate 1.5 มิลลิลิตร/นาที
- Runtime 25 นาที
- Retention time 23.00-24.00 นาที
- Mobile phase ประกอบด้วย น้ำร้อยละ 67.5 โดยปริมาตร, acetonitrile ร้อยละ 17.5 โดยปริมาตร และ tetrahydrofuran ร้อยละ 15 โดยปริมาตร

2. การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซี ใช้วิธีการไตเตรตโดยตรงด้วยสารละลายไอโอดีน (AOAC, 2000) (ภาคผนวก ข.)

3. การวิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดซิตริก (AOAC, 2000) (ภาคผนวก ข.)

4. การวิเคราะห์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง (เครื่อง pH-meter) (ภาคผนวก ข.)

5. การวิเคราะห์ค่าของแข็งที่ละลายได้ (Total soluble solid) โดยใช้ Digital Hand Refractometer (ภาคผนวก ข.)

6. การวิเคราะห์ค่า L a* b* (ภาคผนวก ข.)

หมายเหตุ เปลือกมะนาวจะวิเคราะห์เฉพาะปริมาณสารลิโมนินเท่านั้น

3.2.2 คุณภาพของวัตถุดิบ และการศึกษาปริมาณสารลิโมนิน และวิตามินซีในมะนาวพันธุ์เป็น ที่ผ่านการลวกที่อุณหภูมิและเวลาต่างกัน

ศึกษาปริมาณสารลิโมนิน ในน้ำมะนาวที่คั้นได้ด้วยที่คั้นน้ำมะนาว เปลือกมะนาว และ วิตามินซีในน้ำมะนาวที่คั้นได้ด้วยที่คั้นน้ำมะนาว จาก ผลมะนาวที่ผ่านการลวก โดยมีปัจจัยที่ เกี่ยวข้องคือ อุณหภูมิในการลวก คือ 70 80 90 และ 100 องศาเซลเซียส และเวลาในการลวก คือ 1 2 3 และ 5 นาทีวางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์โดยจัดตั้งทดลอง 4x4 Factorial in CRD (4x4 Factorial in Completely Randomized Design) โดยทำการลวกดังนี้

- ลวกมะนาวครั้งละ 10 ลูก ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ โดยตั้งอุณหภูมิของน้ำให้ได้ตามที่ ต้องการ ปริมาตรของน้ำในอ่าง 15 ลิตร

- จับเวลาทันทีที่มะนาวถูกนำลงในอ่าง และใช้ตะกร้าลวกมึนย้อมครอบลูกมะนาวให้จมอยู่ใน น้ำร้อนตลอดเวลาทดลอง

- เมื่อได้เวลาตามที่กำหนดให้นำขึ้นมาแช่ในอ่างน้ำที่มีน้ำปริมาตร 10 ลิตร และมีการเติม น้ำแข็ง 2 กิโลกรัม (วัดอุณหภูมิ ต้องได้ 0 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 10 นาที

- นำมะนาวขึ้นมาชั่งน้ำหนักให้แห้งด้วย กระดาษทิชชู และผึ่งลมจนแห้งสนิท

- ทำการศึกษาคุณภาพทางเคมีของเปลือกและน้ำมะนาวที่ได้จากการคั้นน้ำจากผลที่ผ่านการลวก เช่นเดียวกับมะนาวสดคงวิธีที่กล่าวมาแล้วข้างต้น

หมายเหตุ - ปริมาตรของน้ำที่ใช้ และจำนวนมะนาวที่ใช้แต่ละครั้ง ได้ทำการทดลองแล้วว่าไม่ทำให้อุณหภูมิของน้ำเปลี่ยนไปเมื่อนำมะนาวลงไปแช่ไว้ และทำการเปลี่ยนน้ำทุกครั้งเมื่อเปลี่ยนมะนาว(ทั้งน้ำที่ใช้ลวก และน้ำเย็น)

- ที่อุณหภูมิในการลวกที่ 100 องศาเซลเซียสใช้ หม้อขนาดจุ 20 ลิตรใส่น้ำ 15 ลิตร ต้มจนเดือดแทนการใช้ อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ และทำการลวกเช่นเดียวกับข้างต้น

3.2.3 การศึกษาผลของอุณหภูมิและเวลาในการลวกมะนาวต่อสารลิโมนิน และวิตามินซี

จากผลการทดลองตอนที่ 1 และ 2 นำมาศึกษาร้อยละการคงเหลือ (%Retention) และร้อยละการสูญเสีย (%Loss) วิตามินซี และสารลิโมนินในน้ำมะนาวที่คั้นได้ด้วยที่คั้นน้ำมะนาว และการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารลิโมนินในเปลือกมะนาวและในน้ำมะนาวที่คั้นได้ด้วยที่คั้นน้ำมะนาว เมื่อมีการนำผลมะนาวมาลวกที่อุณหภูมิและเวลาต่างกัน โดยคำนวณ ร้อยละการคงเหลือ และร้อยละการสูญเสีย ดังนี้

$$\text{ร้อยละการคงเหลือของวิตามินซี} = \frac{A}{B} \times 100$$

A = ค่าเฉลี่ยปริมาณวิตามินซีในน้ำมะนาวที่คั้นได้ด้วยที่คั้นน้ำมะนาวที่ผ่านการลวก

B = ค่าเฉลี่ยปริมาณวิตามินซีในน้ำมะนาวที่คั้นได้ด้วยที่คั้นน้ำมะนาวที่ไม่ผ่านการลวก

$$\text{ร้อยละการสูญเสียของวิตามินซี} = 100 - \text{ร้อยละการคงเหลือของวิตามินซี}$$

การคำนวณร้อยละการคงเหลือ และร้อยละการสูญเสียของสารลิโมนินในเปลือก และในน้ำมะนาวที่คั้นได้ด้วยที่คั้น ทำเช่นเดียวกับวิตามินซี

จากผลการคำนวณ ร้อยละการคงเหลือ และร้อยละการสูญเสียที่ได้ นำมาวิเคราะห์ผลของอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการลวกมะนาวต่อปริมาณสารลิโมนิน และวิตามินซีในผลมะนาว