บทที่ 3
อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบ

(1) น้ำมันปาล์มดิบ จากบริษัท ชุมพรอุตสาหกรรมน้ำมันปาล์ม จำกัด (มหาชน)

(2) นมผง (MILK POWDER LITA 26, MILPRO®, Holland)

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

(1) เครื่องสกัดแคโรทีนอยด์จากน้ำมันปาล์มดิบด้วยตัวทำละลายที่อุณหภูมิต่ำ

(2) เครื่องอบแห้งแบบพ่นฝอย (spray dryer : SDE-50 model, Thailand)

(3) เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer : UV WINLAB version 2.85.04, PerkinElmer™, UK)

(4) เครื่องโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (High performance Liquid Chromatograph; HPLC : FCV-10ALvp model, SHIMADZU, Japan)

(5) เครื่องระเหย (rotary evaporator : R-200 model, BUCHI, Switzerland)

(6) เครื่องปั่นแบบมือจับ (MR 430 HC model, 300 Watt, BRAUN®, Spain)

(7) เครื่องผสม (vortex mixer : G-560E model, VORTEX-GENIE®, Scientific Industries, USA)

(8) เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge : Z 200A model, HERMLE®, Germany)

(9) เครื่องอัลตราโซนิค (ultrasonic bath : S30 model, ELMA®, Germany)

(10) เครื่องวัดสี (color meter : CR-300, MINOLTA®, Japan)

(11) อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath : WB14 model, Memmert, Germany)

(12) ตู้บ่ม (incubator : BD115 model, BINDER®, Germany)

3.3 สารเคมี

(1) กรดซิตริก (citric acid : $C_6H_8N_7$, MERCK, Germany)

(2) กรดฟอสฟอริก (phosphoric acid : H_3PO_4, MERCK, Germany)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(3) น้ำมันดอกทานตะวัน (น้ำมันดอกทานตะวันผ่านกรรมวิธี 100% ตรากุ๊ก, ธนากรผลิตภัณฑ์น้ำมันพืช, ประเทศไทย)

(4) น้ำมันถั่วเหลือง (น้ำมันถั่วเหลืองผ่านกรรมวิธี 100% ตรากุ๊ก, ธนากรผลิตภัณฑ์น้ำมันพืช, ประเทศไทย)

(5) บีเอชที (butylated hydroxyltoluene ; BHT : $C_{15}H_{24}O$, Sigma-Aldrich, USA)

(6) ปิโตรเลียมอีเทอร์ (petroleum ether : boiling point 35-60^{O}C, analytical reagent grade, J.T.Baker, USA)

(7) สารละลายแอมโมเนีย (25% ammonia solution : NH_3, analytical reagent grade, MERCK, Germany)

(8) อะซิโตน (acetone : $(CH_3)_2CO$, purity 99.8%, HPLC grade, J.T.Baker, USA)

(9) อะซิโตไนไตรล์ (acetonitrile : C_2H_3N, purity 99.9%, HPLC grade, LAB-SCAN, Ireland)

(10) บีตาแคโรทีนมาตรฐาน (standard beta-carotene : $C_{40}H_{56}$, purity ≥ 95%, HPLC grade, Sigma-Aldrich, USA)

(11) เตตระไฮโดรฟูแรน (tetrahydrofuran : C_4H_8O, purity 99.98%, HPLC grade, Fisher Scientific, UK)

(12) เมทานอล (methanol : CH_3OH, purity 99.9% , HPLC grade, LAB-SCAN, Ireland)

(13) เอทานอล (ethanol : C_2H_5OH, purity 95%, ethanl 95, Imported denatured ethyl alcohol 95%)

(14) เอทานอล (ethanol : purity 99.9%, HPLC grade, MERCK, Germany)

(15) เอน-เอทิลไดไอโซโพรพิลเอมีน (*N*-ethyldiisopropylamine : $C_8H_{19}N$, purity ≥ 98%, MERCK, Germany)

(16) เฮกเซน (hexane : C_6H_{14}, commercial grade, Etalmar ,Thailand)

(17) เฮกเซน (hexane : analytical reagent grade, Fisher Scientific, USA)

(18) เฮกเซน (hexane : purity 99..5%,HPLC grade, LAB-SCAN, Ireland)

(19) แอมโมเนียมอะซิเตต (ammonium acetate : CH_3COONH_4, purity ≥ 98%, analytical reagent grade, MERCK, Germany)

(20) ไดเอทิลอีเทอร์ (diethyl ether : $(C_2H_5)_2O$, purity 99.5% , analytical reagent grade, LAB-SCAN, Ireland)

(21) ไซโคลเฮกเซน (cyclohexane : C_6H_{12}, purity 99%, analytical reagent grade, UNIVAR, Australia)

(22) ไพโรแกลลอล (pyrogallol : $C_6H_6O_3$, pulity ≥ 98%, HPLC grade, Fluka, France)

(23) 2-โพรพานอล (2-propanol : C_3H_8O, purity 99.8%, HPLC grade, LAB-SCAN,

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Ireland)

(24) โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride : NaCl, purity 99%, analytical reagent grade, LAB-SCAN, Ireland)

(25) โซเดียมซัลเฟต (sodium sulfate; anhydrous : Na_2SO_4, purity ≥ 99%, MERCK, Germany)

(26) โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide : NaOH, purity 98%, THASCO Chemical, Thailand)

(27) โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (potassium hydroxide : KOH, purity ≥ 85%, analytical reagent grade, MERCK, Germany)

(28) น้ำกลั่น (distilled, demineralizered, deionized water)

(29) อาหารเลี้ยงเชื้อ PCA (plate count agar : MERCK, Darmstadt, Germany)

(30) เปปโตน (peptone from casein : MERCK, Darmstadt, Germany)

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเสริมบีตาแคโรทีนที่สกัดได้จากน้ำมันปาล์มดิบในน้ำนมที่ทำเป็นผงโดยวิธีการอบแห้งแบบพ่นฝอย

ก. กระบวนการสกัดแคโรทีนอยด์จากน้ำมันปาล์มดิบโดยใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลายที่อุณหภูมิต่ำ

<u>กรรมวิธีการกำจัดกัม</u> (degumming)

1. นำน้ำมันปาล์มดิบใส่ภาชนะตั้งไฟ เติมกรดซิตริกความเข้มข้นร้อยละ 20 ในปริมาณร้อยละ 0.02 ของน้ำมันปาล์มดิบ และกรดฟอสฟอริกความเข้มข้นร้อยละ 75 ในปริมาณร้อยละ 0.08 ของน้ำมันปาล์มดิบ ให้ความร้อนจนถึงอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที กวนให้เข้ากันตลอดเวลา ตั้งทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงเหลือ 60 องศาเซลเซียส

2. กรองด้วยระบบสูญญากาศ ใช้กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 ขนาด 11 เซนติเมตร โดยวางสำลีไว้ด้านบนกระดาษกรอง เพื่อป้องกันการอุดตันของกระดาษกรอง

3. นำน้ำมันที่กรองได้ใส่บีกเกอร์ แล้วนำไปหล่อเย็น

4.ใส่ขวดพลาสติก เก็บในที่มืด เพื่อนำไปสกัดในขั้นตอนต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กรรมวิธีการสกัดแคโรทีนอยด์

1. นำน้ำมันปาล์มที่ผ่านการกำจัดกัมและโลหะหนักเข้าเครื่องสกัดแคโรทีนอยด์ โดยใช้อัตราส่วนน้ำมันปาล์มดิบต่อเฮกเซนเป็น 1 ต่อ 3 และใช้เฮกเซนที่อุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียส กวนผสมให้เข้ากันตลอดเวลาที่อัตราเร็วใบกวน 250 รอบต่อนาที และจับเวลาในการสกัด 5 นาที จากนั้นนำสารละลายที่ได้ กรองด้วยกระดาษกรองเพื่อแยกส่วนที่ไม่ละลายออก และนำสารสกัดแคโรทีนอยด์ที่ได้ไประเหยเฮกเซนออกด้วยระบบสูญญากาศ

2. นำสารสกัดแคโรทีนอยด์ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์และเข้มข้น โดยกระบวนการสะปอนิฟิเคชัน (saponification) ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 25 ในเอทานอลเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยใช้อัตราส่วนสารสกัดแคโรทีนอยด์ 1 ส่วนต่อโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 25 ในเอทานอล 1 ส่วน (ประยุกต์จาก Kimura et al., 1990) ทำการแยกส่วนผสมของแคโรทีนอยด์ที่ไม่ทำปฏิกิริยาสะปอนิฟิเคชันออก จะได้ส่วนของผสมแคโรทีนอยด์และสบู่ แล้วจึงทำการแยกส่วนของผสมแคโรทีนอยด์จากสบู่ด้วยการเติมเฮกเซน 50 มิลลิลิตร และกรองแยกสบู่ออกด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 และล้างด่างส่วนเกินด้วยน้ำที่กำจัดไอออน (deionized water) 50 มิลลิลิตร 2 ครั้ง หรือจนกว่าส่วนที่ละลายในเฮกเซนจะใส จากนั้นนำส่วนดังกล่าวไประเหยเฮกเซนที่ความดัน 230 มิลลิบาร์ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และนำไปทำการวิเคราะห์ต่อไป

ข. การวิเคราะห์แคโรทีนอยด์ที่สกัดได้จากน้ำมันปาล์มดิบ

การสร้างกราฟมาตรฐานบีตาแคโรทีน

สร้างกราฟมาตรฐานบีตาแคโรทีน ตามวิธีที่ดัดแปลงจาก AOAC (2002)

วิธีการ

1. ชั่งบีตาแคโรทีนมาตรฐาน 0.0100 กรัม ลงในบีกเกอร์ 50 มิลลิลิตร ละลายสารมาตรฐานด้วยเฮกเซน และปรับปริมาตรสารละลายให้ครบ 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตรด้วยเฮกเซน

2. ปิเปตสารละลายในข้อ 1. มา 10 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรจนครบ 50 มิลลิลิตร ด้วยเฮกเซน

3. ปิเปตสารละลายในข้อ 2. มา 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตร 25 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรให้ครบด้วยเฮกเซน

4. นำสารละลายในข้อ 3. มาวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์จากความเข้มข้นน้อยไปมาก โดยใช้เฮกเซนเป็น blank

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5. นำค่าที่ได้มาเขียนกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของบีตาแคโรทีน (ไมโครกรัมต่อกรัม) กับค่าการดูดกลืนแสง

การวิเคราะห์หาปริมาณแคโรทีนอยด์ที่สกัดได้จากน้ำมันปาล์มดิบ

เตรียมแคโรทีนอยด์ที่สกัดได้จากน้ำมันปาล์มดิบให้อยู่ในรูปของน้ำมัน โดยทำการศึกษาน้ำมันที่ใช้เป็นตัวละลาย 2 ชนิด คือ น้ำมันดอกทานตะวัน และน้ำมันถั่วเหลือง (Sachindra and Mahendrakar, 2005)

<u>วิธีการ</u>

1. นำแคโรทีนอยด์ที่ผ่านกระบวนการสะปอนิฟิเคชันและระเหยเฮกเซนด้วยระบบสูญญากาศแล้ว มาเติมน้ำมันดอกทานตะวัน และน้ำมันถั่วเหลืองปริมาณ 1 กรัม

2. ชั่งแคโรทีนอยด์ที่เตรียมในรูปของน้ำมันมา 0.1000 กรัม (จดมวลที่แน่นอนทศนิยม 4 ตำแหน่ง) ลงในขวดปรับปริมาตร ละลายแคโรทีนอยด์ด้วยเฮกเซน และปรับปริมาตรสารละลายให้ครบ 50 มิลลิลิตรด้วยเฮกเซน

3. ปิเปตสารละลายในข้อ 2. มา 1 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรจนครบ 50 มิลลิลิตร ด้วยเฮกเซน

4. นำสารละลายข้อ 3. มาหาค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ โดยใช้เฮกเซนเป็น blank

5. ในกรณีค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มีค่ามากกว่ากราฟมาตรฐาน ให้ทำการปิเปตสารข้อ 3. มา 1 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรจนครบ 50 มิลลิลิตร ด้วยเฮกเซน และทำตามข้อ 4. จะได้ค่าความเข้มข้นของบีตาแคโรทีน (ไมโครกรัมต่อกรัม) แล้วนำไปคำนวณหาค่าความเข้มข้นเป็นร้อยละ

การคำนวณหาปริมาณแคโรทีนอยด์

ปริมาณบีตาแคโรทีน คำนวณโดยดัดแปลงจากวิธีของ AOAC (2002)

ค่าความเข้มข้นที่วัดได้จากการเจือจางด้วยเฮกเซน 50 มิลลิลิตรครั้งที่ 2 (ข้อ 5)

	สารละลาย 1 มิลลิลิตร มีบีตาแคโรทีน	x	ไมโครกรัม
	สารละลาย 50 มิลลิลิตร มีบีตาแคโรทีน	(x) × 50	ไมโครกรัม
ดังนั้น	สารละลาย 1 มิลลิลิตร มีบีตาแคโรทีน	(x) × 50	ไมโครกรัม
	สารละลาย 50 มิลลิลิตร มีบีตาแคโรทีน	(x) × 50 × 50	ไมโครกรัม
	เท่ากับ	y	ไมโครกรัม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ปริมาณบีตาแคโรทีนมาจากตัวอย่างแคโรทีนอยด์ z มิลลิกรัม
(มวลที่แน่นอนของแคโรทีนอยด์ที่ชั่งมาเป็นกรัม ให้เปลี่ยนเป็นมิลลิกรัม)

แคโรทีนอยด์ z มิลลิกรัม มีบีตาแคโรทีน y/1000 มิลลิกรัม
แคโรทีนอยด์ 100 มิลลิกรัม จะมีบีตาแคโรทีน A มิลลิกรัม

<u>หมายเหตุ</u> ในการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร กับแคโรทีนอยด์ที่สกัดได้เป็นค่าดูดกลืนแสงสูงสุดของบีตาแคโรทีนมาตรฐานในเฮกเซน ดังนั้นแคโรทีนอยด์จากน้ำมันปาล์มดิบจะดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นนี้ แต่ไม่ใช่ค่าดูดกลืนแสงสูงสุด จึงไม่สามารถรายงานเป็นปริมาณของบีตาแคโรทีนได้ ดังนั้นค่าที่ได้จึงเป็นค่าของแคโรทีนอยด์

***การวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ในน้ำมันปาล์มดิบด้วยเทคนิค* HPLC**

วิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ที่สกัดได้จากน้ำมันปาล์มดิบ ซึ่งเตรียมให้อยู่ในรูปของน้ำมันดอกทานตะวัน และน้ำมันถั่วเหลือง (ประยุกต์จาก Pérez-Gálvez et al., 2005)

<u>การเตรียมตัวอย่าง</u>

1. ชั่งตัวอย่าง 0.03 กรัม ละลายด้วยไดเอทิลอีเทอร์ 100 มิลลิลิตร ในขวดก้นกลมสีชา ขนาด 100 มิลลิลิตร

2. เทสารละลายใส่ในกรวยแยกขนาด 500 มิลลิลิตร เติมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 10 ในเมทานอล 50 มิลลิลิตร เขย่าให้สารละลายผสมกัน และตั้งทิ้งไว้

3. หลังการทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง เติมโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 10 ในน้ำปริมาตร 200 มิลลิลิตร สารละลายจะถูกแยกเป็น 2 ส่วน ให้ทำการแยกส่วนที่เป็นน้ำออก แล้วนำส่วนที่อยู่ในตัวทำละลายอินทรีย์ล้างด้วยน้ำปริมาตร 200 มิลลิลิตร จนกระทั่งได้สารละลายใสและเติมโซเดียมซัลเฟต 3 กรัม เพื่อช่วยดูดซับน้ำในสารละลาย

4. นำไปทำการระเหยตัวทำละลายออกด้วยระบบสูญญากาศ ที่ความดัน 250 มิลลิบาร์ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และเติมเอทานอลปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำการระเหยต่อที่ความดัน 72 มิลลิบาร์ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เพื่อกำจัดน้ำที่เหลือออก

5. นำส่วนที่เหลือไปละลายด้วยอะซิโตน ปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตร กรองผ่าน filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร เก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และนำไปทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ค. วิเคราะห์สมบัติของนมที่ใช้เป็นวัตถุดิบ

- ปริมาณกรดทั้งหมดที่สามารถไทเทรตได้ (total titratable acidity; TA : %acidity) โดยการไทเทรตตามวิธีของ AOAC (2000)
- ค่าความเป็นกรด- ด่าง (pH) โดยใช้พีเอชมิเตอร์ (pH meter)
- วัดความชื้น (AOAC, 2000)
- วัดค่าสี ระบบฮันเตอร์ (Hunter : L a* b*) โดยใช้เครื่องวัดสี (Color meter)

ง. กระบวนการผลิตนมผงด้วยวิธีการทำแห้งแบบพ่นฝอย

กระบวนการเสริมบีตาแคโรทีนในนมผง โดยทำการเติมบีตาแคโรทีนในรูปของน้ำมัน (oily form) ทำการศึกษาทิศทางการพ่น 2 แบบ คือ แบบตามกระแสลมร้อน และแบบสวนกระแสลมร้อน (ดัดแปลงจากวิธีของ Murphy, 2001; Johnson, 1996; Ottaway, 1993)

วิธีทำ

1. นำนมผงวัตถุดิบทำให้เข้มข้น โดยการนำไปละลายน้ำให้ได้ปริมาณของแข็งทั้งหมดร้อยละ 40 แล้วให้ความร้อนอุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียส เติมบีตาแคโรทีนในรูปของน้ำมันปริมาณ 3000, 4000 และ 5000 IU/qt ในนมบางส่วนก่อนแล้วผสมลงในถังพัก ใช้เครื่องปั่นแบบมือจับ (BRAUN® : MR 430 HC model, 300 Watt, Spain) ปั่นให้ส่วนผสมเข้ากัน 5 นาที หรือจนสังเกตว่าของผสมเข้ากันดีแล้ว

2. ทำการเดินเครื่องอบแห้งแบบพ่นฝอย โดยใช้อุณหภูมิลมร้อนขาเข้า 175 องศาเซลเซียส หัวฉีดพ่นชนิดใช้แรงดันสูง (pressure atomizer) เบอร์ 1.5 (Spray drying Systems Co., USA) ความดันปั๊มของเหลว 15 บาร์ ความเร็วในการพ่นของเหลว 35 รอบต่อวินาที ความเร็วปั๊มลม 25 รอบต่อวินาที ทิศทางการพ่นแบบตามกระแสลมร้อน และแบบสวนกระแสลมร้อนในแต่ละกรณีศึกษา

3. นมผงที่ได้เก็บใส่ถุงอะลูมิเนียมฟอยล์ เพื่อป้องกันการออกซิเดชันด้วยแสง ปิดผนึกด้วยระบบสูญญากาศ (vacuum seal) และเก็บในภาชนะที่มีฝาปิดสนิท

หมายเหตุ ในกระบวนการผลิตจะทำการผลิตนมผงที่เป็นตัวควบคุม โดยไม่มีการเติมบีตาแคโรทีนและใช้สภาวะในการผลิตเช่นเดียวกับตัวอย่างที่ทำการศึกษา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4.2 การศึกษาความคงตัวของบีตาแคโรทีนในนมผง

ก. การวิเคราะห์ปริมาณบีตาแคโรทีนที่เสริมในนมผง

ทำการวิเคราะห์ปริมาณบีตาแคโรทีนที่เหลืออยู่ในนมผง ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูงโดยเก็บตัวอย่างเพื่อทำการวัดปริมาณของบีตาแคโรทีนในนมผงในวันที่ 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 (ดัดแปลงจาก Hulshof et al, 2006; Szpylka and Devries, 2005)

วางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (Completely Randomized Design,CRD) วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS

การเตรียมตัวอย่าง

1. ชั่งตัวอย่างนมผง 1 กรัม (จดมวลที่แน่นอน ทศนิยม 3 ตำแหน่ง) ใส่ในหลอดทดลองที่มีฝาปิด ปิเปตน้ำกลั่น 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้ละลายจนเข้ากันดี จากนั้นเติมสารละลายแอมโมเนียร้อยละ 25 ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร และเอทานอลร้อยละ 96 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

2. ทำการสกัดไขมันด้วยไดเอทิลอีเทอร์ที่มีบีเอชทีร้อยละ 0.0025 (มวลต่อปริมาตร) 2 มิลลิลิตร และปิโตรเลียมอีเทอร์ 2 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง แล้วผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม (vortex mixer) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3500g เป็นเวลา 3 นาที และนำส่วนบนใส่ในหลอดทดลองไประเหยในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียส

3. นำส่วนที่เหลือไปทำให้บริสุทธิ์โดยกระบวนการสะปอนิฟิเคชันด้วยโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (ร้อยละ 5 มวลต่อปริมาตร ในเอทานอลร้อยละ 96 ปริมาตรต่อปริมาตร) ที่มีไพโรแกลลอลร้อยละ 0.2 (มวลต่อปริมาตร) 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมแก๊สไนโตรเจน ปิดฝาให้สนิทเก็บในที่มืดเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ในระหว่างนี้ให้นำมาผสมด้วยเครื่องผสม ทุกๆ 30 นาที

4. หลังจากนั้นเติมน้ำกลั่น 1.5 มิลลิลิตร และทำการสกัดด้วยเฮกเซน 3 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง นำส่วนที่ละลายในเฮกเซนรวมกัน แล้วนำไประเหยในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียส

5. นำส่วนที่เหลือไปละลายในเมทานอลต่อเตตระไฮโดรฟูแรน (3 : 1 ปริมาตรต่อปริมาตร) 2 มิลลิลิตร และกรองผ่าน filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร เก็บในขวดสีชา แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

หมายเหตุ ในขั้นตอนการสกัดทำการทดลอง 2 ซ้ำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

การวิเคราะห์ปริมาณบีตาแคโรทีนด้วยเทคนิค HPLC ดัดแปลงจากวิธีของ Sypylka and Devries (2005)

<u>การวัดค่าความบริสุทธิ์ของสารมาตรฐาน</u>

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานบีตาแคโรทีน 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งบีตาแคโรทีนมาตรฐาน 0.00600 กรัม ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายด้วยเตตระไฮโดรฟูแรนประมาณ 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องอัลตราโซนิค 30 วินาที แล้วปรับปริมาตรด้วยเตตระไฮโดรฟูแรน จะได้ความเข้มข้น 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (standard stock solution) และปิเปตสารละลายที่เตรียมได้ ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร 2 ขวดๆ ละ 5 มิลลิลิตร โดยขวดแรกให้ปรับปริมาตรด้วยไซโคลเฮกเซน (standard measuring solution) และขวดที่สองให้ปิเปตเตตระไฮโดรฟูแรน 5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยเอทานอล (standard working solution) เก็บสารละลายทั้งหมดที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส และสามารถใช้ได้ใน 1 วัน

2. การวัดค่าความบริสุทธิ์ด้วยวิธีสเปคโตรโฟโตเมทรี (spectrophotometric purity; SP) โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของ standard measuring solution ที่ความยาวคลื่น 457 นาโนเมตร แล้วคำนวณค่าการดูดกลืนแสงและค่าความบริสุทธิ์ของสารละลายมาตรฐาน ตามสูตร

$$\mathbf{E_{app}(1\%,\ 1\ cm) = A \times 2/W \times 10\ 000/B}$$

โดยที่ E_{app} = apparent absorbance constant

A = ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด

2 = dilution factor (L)

W = มวลของสารมาตรฐาน (mg)

10 000 = ค่าการคำนวณกลับจากร้อยละเป็น mg/L

B = ความยาวของเซลล์ (cm)

$$\mathbf{SP = E_{app}(1\%,\ 1\ cm) / 2505}$$

โดยที่ 2505 = ค่า E_{app}(1%, 1 cm) ของ all-*trans*-β-carotene ในไซโคลเฮกเซน

2. การวัดค่าความบริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟี (chromatographic purity; CP) ทำการวิเคราะห์ทันทีที่เตรียมสารละลาย standard working เสร็จ โดยฉีดในปริมาณ 20 ไมโครลิตร อย่างน้อย 6 ครั้ง ในระบบ HPLC แล้วคำนวณค่าบริสุทธิ์ของ all-*trans*-β-carotene

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากองค์ประกอบทั้งหมดของโครมาโตแกรม ยกเว้นพื้นที่ของตัวทำละลายหรือพื้นที่ของตัวทำละลายที่เป็น blank และใช้ค่าเฉลี่ยของค่าความบริสุทธิ์ จากการฉีดในระบบ HPLC ทั้ง 6 ครั้ง

CP = พื้นที่ของ all-*trans*-β-carotene / ผลรวมของพื้นที่ทั้งหมด

4. ค่าความบริสุทธิ์ของสารละลายมาตรฐาน (reference standard purity; P) จาก

$$P\ (\%) = SP \times CP \times 100$$

<u>การวัดค่าในระบบ HPLC</u>

1. คำนวณความเข้มข้นของ all-*trans*-β-carotene จากสารละลาย standard working

$$C\ (\mu g/ml) = W \times P/200$$

โดยที่ W = มวลของตัวอย่าง (mg)
P = ค่าความบริสุทธิ์ (%)
200 = ค่าการเจือจาง 2000 มิลลิลิตร (คำนวณกลับจากมิลลิกรัมเป็นไมโครกรัมและร้อยละของความบริสุทธิ์)

2. คำนวณค่า response factor (RF) ของ all-*trans*-β-carotene

$$RF\ [AU \times L/mg] = A_{std}/C$$

โดยที่ RF = response ของ all-*trans*-β-carotene
A_{std} = ค่าเฉลี่ยของพื้นที่กราฟทั้งหมดจากโครมาโตแกรมของ all-*trans*-β-carotene (Area Unit, AU)

พื้นที่กราฟของ all-*trans*-β-carotene ต้องมากกว่าร้อยละ 95 ของพื้นที่กราฟทั้งหมด

<u>สภาวะสำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC</u>

Column	Suplex pKb-100, Supelco, 5 μm, 250×4.6 mm.
Column temperature	30°C
Flow rate	0.6 mL/min
Injection volume	20 μL
Detection	448 nm

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Mobile phase ละลายบีเอชที 50 มิลลิกรัม ใน 2-โพรพานอล 20 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตรขนาด 1000 มิลลิลิตร และเติมเอน-เอทิลไดไอโซโพรพิลเอมีน 0.2 มิลลิลิตร สารละลายแอมโมเนียมอะซิเตตร้อยละ 0.2 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร (แอมโมเนียมอะซิเตต 0.50 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส ได้นาน 1 เดือน) จากนั้นเติมอะซิโตไนไตรล์ 455 มิลลิลิตร และเมทานอลประมาณ 450 มิลลิลิตร ซึ่งส่วนผสมจะเย็นให้ทิ้งไว้จนได้อุณหภูมิห้อง แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตรด้วยเมทานอล และใช้ภายใน 2 วัน

<u>การคำนวณ</u>

คำนวณปริมาณของ all-*trans*-β-carotene และบีตาแคโรทีนทั้งหมดในตัวอย่าง ตามสูตรต่อไปนี้

$$\mathbf{C_{tot}\ (mg/g) = [(A_{trans} + A_{9cis} + A_{13cis} \times 1.2 + A_{15cis} \times 1.4 + A_{xcis}) \times V] / (RF_{trans} \times m)}$$

$$\mathbf{C_{trans}\ (mg/g) = (A_{trans} \times V) / (RF_{trans} \times m)}$$

โดยที่ C_{tot} = ปริมาณบีตาแคโรทีนทั้งหมด (mg/g)

C_{trans} = ปริมาณ all-*trans*-β-carotene (mg/g)

A_{trans} = พื้นที่กราฟของ all-*trans*-β-carotene (Area units = AU)

A_{9cis} = พื้นที่กราฟของ 9-*cis*-β-carotene (AU)

A_{13cis} = พื้นที่กราฟของ 13-*cis*-β-carotene (AU)

A_{15cis} = พื้นที่กราฟของ 15-*cis*-β-carotene (AU)

A_{xcis} = ผลรวมของพื้นที่กราฟของ *cis*-isomers อื่นของบีตาแคโรทีน (AU)

1.2, 1.4 = relative response factors ซึ่งเป็นค่า correction factor ที่ใช้ปรับค่าการดูดกลืนแสงของ 13-*cis* และ 15-*cis*-β-carotene เมื่อเปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของ all-*trans*-β-carotene ที่ความยาวคลื่นเดียวกัน

m = ปริมาณตัอย่าง (g)

RF_{trans} = response facter ของ all-*trans*-β-carotene (AU*L/mg)

V = ปริมาตรที่ใช้ละลายตัวอย่าง (L)

<u>การวัดค่าความคงตัวของบีตาแคโรทีนในนมผง</u>

1. นำตัวอย่างนมผงที่ทำการสกัดบีตาแคโรทีนเพื่อทำการวิเคราะห์ความคงตัว มาฉีดเข้าระบบ HPLC ปริมาตร 20 ไมโครลิตร โดยใช้สภาวะเดียวกันกับการวัดค่าความบริสุทธิ์ของสาร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

มาตรฐาน ทำการฉีดเข้าระบบ 2 ซ้ำ ต่อตัวอย่างที่ทำการสกัด 1 ซ้ำ

2. นำพื้นที่กราฟมาคำนวณปริมาณของ all-*trans*-β-carotene และบีตาแคโรทีนทั้งหมดในตัวอย่างนมผงตามสูตรดังกล่าวข้างต้น

ข. การวิเคราะห์สมบัติของนมผง

- วัดค่าสี ระบบฮันเตอร์ (Hunter : L a* b*) โดยใช้เครื่องวัดสี (Color meter)
- วัดความชื้น (AOAC, 2000)
- ตรวจแบคทีเรียทั่วไป ด้วยวิธีนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (Total Plate Count) ตามวิธีของ AOAC (2002)

3.4.3 การศึกษาสมบัติทางประสาทสัมผัสของนมผง

การทดสอบความชอบหรือการยอมรับรวมของผู้บริโภคต่อนมผงที่เสริมบีตาแคโรทีน โดยใช้แบบทดสอบ Hedonic 9 scale ใช้ผู้ทดสอบชิมทั้งหมด 50 คน ให้คะแนนตามความชอบจาก 1 ถึง 9 โดยที่ 9 เป็นคะแนนที่ชอบมากที่สุดตามลำดับไปจนถึง 1 เป็นคะแนนที่ชอบน้อยที่สุด โดยใช้นมที่ไม่ได้เสริมบีตาแคโรทีนและนมผงตามท้องตลาดเป็นตัวควบคุม (ประยุกต์จากเพ็ญขวัญ, 2536; Lloyd et al., 2004) ทำการทดสอบโดยคัดเลือกหน่วยการทดลองที่มีปริมาณบีตาแคโรทีนมากที่สุด จากการวิเคราะห์ปริมาณบีตาแคโรทีน ซึ่งได้ใช้ปริมาณบีตาแคโรทีน 1500 IU ซึ่งเป็นปริมาณวิตามินเอที่แนะนำให้บริโภคต่อวันในการทดสอบ

วางแผนการทดลองแบบบล็อกสมบูรณ์ (Randomized Complete Block Design, RCBD) (อิศรพงษ์, 2545) โดยให้ผู้ทดสอบเป็นบล็อก วิเคราะห์ข้อมูลโดยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS

<u>การเตรียมตัวอย่าง</u> (เพ็ญขวัญ, 2536; วรรณาและวิบูลย์ศักดิ์, 2531)

1. นมผง 13 กรัม เติมน้ำอุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียส ให้ครบ 100 กรัม คนให้ละลายจนเข้ากันดี (นมผงเสริมและไม่ได้เสริมบีตาแคโรทีน)
2. นมผงจากท้องตลาด (DUMEX dugro 1 plus^{TM}, บริษัท ดูเม็กซ์ จำกัด, ประเทศไทย) 38 กรัม ผสมในน้ำสุกอุ่น 180 มิลลิลิตร คนให้ละลาย
3. ตวงน้ำนมที่เตรียมได้ใส่ภาชนะปริมาตร 20-30 มิลลิลิตร สำหรับเสิร์ฟให้ผู้ทดสอบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โดยทำการสุ่มรหัสตัวเลข 3 ตัวในแต่ละตัวอย่าง และให้ผู้ทดสอบใช้น้ำบ้วนปากระหว่างการทดสอบตัวอย่าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved