

บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

3.1 วัสดุดิบ

น้ำมันปาล์มที่ใช้ในการทดลองได้รับการสนับสนุนจาก บริษัทหุมพรอุตสาหกรรมน้ำมัน
ปาล์ม จำกัด (มหาชน) 296 ม.2 ต.สลุย อ.ท่าแซะ จ.หุมพร 86140

3.2 อุปกรณ์/เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษา

3.2.1 เครื่องระเหยแบบสูญญากาศ (Rotary Evaporater “Buchi”, Switzerland)

3.2.2 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer “Perkin Elmer TM”, UV
WINLAB version 2.85.04)

3.2.3 เครื่องวัดดัชนีหักเห (Digital ABBE Refractometer “Kruess”, AR 2008,
Germany)

3.2.4 เต้าให้ความร้อน (Heating mantle “Whatman”, model HMFT)

3.2.5 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven “Termaks”, England)

3.2.6 เครื่องคาร์ลฟีชเชอร์ไทเตรชัน (Karl Fisher Titration “Metrohm”, 835
Titrande, Switzerland)

3.2.7 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath, GFL Model D1004, Germany)

3.2.8 เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter “Sartorius”, series PB10)

3.2.9 เตาเผาเถ้า (Muffle Furnace “Gallenkamp”, model FSE 520, England)

3.2.10 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Analytical balance “Sartorius”, CP 224S,
Germany)

3.3 สารเคมีและวิธีการเตรียมสารเคมี

3.3.1 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดน้ำมันปาล์มดิบ

ก) สารละลายกรดซิตริก ความเข้มข้น 20% เตรียมโดย ละลายกรดซิตริก (“เวชวิทซ์” Citric acid, food grade, เอส.เค.เทรคดิง, ประเทศไทย) จำนวน 20 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

ข) สารละลายกรดฟอสฟอริก ความเข้มข้น 75% เตรียมโดย ตวงกรดฟอสฟอริก (“Merk” Phosphoric acid, AR Grade, Germany) มา 75 กรัม ผสมกับน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

3.3.2 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดน้ำมันปาล์มดิบโดยใช้เครื่องต้นแบบ

ก) พรอพโพลีน ไกลคอล (“Baker” propylene glycol, AR Grade, U.S.A)

ข) เฮกเซน (Hexane, Commercial grade, Etalmar, Thailand)

3.3.3 สารเคมีที่ใช้ในการสะปอนิฟิเคชันน้ำมันปาล์ม

ก) เอทานอล ความเข้มข้น 95%(95% Ethanol, Commercial grade, Imported denatured ethyl alcohol 95%)

ข) โซเดียมไฮดรอกไซด์ (98% Sodium hydroxide, Commercial grade, Thasco chemical, Thailand)

ค) เฮกเซน (Hexane, Commercial grade, Etalmar, Thailand)

3.3.4 สารเคมีที่ใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐานบีตาแคโรทีน

ก) บีตาแคโรทีนมาตรฐาน (“Fluka” Standard β -carotene, U.S.A)

ข) เฮกเซน (“Baker” Hexane, AR Grade, U.S.A)

3.3.5 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดแคโรทีนอยด์

ก) เฮกเซน (“Baker” Hexane, AR Grade, U.S.A)

3.3.6 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ค่าไอโอดีน

ก) สารละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์ ความเข้มข้น 15% เตรียมโดย ละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์ (“Baker” Potassium iodide, AR Grade, U.S.A) จำนวน 15 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

ข) สารละลายวิจจ์ (“Baker” Wijs iodine solution, AR Grade, U.S.A)

ค) น้ำแป้ง ความเข้มข้น 1% เตรียมโดย ละลายแป้ง (“Baker” Soluble starch, AR Grade, U.S.A) จำนวน 1 กรัม ในน้ำกลั่นเล็กน้อย จากนั้นเติมน้ำเดือดลงไป 100 มิลลิลิตร นำไปต้มให้เดือดเป็นเวลา 1 นาที ปล่อยให้เย็นก่อนนำมาใช้

ง) สารละลายมาตรฐานโซเดียมไธโอซัลเฟต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ เตรียมโดย ละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต (“Fluka” Sodium thiosulfate, AR Grade, U.S.A) จำนวน 1.58 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร นำไปต้มให้เดือดเป็นเวลา 5 นาที ปล่อยให้เย็นก่อนนำมาใช้

จ) ตัวทำละลายผสมไซโคลเฮกเซนอะซิติก เตรียมโดย ละลายไซโคลเฮกเซน (“Ajax” Cyclohexane, AR Grade, Australia) กับกรดอะซิติก (“Merk” Acetic acid, AR Grade, German) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 (v/v)

3.3.7 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ค่าสะปอนนิฟิเคชัน

ก) สารละลายแอลกอฮอล์โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ เตรียมโดย ละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (“APS Ajax Finechem” Potassiumhydroxide, AR Grade, Australia) จำนวน 35-40 กรัม ในน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยเอทานอล (ความเข้มข้น 95%) (“Merk” Ethanol, AR Grade, Germany) ให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

ข) สารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.5 นอร์มัล เตรียมโดย ตวงกรดไฮโดรคลอริก (ความเข้มข้น 37%) (“Ajax” Hydrochloric, AR Grade, Australia) มา 43 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

ค) สารละลายฟีนอล์ฟธาเลิน ความเข้มข้น 1% เตรียมโดย ละลายฟีนอล์ฟธาเลิน (“Sigma” Phenolphthalein, AR GRADE, U.S.A) จำนวน 1 กรัม ในเอทานอล (ความเข้มข้น 95%) (“Merk” Ethanol, AR Grade, Germany) 100 มิลลิลิตร

3.3.8 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ค่าสารที่สะปอนนิไฟต์ไม่ได้

ก) สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 3 โมลาร์ เตรียมโดย ละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (“APS Ajax Finechem” Potassiumhydroxide, AR Grade, Australia) จำนวน 16.8 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

ข) สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ เตรียมโดย ละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (“APS Ajax Finechem” Potassiumhydroxide, AR Grade, Australia) จำนวน 2.8 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

ค) ไดเอทิลอีเทอร์ (“Lab-Scan” Diethylether, AR Grade, Ireland)

ง) สารละลายฟีนอล์ฟธาเลิน ความเข้มข้น 1% เตรียมโดยละลายฟีนอล์ฟธาเลิน (“Sigma” Phenolphthalein, AR GRADE, U.S.A) จำนวน 1 กรัม ในเอทานอล (ความเข้มข้น 95%) (“Merk” Ethanol, AR Grade, Germany) 100 มิลลิลิตร

จ) สารละลายแอลกอฮอล์โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ เตรียมโดย ละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (“APS Ajax Finechem” Potassiumhydroxide, AR Grade, Australia) จำนวน 35 กรัม ในน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยเอทานอล (ความเข้มข้น 95%) (“Merk” Ethanol, AR Grade, Germany) ให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

3.3.9 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด

ก) สารละลายฟีนอล์ฟธาเลิน ความเข้มข้น 1% เตรียมโดย ละลายฟีนอล์ฟธาเลิน (“Sigma” Phenolphthalein, AR GRADE, U.S.A) จำนวน 1 กรัม ในเอทานอล (ความเข้มข้น 95%) (“Merk” Ethanol, AR Grade, Germany) 100 มิลลิลิตร

ข) สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ เตรียมโดย ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (“Merk” Sodium hydroxide, AR Grade, Germany) จำนวน 0.4 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

ค) สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ เตรียมโดย ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (“Merk” Sodium hydroxide, AR Grade, Germany) จำนวน 1 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

ง) สารละลายแอลกอฮอล์ที่ปรับให้เป็นกลางแล้ว เตรียมโดย ตวงเอทานอล (ความเข้มข้น 95%) (“Merk” Ethanol, AR Grade, Germany) มา 50 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายฟีนอล์ฟธาเลิน ความเข้มข้น 1% ลงไป 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปไทเทรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพูคงที่

3.3.10 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ค่าเพอร์ออกไซด์

ก) สารละลายผสมอะซิติกคลอโรฟอร์ม เตรียมโดย ผสมกรดอะซิติก (“Merk” Acetic acid, AR Grade, German) กับคลอโรฟอร์ม (“Merk” Chloroform, AR Grade, Germany) ในอัตราส่วน 3 ต่อ 2

ข) สารละลายอิมตัวโพแทสเซียมไอโอไดด์ เตรียมโดย เติมโพแทสเซียมไอโอไดด์ (“Baker” Potassium iodide, AR Grade, U.S.A) ลงในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร คนจนโพแทสเซียมไอโอไดด์ที่เติมลงไปไม่สามารถละลายได้อีก

ค) สารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ เตรียมโดย ละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต (“Fluka” Sodium thiosulfate, AR Grade, U.S.A) จำนวน 1.58 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร นำไปต้มให้เดือดเป็นเวลา 5 นาที ปล่อยให้เย็นก่อนนำมาใช้

ง) น้ำแป้ง ความเข้มข้น 1% เตรียมโดย ละลายแป้ง (“Baker” Soluble starch, AR Grade, U.S.A) จำนวน 1 กรัม ในน้ำกลั่นเล็กน้อย จากนั้นเติมน้ำเดือดลงไป 100 มิลลิลิตร นำไปต้มให้เดือดเป็นเวลา 1 นาที ปล่อยให้เย็นก่อนนำมาใช้

3.3.11 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณน้ำ

- ก) ไฮดรานอล คอมพอกไซท์ (“Riedel-de Haea” Hydranal Compoxite, Germany)
- ข) คาร์ลฟิชเชอร์รีเอเจนต์ (“Baker” Karl Fisher reagent, AR Grade, U.S.A)
- ค) เมทานอล (ความเข้มข้น 95%) (“Merk” Methanol, AR Grade, Germany)
- ง) ฟอว์มาไมด์ (“Baker” Formamide, AR Grade, U.S.A)
- จ) ตัวทำละลายเมทานอล-ฟอว์มาไมด์ เตรียมโดย ผสมเมทานอล (ความเข้มข้น 95%) (“Merk” Ethanol, AR Grade, Germany) กับฟอว์มาไมด์ (“Baker” Formamide, AR Grade, U.S.A) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1
- ฉ) โซเดียมทาร์เตรต ไดไฮเดรต (“Hydranal” Sodium tartrate dihydrate, AR Grade, Germany)
- ช) สารละลายมาตรฐานน้ำ (“Hydranal” Water standard, AR Grade, Germany)

3.3.12 สารเคมีที่ใช้ในการแยกสบู่อะและกลีเซอริน

- ก) โซเดียมคลอไรด์ (“Labscan” Sodium hydroxide, AR Grade, Ireland)

3.3.13 สารเคมีที่ใช้ในการหาปริมาณสบู่

- ก) อะซีโตน เข้มข้น 98% เตรียมโดยผสมน้ำ 20 มิลลิลิตร ลงในอะซีโตน (“Baker” Acetone, AR Grade, U.S.A.) 980 มิลลิลิตร
- ข) สารละลายกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 0.01 นอร์มัล เตรียมโดยตวงกรดไฮโดรคลอริก (ความเข้มข้น 37%) (“Ajax” Hydrochloric, AR Grade, Australia) 0.83 มิลลิลิตรลงในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร
- ค) โบรโมฟีนอลบลู อินดิเคเตอร์ เข้มข้น 1% เตรียมโดย ละลายโบรโมฟีนอลบลู (“Ajax” Bromophenol blue, AR Grade, Australia) จำนวน 1 กรัม ลงในเอทานอล (ความเข้มข้น 95%) (“Merk” Ethanol, AR Grade, Germany) 100 มิลลิลิตร

ง) สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 0.01 นอร์มัล เตรียมโดย ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (“Merk” Sodium hydroxide, AR Grade, Germany) จำนวน 0.04 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

3.3.14 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณบีตาแคโรทีน

ก) ไฮโคลเฮกเซน (“Ajax” Cyclohexane, AR Grade, Australia)

3.3.15 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณไฮดรอกไซด์อิสระ

ก) เอทานอล ความเข้มข้น 99% (“Merk” Ethanol, AR Grade, Germany)

ข) สารละลายแอลกอฮอล์โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ เตรียมโดย ละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (“APS Ajax Finechem” Potassiumhydroxide, AR Grade, Australia) จำนวน 35-40 กรัม ในน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยเอทานอล (ความเข้มข้น 95%) (“Merk” Ethanol, AR Grade, Germany) ให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

ค) สารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.5 นอร์มัล เตรียมโดย ตวงกรดไฮโดรคลอริก (ความเข้มข้น 37%) (“Ajax” Hydrochloric, AR Grade, Australia) มา 43 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

ง) สารละลายฟีนอล์ฟธาเลิน ความเข้มข้น 1% เตรียมโดย ละลายฟีนอล์ฟธาเลิน (“Sigma” Phenolphthalein, AR GRADE, U.S.A) จำนวน 1 กรัม ในเอทานอล (ความเข้มข้น 95%) (“Merk” Ethanol, AR Grade, Germany) 100 มิลลิลิตร

3.3.16 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณไขมันทั้งหมด

ก) อะซีโตน (“Baker” Acetone, AR Grade, U.S.A.)

ข) ปีโตรเลียมอีเทอร์ (“Labscan” Petroleum ether, AR Grade, Ireland)

ค) เอทานอล 95% (“Merk” Ethanol, AR Grade, Germany)

ง) สารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1 นอร์มัล เตรียมโดย ตวงกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 37% (“Ajax” Hydrochloric, AR Grade, Australia) มา 86 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

จ) สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 นอร์มัล เตรียมโดย ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (“Merk” Sodium hydroxide, AR Grade, Germany) จำนวน 4 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

ฉ) สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 นอร์มัล เตรียมโดย ละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (“APS Ajax Finechem” Potassiumhydroxide, AR Grade, Australia) จำนวน 5.6 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

ช) สารละลายเมทิลออเรนจ์ ความเข้มข้น 0.2% เตรียมโดย ละลายเมทิลออเรนจ์ (“Baker” Methyl Orange, AR Grade, U.S.A.) จำนวน 0.2 กรัมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

ซ) สารละลายฟีนอล์ฟธาเลิน ความเข้มข้น 1% เตรียมโดย ละลายฟีนอล์ฟธาเลิน (“Sigma” Phenolphthalein, AR GRADE, U.S.A) จำนวน 0.01 กรัม ในเอทานอล (ความเข้มข้น 95%) (“Merk” Ethanol, AR Grade, Germany) 100 มิลลิลิตร

3.3.17 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันอิสระ

ก) เอทานอล ความเข้มข้น 95% (“Merk” Ethanol, AR Grade, Germany)

ข) สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ เตรียมโดย ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (“Merk” Sodium hydroxide, AR Grade, Germany)จำนวน 0.4 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

ค) สารละลายฟีนอล์ฟธาเลิน ความเข้มข้น 0.5% เตรียมโดย ละลายฟีนอล์ฟธาเลิน (“Sigma” Phenolphthalein, AR GRADE, U.S.A) จำนวน 0.5 กรัม ในเอทานอล (ความเข้มข้น 50%) (“Merk” Ethanol, AR Grade, Germany) 100 มิลลิลิตร

3.3.18 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณกลีเซอรอล

ก) สารละลายฟีนอล์ฟธาเลิน ความเข้มข้น 0.5% เตรียมโดย ละลายฟีนอล์ฟธาเลิน (“Sigma” Phenolphthalein, AR GRADE, U.S.A) จำนวน 0.5 กรัม ในเอทานอล (ความเข้มข้น 95%) (“Merk” Ethanol, AR Grade, Germany) 100 มิลลิลิตร

ข) กรดซัลฟิวริก ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล เตรียมโดย ดวงกรดซัลฟิวริก (“Merk” Sulfuric acid, AR Grade, Germany) มา 0.84 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร

ค) สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.05 นอร์มัล เตรียมโดย ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (“Merk” Sodium hydroxide, AR Grade, Germany) จำนวน 0.2 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

ง) สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.125 นอร์มัล เตรียมโดย ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (“Merk” Sodium hydroxide, AR Grade, Germany) จำนวน 0.5 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

จ) สารละลายโซเดียมเมตาเพอริโอเดต เตรียมโดยละลายโซเดียมเมตาเพอริโอเดต (“Fluka” Sodium metaperiodate, AR Grade, U.S.A) จำนวน 30 กรัม ในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร

ฉ) สารละลายเอทิลีนไกลคอล เตรียมโดย ผสมเอทิลีนไกลคอล (“Gliwice” Ethylene glycol) 50 มิลลิลิตร กับน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร

ช) สารละลายโซเดียมฟอร์มเมต ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล เตรียมโดย ละลายโซเดียมฟอร์มเมต (“Riedel-de Haen” Sodium formate, AR Grade, Germany) 0.68 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

3.3.19 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสบู่

ก) สารละลายโบรโมฟีนอลบลูอินดิเคเตอร์ เตรียมโดย ละลายโบรโมฟีนอลบลู (“Ajax” Bromophenol blue, AR Grade, Australia) จำนวน 0.04 กรัม ลงในเอทานอล (ความเข้มข้น 95%) (“Merk” Ethanol, AR Grade, Germany) 100 มิลลิลิตร

3.4 วิธีการศึกษา

3.4.1 การเตรียมตัวอย่างแคโรทีนอยด์

3.4.1.1 การสกัดน้ำมันปาล์มดิบ

ทำการสกัดน้ำมันปาล์มดิบตามวิธีของพัชรินทร์และคณะ (2548) โดยนำน้ำมันปาล์มดิบ เกลงหม้อ ตั้งไฟ แล้วเติมกรดซิตริก 0.02% และ กรดฟอสฟอริก 0.08% จากนั้นกวนผสม สารละลาย จนสารละลายมีอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 15 นาที แล้วนำมากรอง ระบบสุญญากาศ โดยใช้กระดาษกรองน้ำตาล

3.4.1.2 การสกัดแคโรทีนอยด์จากน้ำมันปาล์มดิบ

ทำการสกัดแคโรทีนอยด์จากน้ำมันปาล์มดิบตามวิธีของพัชรินทร์และคณะ (2548) ดังนี้
ทำการบ่ม propylene glycol เข้าถึงผสม แล้วเติมเฮกเซนจำนวน 4,300 มิลลิลิตร ลงถึงผสม จากนั้นชั่งน้ำมันปาล์มดิบที่ได้จากข้อ 3.4.1.1 จำนวน 1,434 กรัม ทำให้อุ่น จนมีอุณหภูมิ ประมาณ 30 องศาเซลเซียส เมื่ออุณหภูมิของถึงสกัดเท่ากับ -10 องศาเซลเซียส บ่มน้ำมันปาล์มดิบ ที่ทำให้อุ่นแล้วเข้าสู่เครื่องสกัด โดยใช้ความเร็วของใบพัดในการกวนเท่ากับ 250 รอบ/นาที เมื่อ

อุณหภูมิของถังสกัดครั้งที่ -10 องศาเซลเซียส ปล่อยให้เป็นเวลา 5 นาที แล้วทำการกรองโดยระบบสุญญากาศ เพื่อเอาไขมันเหลือทิ้งออก สารที่ได้ เรียกว่า สารผสมระหว่างน้ำมันปาล์มดิบกับเฮกเซน

3.4.1.3 การระเหยตัวทำละลายออกจากสารผสมระหว่างน้ำมันปาล์มดิบกับเฮกเซน

ทำการระเหยตัวทำละลายออกจากสารผสมระหว่างน้ำมันปาล์มดิบกับเฮกเซน โดยเทสารผสมระหว่างน้ำมันปาล์มดิบกับเฮกเซน ที่ได้จากข้อ 3.4.1.2 ลงอ่างสำหรับบรรจุสารสกัด จากนั้นเปิดเครื่องระเหยระบบสุญญากาศ เพื่อทำการระเหยตัวทำละลายออก ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนตัวทำละลายระเหยไปจนหมด (พัชรินทร์และคณะ, 2548) สารที่ได้ เรียกว่า สารสกัด

3.4.1.4 การเตรียมตัวอย่างแคโรทีนอยด์เข้มข้น

นำสารสกัดที่ได้จากข้อ 3.4.1.3 มาทำปฏิกิริยาสะปอนิฟิเคชัน โดยชั่งสารสกัด 400 กรัม ใส่ลงในโถสำหรับทำปฏิกิริยา จากนั้นเติมเอทานอลลงไป 400 กรัม แล้วเติมสารละลายแอลกอฮอล์โซเดียมไฮดรอกไซด์ (เตรียมโดยผสมโซเดียมไฮดรอกไซด์ 400 กรัม กับเอทานอล 1,600 กรัม) ลงไปเพื่อให้เกิดปฏิกิริยา กวนผสมสารละลายทั้งหมดเข้าด้วยกันอย่างรวดเร็ว จากนั้นนำสารละลายไปเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จึงนำออกมาเติมเอทานอล 300 กรัม แล้วเติมเฮกเซนลงไป 1,000 มิลลิลิตร คนผสมเบาๆ ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 1 คืน จากนั้น นำออกมาเติมเฮกเซน 1,000 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นครั้งละ 1,000 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง เพื่อล้างสบู่และกลีเซอรินที่เกิดขึ้น แยกเอาสบู่และกลีเซอรินออก (พัชรินทร์และคณะ, 2548) จากนั้นนำแคโรทีนอยด์ที่ได้ไประเหยแยกตัวทำละลายออก โดยใช้เครื่องระเหยแบบสุญญากาศ จนตัวทำละลายระเหยไปจนหมด สารที่ได้ เรียกว่า แคโรทีนอยด์เข้มข้น

3.4.2 การศึกษาปริมาณที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาสะปอนิฟิเคชัน

นำสารสกัดที่ได้จากข้อ 3.4.1.3 มาเตรียมตัวอย่างแคโรทีนอยด์เข้มข้นตามข้อ 3.4.1.4 โดยใช้ปริมาณของโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้เตรียมสารละลายแอลกอฮอล์โซเดียมไฮดรอกไซด์ในการทำปฏิกิริยาแตกต่างกัน 5 ระดับ คือ

- โซเดียมไฮดรอกไซด์ 400 กรัม หรือเป็นการใช้ค่า 100%
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ 120 กรัม หรือเป็นการใช้ค่า 30%
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ 100 กรัม หรือเป็นการใช้ค่า 25%
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ 80 กรัม หรือเป็นการใช้ค่า 20%
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ 60 กรัม หรือเป็นการใช้ค่า 15%

ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ จากนั้นนำแคโรทีนอยด์เข้มข้นของแต่ละระดับไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ เพื่อหาความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ที่ได้ โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) วิเคราะห์ความผันแปร เมื่อพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ได้ทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan multiple-range test โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS V.10 (Montgomery, 1984)

วิธีการสร้างกราฟมาตรฐานบีตาแคโรทีน

สร้างกราฟมาตรฐานบีตาแคโรทีน ตามวิธีที่ดัดแปลงจาก AOAC (2002) ดังนี้

1. ชั่งบีตาแคโรทีนมาตรฐาน 0.0100 กรัม ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร ละลายด้วยเฮกเซนจำนวน 2.5 มิลลิลิตร
2. ปรับปริมาตรสารละลายในข้อ 1 ให้ครบ 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร ด้วยเฮกเซน
3. ปิเปตสารละลายในข้อ 2 มา 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 50 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร ด้วยเฮกเซน
4. ปิเปตสารละลายในข้อ 3 มา 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดปรับปริมาตร ปรับปริมาตรให้ครบ 25 มิลลิลิตร ด้วยเฮกเซน
5. นำสารละลายมาตรฐานบีตาแคโรทีนในข้อ 4 ทั้งหมด มาที่เตรียมไว้มาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer “Perkin Elmer” series Lambda 35, UK) ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร โดยใช้เฮกเซนเป็น blank บันทึกค่าที่วัดได้
6. นำค่าที่วัดได้มาเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณบีตาแคโรทีน (ppm) กับค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้ แล้วทำสมการเส้นตรงจากกราฟ

3.4.3 การศึกษาการลดสารเคมีที่ใช้ในการผลิตแคโรทีนอยด์

3.4.3.1 ศึกษาการใช้น้ำเพื่อทดแทนเอทานอลบางส่วนเพื่อเป็นตัวทำละลายต่างในการทำปฏิกิริยาสะปอนนิฟิเคชัน

นำสารสกัดที่ได้จากข้อ 3.4.3 มาเตรียมตัวอย่างแคโรทีนอยด์เข้มข้นตามข้อ 3.4.4 โดยใช้อัตราส่วนของสารละลายแอลกอฮอล์โซเดียมไฮดรอกไซด์แตกต่างกัน 4 ระดับ คือ

- เอทานอล 1,600 มิลลิลิตร หรือเป็นการใช้ เอทานอล 100%
- เอทานอล 1,280 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 320 มิลลิลิตร หรือเป็นการใช้ เอทานอล 80% และน้ำกลั่น 20%
- เอทานอล 1,120 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 480 มิลลิลิตร หรือเป็นการใช้ เอทานอล 70% และน้ำกลั่น 30%
- เอทานอล 960 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 640 มิลลิลิตร หรือเป็นการใช้ เอทานอล 60% และน้ำกลั่น 40%

ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ จากนั้นนำแคโรทีนอยด์เข้มข้นของแต่ละระดับไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ เพื่อหาความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ที่ได้ โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) วิเคราะห์ความผันแปร เมื่อพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ได้ทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan multiple-range test โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS V.10 (Montgomery, 1984)

3.4.4 ศึกษาปริมาณและคุณภาพของไขมัน สบู่และกลีเซอรินจากของเหลือทิ้งในกระบวนการผลิต

นำไขมันเหลือทิ้งจากข้อ 3.4.2 มาหาปริมาณและวิเคราะห์หาสมบัติทางกายภาพและเคมี ดังนี้

ก) ค่าความหนาแน่น

นำน้ำมันตัวอย่างที่ทราบปริมาตรแน่นอนไปชั่งน้ำหนักที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส จากนั้นคำนวณหาความหนาแน่นน้ำมันเป็นกรัมต่อมิลลิลิตร ตัวอย่างเป็นไขมันซึ่งเป็นของแข็งที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส จึงต้องนำไปอุ่นให้ร้อนจนเป็นของเหลวที่อุณหภูมิ 40 หรือ 60 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาหาความหนาแน่น (นิธิยา, 2548)

ข) ค่าดัชนีหักเห

วัดค่าดัชนีหักเห โดยวิธี ISO 6320 (2000) ดังนี้ นำตัวอย่างไขมันเหลืองที่ได้อจากการสกัดแคโรทีนอยด์จากน้ำมันปาล์มดิบ ไปทำให้เป็นของเหลวที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ทำการหยดเสกเซนลงไป 2-3 หยด บนเครื่องวัดดัชนีหักเห แล้วปล่อยให้แห้ง แล้วจึงหยดตัวอย่างลงไปบนเครื่องวัดดัชนีหักเห บันทึกค่าดัชนีหักเหและอุณหภูมิในการวัด นำค่าที่ได้มาคำนวณหาดัชนีหักเห (η_D^t) ตามสมการ

$$\eta_D^t = \eta_D^{t_1} + (t_1 - t) F$$

โดย η_D^t	=	ค่าดัชนีหักเห
$\eta_D^{t_1}$	=	ค่าดัชนีหักเหที่วัดได้จากเครื่อง
t_1	=	อุณหภูมิที่วัดได้ (องศาเซลเซียส)
t	=	อุณหภูมิอ้างอิง ในที่นี้เท่ากับ 40 องศาเซลเซียส
F	=	แฟลคเตอร์ ในที่นี้เท่ากับ 0.0036 (ที่อุณหภูมิอ้างอิง 40 องศาเซลเซียส)

ค) ค่าไอโอดีน

หาค่าไอโอดีน โดยวิธี AOAC (2000) ดังนี้ ชั่งตัวอย่างไขมันเหลืองที่ได้อจากการสกัดแคโรทีนอยด์จากน้ำมันปาล์มดิบ จำนวน 0.63-0.79 กรัมลงในพลาสติก เติมตัวทำละลายผสมไซโคลเฮกเซนอะซิติกลงไป 15 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันจนไขมันละลายหมด แล้วเติมสารละลายวิจันลงไป 25 มิลลิลิตร ปิดจุกพลาสติก แกว่งให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ในที่มืด ที่อุณหภูมิ 25 ± 5 องศาเซลเซียส จากนั้นนำพลาสติกออกมาเติมสารละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์ เข้มข้น 15% แกว่งให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่นลงไป 150 มิลลิลิตร แล้วนำมาไทเทรตด้วยสารละลายมาตรฐานโซเดียมไธโอซัลเฟต เข้มข้น 0.1 โมลาร์ จนสีของสารละลายเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นไม่มีสี เติมน้ำแข็ง 1-2 มิลลิลิตร และทำการไทเทรตต่อไปจนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นไม่มีสี ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ทำ blank เช่นเดียวกับตัวอย่าง บันทึกปริมาตรของโซเดียมไธโอซัลเฟตที่ใช้ แล้วนำมาคำนวณหาค่าไอโอดีน ตามสมการ

$$\text{ค่าไอโอดีน} = \frac{(B - S) \times M \times 12.69}{\text{น้ำหนักของไขมัน(กรัม)}}$$

โดย B	=	ปริมาตร (มิลลิลิตร) ของสารละลายมาตรฐาน โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ไทเทรต Blank
S	=	ปริมาตร (มิลลิลิตร) ของสารละลายมาตรฐาน โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ไทเทรตตัวอย่าง
M	=	ความเข้มข้น (โมลาร์) ของสารละลายมาตรฐาน โซเดียมไฮดรอกไซด์

ง) ค่าสะปอนิฟิเคชัน

หาค่าสะปอนิฟิเคชัน โดยวิธี AOAC (2000) ดังนี้ ชั่งไขมันเหลืองที่ 5 กรัม ใส่ลงในขวดก้นกลมสำหรับรีฟลักซ์ แล้วเติมสารละลายแอลกอฮอล์โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 50 มิลลิลิตร นำไปรีฟลักซ์บนเตาให้ความร้อน เป็นเวลา 30 นาที แล้วทำให้เย็น จากนั้นไปไทเทรตด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 0.5 นอร์มัล โดยใช้ฟีนอล์ฟทาเลอินเป็นอินดิเคเตอร์ ไทเทรตจนสารละลายเปลี่ยนจากสีชมพูเป็นไม่มีสี (เก็บสารละลายไว้หาค่าสารที่สะปอนิฟิเคชันไม่ได้) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ทำ blank เช่นเดียวกับตัวอย่าง บันทึกปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการไทเทรต แล้วนำมาคำนวณหาค่าสะปอนิฟิเคชัน ตามสมการ

$$\text{ค่าสะปอนิฟิเคชัน} = \frac{(b - a) \times 28.05}{\text{น้ำหนักของไขมัน(กรัม)}}$$

โดย b	=	ปริมาตร (มิลลิลิตร) ของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไทเทรต Blank
a	=	ปริมาตร (มิลลิลิตร) ของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไทเทรตตัวอย่าง

จ) ค่าสารที่สะปอนิไฟด์ไม่ได้

หาค่าสารที่สะปอนิไฟด์ไม่ได้ โดยวิธี AOAC (2000) เมื่อไทเทรตหาค่าสะปอนิฟิเคชันแล้ว นำสารละลายทั้งหมดในพลาสติกมาทำให้เป็นต่างอีกครั้ง โดยการเติมสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 3 โมลาร์ ลงไป 1 มิลลิลิตร แล้วเทสารละลายทั้งหมดลงกรวยแยก จากนั้นล้างพลาสติกด้วยน้ำกลั่น โดยปริมาตรของน้ำที่ใช้คือ 50 ลบด้วยปริมาตรกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.5 นอร์มัล ที่ใช้ในการไทเทรตหาค่าสะปอนิฟิเคชัน แล้วทำการสกัดสารละลายด้วยไดเอทิลอีเทอร์ครั้งละ 50 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง ไขเอาชั้นน้ำทิ้ง แล้วแยกสารละลายที่สกัดได้แต่ละครั้งไปรวมกันในกรวยแยกใบที่ 2 ที่มีน้ำกลั่นอยู่ 20 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมกัน ทิ้งไว้ให้แยกชั้น แล้วไขเอาชั้นน้ำออก ล้างสารละลายด้วยน้ำกลั่นครั้งละ 20 มิลลิลิตร

จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นล้างสารละลายด้วยสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ครั้งละ 20 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นครั้งละ 20 มิลลิลิตร อีกอย่างน้อย 2 ครั้ง จนน้ำที่ล้างไม่เป็นค่าต่อสารละลายฟีนอล์ฟทาเลินที่หยดลงไป เทสารละลายลงในพลาสติกหรือ ปีกเกอร์ที่ทราบน้ำหนักแน่นอน ระเหยเอาไคเอทิลอีเทอร์ออกจนแห้งสนิทโดยใช้ตู้อบลมร้อน ที่ อุณหภูมิไม่เกิน 80 องศาเซลเซียส จนได้น้ำหนักคงที่ ชั่งน้ำหนักที่ได้ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และ คำนวณหาปริมาณของสารที่สะปอนิไฟด์ไม่ได้ ทำการทดสอบเพื่อยืนยันโดยการละลายสารที่ สะปอนิไฟด์ไม่ได้ในแอลกอฮอล์ แล้วไทเทรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 นอร์มัล ซึ่งจะใช้ไม่เกิน 0.1 มิลลิลิตร ในการทำให้กรดไขมันอิสระที่ปนอยู่ในสารที่สะปอนิไฟด์ ไม่ได้เป็นกลางพอดี

ฉ) ค่าความเป็นกรด

หาค่าความเป็นกรด โดยวิธี AOAC (2000) ดังนี้ ชั่งน้ำมัน 7.05 กรัม เติมสารละลาย แอลกอฮอล์ที่ปรับให้เป็นกลางแล้ว 50 มิลลิลิตร ไทเทรตด้วยสารละลายมาตรฐานโซเดียม ไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.25 โมลาร์ จนได้สีชมพูคงที่นาน 1 นาที ซึ่งปริมาตร (มิลลิลิตร) ของ สารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ได้จะเท่ากับ %กรดไขมันอิสระในรูปกรดโอเลอิกที่มี ในตัวอย่าง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ บันทึกปริมาตรของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ ในการไทเทรต แล้วนำมาคำนวณหาค่าความเป็นกรด ตามสมการ

$$\text{ค่าความเป็นกรด} = \% \text{ กรดไขมันอิสระ (ในรูปกรดโอเลอิก)} \times 1.99$$

ช) ค่าเพอร์ออกไซด์

หาค่าเพอร์ออกไซด์ โดยวิธี AOAC (2000) ดังนี้ ชั่งตัวอย่างไขมันเหลืองที่ประมาณ 5 ± 0.5 กรัม ลงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายผสมอะซิติกคลอโรฟอร์ม 30 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เติมสารละลายอิ่มตัวโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 0.5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที โดยเขย่าเป็นครั้งคราว เติมน้ำกลั่นลงไป 30 มิลลิลิตร ไทเทรตด้วยสารละลายโซเดียม ไฮโอซัลเฟตเข้มข้น 0.1 โมลาร์ จนสีเหลืองเกือบหายไป จึงเติมน้ำแข็งเข้มข้น 1% ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ไทเทรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮโอซัลเฟตเข้มข้น 0.1 โมลาร์ จนสารละลายเปลี่ยน จากสีฟ้าเป็นไม่มีสี ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ทำ blank เช่นเดียวกับตัวอย่าง บันทึกปริมาตรของ สารละลายโซเดียมไฮโอซัลเฟตที่ใช้ในการไทเทรต แล้วนำมาคำนวณหาค่าเพอร์ออกไซด์ ตาม สมการ

$$\text{ค่าเพอร์ออกไซด์ (มิลลิกรัมสมมูลต่อกิโลกรัม)} = S \times N \times \frac{1,000}{W}$$

โดย S = ปริมาตร (มิลลิลิตร) ของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ไทเทรต
ตัวอย่าง - ปริมาตร (มิลลิลิตร) ของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้
ไทเทรต Blank

N = ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (โมลาร์)

W = น้ำหนัก (กรัม) ของตัวอย่าง

ข) ปริมาณน้ำ

หาปริมาณน้ำ โดยวิธี AOAC (2002) ดังนี้ ชั่งตัวอย่างประมาณ 0.5 กรัม ที่มีน้ำอยู่ 25-50 มิลลิกรัม ใส่ลงในภาชนะสำหรับชั่ง จากนั้นบันทึกน้ำหนักของตัวอย่างและภาชนะ (W) แล้วนำตัวอย่างใส่ลงในพลาสติกสำหรับไทเทรตผ่าน septum stopper โดยชั่งภาชนะที่บรรจุตัวอย่างด้วย (T) จากนั้นทำให้เป็นเนื้อเดียวกันที่ 24,000 รอบต่อนาที ลบน้ำหนักของตัวอย่างและภาชนะ ด้วยน้ำหนักของภาชนะบรรจุ บันทึกค่าที่ได้ (W-T) หลังจากทำให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้ว นำตัวอย่างใส่ในเครื่องคาร์ลฟีชเชอร์ไคเตรชัน อ่านค่าปริมาณน้ำ (%) จากเครื่อง โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

ค) ปริมาณสบู่

หาปริมาณสบู่ โดยวิธี AOCS (2004) ดังนี้ เติมโบรมิโนฟีนอลบลูอินดิเคเตอร์ 0.5 มิลลิลิตร ลงในสารละลายอะซีโตน และไทเทรตด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 0.01 นอร์มัล หรือไทเทรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 0.01 นอร์มัล จนสีของสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลือง จากนั้นชั่งไขมันเหลืองที่ 40 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมน้ำ 1 มิลลิลิตร ให้ความร้อนและผสมให้เข้ากันอย่างต่อเนื่อง เทสารละลายสีเหลืองที่เตรียมไว้ใส่ลงไป 50 มิลลิลิตร ให้ความร้อน เขย่า และตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น หากมีสบู่ในตัวอย่าง ชั้นบนจะเป็นสีเขียวหรือฟ้า จากนั้น ค่อยๆเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 0.01 นอร์มัล จนสีของสารละลายเปลี่ยนจากสีเขียวหรือฟ้าไปเป็นสีเหลือง เขย่าและเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกลงไปอีก จนกระทั่งสีของสารละลายเปลี่ยนไปเป็นสีเหลืองถาวร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ทำ blank เช่นเดียวกับตัวอย่าง บันทึกปริมาตรของสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ แล้วนำมาคำนวณหาปริมาณสบู่ (ppm) ตามสมการ

$$\text{ปริมาณสบู่ (ในรูปของโซเดียมโอเลต)} = \frac{(ml_s - ml_b) \times N \times 304,400}{\text{น้ำหนักของตัวอย่าง(กรัม)}}$$

โดยที่ ml_s = ปริมาตร (มิลลิลิตร) ของสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไทเทรตตัวอย่าง

ml_b = ปริมาตร (มิลลิลิตร) ของสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไทเทรต blank

N = ความเข้มข้น (นอร์มัล) ของสารละลายกรดไฮโดรคลอริก

ญ) จุดขุ่น

นำไขมันเหลืองที่ได้จากการสกัดแคโรทีนออกจากน้ำมันปาล์มดิบไปทำให้ร้อนจนถึงอุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส ปล่อยให้เย็นลง แล้วบันทึกอุณหภูมิที่เริ่มเกิดผลึกหรืออุณหภูมิที่มองไม่เห็นเทอร์โมมิเตอร์ที่แช่ในน้ำมัน (นิธิยา, 2548)

ฎ) ปริมาณบีตาแคโรทีน

หาปริมาณบีตาแคโรทีน โดยวิธี BS 684 (1977) ดังนี้ ชั่งตัวอย่างไขมันเหลืองทั้ง 1 กรัม ใส่ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร เจือจางด้วยไซโคลเฮกเซน นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 445 นาโนเมตร โดยใช้ไซโคลเฮกเซนเป็น Blank บันทึกผล จากนั้นนำมาคำนวณหาปริมาณบีตาแคโรทีน ตามสมการ

$$\text{ปริมาณบีตาแคโรทีน} = \frac{383E}{Ic}$$

โดยที่ E = ค่าการดูดกลืนแสงที่ต่างกันระหว่างตัวอย่างและ blank

I = ความกว้างของเซลล์ (เซนติเมตร)

c = ความเข้มข้นที่ใช้วัด (g/100 ml)

นำสบู่ จากข้อ 3.4.1.4 มาแยกออกจากกลีเซอรินโดยนำสารละลายผสมมา 1,000 กรัม จากนั้นเติมโซเดียมคลอไรด์ 1 กรัม ให้ความร้อนจนกระทั่งสารละลายแยกเป็น 2 ชั้น จากนั้นนำสารชั้นบนที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณและวิเคราะห์หาสมบัติทางกายภาพและเคมี ดังนี้

ฎ) ปริมาณไฮดรอกไซด์อิสระ

หาปริมาณไฮดรอกไซด์อิสระ โดยวิธี ISO 456 (1973) ดังนี้ ตวงเอทานอล 200 กรัม ลงขวดก้นกลมที่ต่อกับซุcriฟลักซ์ ทำการรีฟลักซ์บนเตาให้ความร้อน นาน 5 นาที เพื่อไล่ก๊าซ คาร์บอนไดออกไซด์ออก หยุดให้ความร้อนจนอุณหภูมิลดลงเหลือประมาณ 70 องศาเซลเซียส เติม สารละลายฟีนอล์ฟธาไลน์ลงไป 4 หยด ทำให้เป็นกลางด้วยสารละลายเอทานอลิกโพแทสเซียม ไฮดรอกไซด์ จนสีของสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพู เติมตัวอย่างลงไป 5 กรัม ทำการรีฟลักซ์จน ตัวอย่างละลายหมด หยุดให้ความร้อนจนอุณหภูมิลดลงเหลือประมาณ 70 องศาเซลเซียส นำมา ไทเทรตด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกจนสีของสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพูอย่างถาวร บันทึก ปริมาตรของสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ นำมาคำนวณหาปริมาณไฮดรอกไซด์อิสระ ตามสมการ

$$\text{ปริมาณไฮดรอกไซด์อิสระในสบู่ (\%)} = 0.040 \times V \times T \times \frac{100}{m}$$

โดย m = น้ำหนัก (กรัม) ของตัวอย่าง
 V = ปริมาตร (มิลลิลิตร) ของสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไทเทรต ตัวอย่าง
 T = ความเข้มข้น (นอร์มัล) ของสารละลายกรดไฮโดรคลอริก

จ) ปริมาณไขมันทั้งหมด

หาปริมาณไขมันทั้งหมด โดยวิธี ISO 685 (1975) ดังนี้ ละลายตัวอย่าง 5 กรัม ด้วยน้ำ ร้อน 100 มิลลิลิตร แล้วเทสารละลายลงกรวยแยกที่ และล้างปีกเกอร์ด้วยน้ำกลั่นปริมาณเล็กน้อย เทน้ำที่ล้างลงกรวยแยกที่ 1 เติมสารละลายเมทิลออเรนจ์ลงไป 2-3 หยด เขย่าและเติมสารละลาย กรดซัลฟิวริกหรือไฮโดรคลอริก บันทึกปริมาตรที่ใช้ ทำให้เย็น จนมีอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เติมปิโตรเลียมอีเทอร์ลงไป 100 มิลลิลิตร เขย่าและเปิดจุก ทำจนสารละลายชั้นน้ำใส เทชั้นน้ำลง กรวยแยกที่ 2 สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ 50 มิลลิลิตร อีก 3 ครั้ง รวมชั้นสารละลายที่มีปิโตรเลียม อีเทอร์ แล้วเทลงกรวยแยกที่ 1 แล้วเทสารละลายลงขวดกลมก้นแบนที่ทราบน้ำหนักแน่นอน ล้าง กรวยแยกด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ปริมาณเล็กน้อย กรองและล้างกระดาษกรองด้วยสารละลาย ปิโตรเลียมอีเทอร์ เทลงขวด ระเหยสารละลายปิโตรเลียมอีเทอร์ โดยใช้อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ เติม เอทานอลลงไป 20 มิลลิลิตร เติมสารละลายฟีนอล์ฟธาไลน์ลงไป 2-3 หยด และไทเทรตด้วย สารละลายเอทานอลิกโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ จนสีของสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพูถาวร ทำการ

ทดลอง 3 ซ้ำ บันทึกปริมาตรสารละลายเอทานอลิกโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ แล้วทำการระเหยสารละลายเอทานอลิกโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์โดยใช้อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ เมื่อระเหยใกล้หมด ให้หมุนขวดเพื่อกระจายสบู่ที่อยู่ชั้นบน เติมอะซีโตนลงไป และระเหยอะซีโตนออกโดยใช้อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ โดยการควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 103 ± 2 องศาเซลเซียสนานประมาณ 15 นาที ทำให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วนำสารที่เหลือไปชั่งหาน้ำหนัก นำมาคำนวณหาปริมาณไขมันทั้งหมด ตามสมการ

$$\text{ปริมาณไขมันทั้งหมด (\%)} = \frac{[m_1 - (V \times T \times 0.038)] \times 100}{m_0}$$

โดย m_0 = น้ำหนัก (กรัม) ของตัวอย่าง
 m_1 = น้ำหนัก (กรัม) ของสารที่เหลือ
 V = ปริมาตร (มิลลิลิตร) ของสารละลายเอทานอลิกโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์
 T = ความเข้มข้น (นอร์มัล) ของสารละลายเอทานอลิกโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์

ท) ปริมาณกรดไขมันอิสระ

หาปริมาณกรดไขมันอิสระ โดยวิธี BS 1715 (1989) ดังนี้ ชั่งตัวอย่าง 5 กรัม ลงพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ใบที่ 1 ให้ความร้อนเอทานอล 100 มิลลิลิตร ที่อยู่ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ใบที่ 2 เมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 70 องศาเซลเซียส ทำให้เป็นกลางด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ โดยใช้ฟีนอล์ฟธาไลน์ 0.5 มิลลิลิตร เป็นอินดิเคเตอร์ เทสารละลายลงพลาสติกใบที่ 1 เขย่าให้ตัวอย่างกับสารละลายเข้ากัน ควบคุมอุณหภูมิที่ 70 องศาเซลเซียส และไทเทรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ บันทึกปริมาตรสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ แล้วนำมาคำนวณหาปริมาณกรดไขมันอิสระ ตามสมการ

$$\text{ปริมาณกรดไขมันอิสระ (\%)} = \frac{V \times M \times 0.01}{m}$$

โดย V = ปริมาตร (มิลลิลิตร) ของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไทเทรตตัวอย่าง
 M = มวลโมเลกุลสัมพัทธ์ ในที่นี้ เท่ากับ 256
 m = น้ำหนัก (กรัม) ของตัวอย่าง

นำกลีเซอรินจากข้อ 3.4.1.4 มาแยกออกจากสบู่ โดยนำสารละลายผสมมา 1,000 กรัม จากนั้นเติมโซเดียมคลอไรด์ 1 กรัม ให้ความร้อนจนกระทั่งสารละลายแยกเป็น 2 ชั้น นำชั้นล่างมา ให้ความร้อนเพื่อระเหยน้ำออก จากนั้นนำสารละลายที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณและวิเคราะห์หาสมบัติทางกายภาพและเคมี ดังนี้

ณ) ปริมาณกลีเซอรอล

หาปริมาณกลีเซอรอล โดยวิธี ISO 2879 (1975) ดังนี้ ชั่งตัวอย่าง 0.5 กรัมลงใน ฟลาสก์ หยดฟีนอล์ฟธาไลนลงไป 2 หยด แล้วไทเทรตด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก จนสารละลาย เปลี่ยนเป็นไม่มีสี เติมสารละลายกรดซัลฟิวริกลงไป 5 มิลลิลิตร นำไปต้มให้เดือดเป็นเวลา 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เทสารละลายลงในบีกเกอร์ขนาด 600 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 250 มิลลิลิตร ปรับ pH ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 0.05 นอร์มัล ให้อยู่ในช่วง 7.9 ± 0.1 โดยใช้เครื่องวัดค่าความเป็นกรดต่าง เติมสารละลายโซเดียมเมตาเพอริโอเดด 50 มิลลิลิตร กวนผสมให้เข้ากัน ปิดบีกเกอร์ด้วยกระดาษฟิวส์ ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาที อุณหภูมิไม่เกิน 35 องศาเซลเซียส เติมเอทิลีนไกลคอลลงไป 10 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 20 นาที อุณหภูมิไม่เกิน 35 องศาเซลเซียส เติมโซเดียมฟอร์เมต 5 มิลลิลิตร และไทเทรตด้วยสารละลาย โซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 0.125 นอร์มัล ให้มี pH อยู่ในช่วง 7.9 ± 0.2 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ทำ blank เช่นเดียวกับตัวอย่าง บันทึกปริมาตรสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ แล้วนำมา คำนวณหาปริมาณกลีเซอรอล ตามสมการ

$$\text{ปริมาณกลีเซอรอล (\%)} = 1.151 \frac{(V_1 - V_2)}{m}$$

โดย V_1 = ปริมาตร (มิลลิลิตร) ของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไทเทรตตัวอย่าง
 V_2 = ปริมาตร (มิลลิลิตร) ของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไทเทรต Blank
 m = น้ำหนัก (กรัม) ของตัวอย่าง

ณ) ปริมาณเถ้า

หาปริมาณเถ้า โดยวิธี ISO 2098 (1972) ดังนี้ ชั่งตัวอย่าง 5-100 กรัม ลงบนจานที่ทราบน้ำหนักแน่นอน ให้ความร้อนกับจานที่มีตัวอย่างอยู่ จนไหม้เป็นควันและเหลือเป็นเถ้าถ่าน

ทำให้เย็น นำจานไปเผาในเตาเผาแก้ว ที่อุณหภูมิ 750 ± 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำให้เย็นในโถดูดความชื้น บันทึกน้ำหนักที่ได้ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วนำมาคำนวณหาปริมาณแก้ว ตามสมการ

$$\text{ปริมาณแก้ว} = \frac{m_2 - m_1}{m_3 - m_1} \times 100$$

โดย m_1 = น้ำหนัก (กรัม) ของจาน
 m_2 = น้ำหนัก (กรัม) ของจานและแก้ว
 m_3 = น้ำหนัก (กรัม) ของจานและตัวอย่าง

ด) ค่าความเป็นกรด-ด่าง

หาค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยวิธี Yong (2001) ดังนี้ ชั่งตัวอย่าง 20 กรัม เติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยเครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง

ต) ปริมาณสบู่

หาปริมาณสบู่ โดยวิธี Yong (2001) ดังนี้ ละลายตัวอย่าง 1 กรัม ในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร หยดสารละลายโบรมอฟีนอลบลูอินดิเคเตอร์ ลงไป 2-3 หยด แล้วนำไปไทเทรตด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก จนสารละลายกลายเป็นสีเหลืองม่วงถาวร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วคำนวณหาปริมาณสบู่ ตามสมการ

$$\text{ปริมาณสบู่} = \frac{N \times V \times 15}{m}$$

โดย N = ความเข้มข้น (นอร์มัล) ของสารละลายกรดไฮโดรคลอริก

V = ปริมาตร (มิลลิลิตร) ของสารละลายไฮโดรคลอริกที่ใช้

m = น้ำหนัก (กรัม) ของตัวอย่าง

3.4.5 เปรียบเทียบต้นทุนและมูลค่าของผลผลิตที่ได้จากการสกัดแคโรทีนอยด์จากน้ำมันปาล์มดิบก่อนและหลังการลดสารเคมี

กระบวนการสกัดแคโรทีนอยด์จากน้ำมันปาล์มดิบ มีการใช้วัตถุดิบและสารเคมี ได้แก่ น้ำมันปาล์มดิบ เอทานอล เฮกเซน โซเดียมไฮดรอกไซด์ และโซเดียมคลอไรด์ ส่วนผลผลิตที่ได้คือ แคโรทีนอยด์ เอทานอลที่ได้กลับคืน เฮกเซนที่ได้กลับคืน ไบโอมัน สบู่ และกลีเซอริน การศึกษานี้ได้ทำการคำนวณต้นทุนและมูลค่าของผลผลิตที่ได้จากวิธีเดิม ซึ่งไม่มีการลดปริมาณสารเคมี (เอทานอล 100% ร่วมกับการใช้ต่าง 100%), วิธีการลดต่างลง 75% (เอทานอล 100% ร่วมกับการใช้ต่าง 25%) และวิธีการลดเอทานอลลง 40% และลดต่างลง 10% (วิธีการใช้เอทานอล 60% ผสมน้ำ 40% ร่วมกับการใช้ต่าง 90%) เพื่อเปรียบเทียบต้นทุนและมูลค่าของผลผลิตที่ได้จากกระบวนการสกัดแคโรทีนอยด์จากน้ำมันปาล์มดิบทั้ง 3 วิธี