บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.1.1 เครื่องมือ

1) เครื่องโครมาโตกราฟชนิดของเหลวประสิทธิภาพสูง (High Performance Liquid Chomatograph)

ยี่ห้อ Waters® รุ่น CWS V.17, USA

คอลัมน์ : ODS-3 ความกว้างขนาด 250 ความยาว 4.6 มิลลิเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 5 ไมโครเมตร

เฟสเคลื่อนที่ : อะซีเตตบัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5-4.6 เมทานอลอัตราส่วน 60 : 40

อัตราการไหล : 1.0 มิลลิลิตร/นาที

ปริมาตรการฉีด/ครั้ง: 20 ไมโครลิตร

เครื่องแปลผลยูวีที่ความยาวคลื่น : 235 นาโนเมตร

หน่วยการดูดกลืนแสงเต็มสเกล(AUFS) : 0.2000

ช่อง (CHNL) : 3

2) เครื่องวิเคราะห์ความเป็นกรดด่าง (pH- meter) ยี่ห้อ SCHOTT-GERATE® รุ่น CG 804, GERMANY

3) เครื่องกวนไฟฟ้า (magnatic stirrer with TFE – coated stirring bar) VELP SCIENTIFICA® รุ่น Are 2 ,Italy

4) เครื่องปั่นไฟฟ้า (blender moulinex) ยี่ห้อ moulinate® รุ่น 643 , MEXICO

5) เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (analytical balance) ยี่ห้อ CE รุ่น HM-200 , JAPAN

6) อ่างน้ำความถี่สูง (ultrasonic bath) ยี่ห้อ BRANSON® รุ่น BRANSON 3200 , USA

7) อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ยี่ห้อ memmert® รุ่น W 760, GERMANY

8) ตู้อบลมร้อน (hot air oven) ยี่ห้อ memmert® รุ่น U40 class 2 , GERMANY

9) เครื่องผสมของเหลวแบบหมุนวน (vortex mixer) ยี่ห้อ Vortex GENIE 2® รุ่น O-560E, USA

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.1.2 เครื่องแก้ว

1) ปิเปตขนาด 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 และ10.0 มิลลิลิตร

2) ขวดรูปชมพู่ ขนาด 125, 250 และ 1,000 มิลลิลิตร

3) ขวดวัดปริมาตร ขนาด 50, 100, 1,000 และ 2,000 มิลลิลิตร

4) กระบอกตวงขนาด 100, 250, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร

5) บีกเกอร์ขนาด 50, 100, 1,000 และ 2,000 มิลลิลิตร

6) กรวยกรอง

7) หลอดหยดพร้อมลูกยาง

8) กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 42

9) ชุดกรองเมมเบรนเส้นผ่าศูนย์กลาง ขนาด 13 มิลลิเมตร และ 47 มิลลิเมตร พร้อมแผ่นกรองชนิด ไนลอน 66 ขนาด 0.5 ไมโครเมตร

3.1.3 สารเคมี

1) เมทานอล (methanol: AR,Merck®, Germany)

2) แอมโมเนียมอะซีเตต (ammonium acetate:AR,Merck®, Germany)

3) โพแทสเซียม เฟอร์โรไซยาไนด์ (potassium ferrocyanide:AR,Fisher chemicals®, England)

4) ซิงค์ อะซีเตต (zinc acetate:Merck®, Germany)

5) โซเดียม ซาลิไซเลต (sodium salicylate:Merck®, Germany)

6) โซเดียม เบนโซเอต (sodium benzoate:Fluka chemika®, Switzerland)

7) โพแทสเซียม ซอร์เบต (potassium sorbate:AR,Merck®, Germany)

8) กรดอะซีติค (acetic acid gracial:Merck® , Germany)

9) น้ำกลั่น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.1.4 กลุ่มตัวอย่าง

เครื่องดื่มน้ำผลไม้บรรจุปิดสนิทของผู้ประกอบการในเขตอำเภอเมืองจังหวัดเชียงใหม่ 21 ตัวอย่าง ได้แก่ น้ำส้ม 9 ยี่ห้อ น้ำฝรั่ง 2 ยี่ห้อ น้ำมะเกี๋ยง 2 ยี่ห้อ น้ำมะขาม 2 ยี่ห้อ น้ำสตรอเบอร์รี่ 1 ยี่ห้อ น้ำลิ้นจี่ 1 ยี่ห้อ ทั้งหมด 21 ตัวอย่าง และเครื่องดื่มน้ำผลไม้ปิดสนิทของผู้ประกอบการนอกเขตอำเภอเมืองจังหวัดเชียงใหม่ 10 ตัวอย่าง ได้แก่ น้ำส้ม 4 ยี่ห้อ น้ำสับปะรด 2 ยี่ห้อ น้ำสตรอเบอร์รี่ 2 ยี่ห้อ น้ำเสาวรส และน้ำลิ้นจี่ โดยเก็บตัวอย่างน้ำผลไม้ที่ผลิต 3 ช่วงเวลา คือ

เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2547 ถึง เดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2548 เดือนมีนาคม ถึง เดือนเมษายน พ.ศ. 2548 และ เดือนพฤษภาคม ถึง เดือนตุลาคม พ.ศ. 2548หลังจากนั้นนำตัวอย่างน้ำผลไม้ทั้งหมดมาวิเคราะห์หาปริมาณกรดซอร์บิค กรดเบนโซอิค และกรดซาลิไซลิค ตามวิธี HPLC หาปริมาณความชื้นและของแข็งทั้งหมด โดยตู้อบลมร้อน (hot air oven) ตามวิธีของ AOAC (2000) วัดค่าความเป็นกรดด่าง โดยเครื่องวิเคราะห์ค่าความเป็นกรดด่าง (pH-meter) และหาปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ทั้งหมด ตามวิธีของ AOAC (2000)

3.2 วิธีการทดลอง

การศึกษาปริมาณกรดเบนโซอิค กรดซอร์บิคและกรดซาลิไซลิคในเครื่องดื่มบรรจุปิดสนิทที่ผลิตในเขตและนอกเขตอำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ มีขั้นตอนดังนี้

3.2.1. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

1) กรดซาลิไซลิค 5,000 ส่วนในล้านส่วน

ละลายโซเดียมซาลิไซเลต 0.5796 กรัม ด้วยน้ำ ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร (น้ำหนักโซเดียมซาลิไซเลต คิดตามความบริสุทธิ์ เช่นโซเดียมซาลิไซเลต มีความบริสุทธิ์ 99.76 เปอร์เซ็นต์ ต้องชั่งน้ำหนักเป็น 0.5810 กรัม

2) กรดเบนโซอิค 5,000 ส่วนในล้านส่วน

ละลายโซเดียมเบนโซเอต 0.5900 กรัม ด้วยน้ำปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร (น้ำหนักเบนโซเอตคิดตามความบริสุทธิ์เช่น เบนโซเอตมีความบริสุทธิ์ 99.59 เปอร์เซ็นต์ ต้องชั่งน้ำหนักเป็น 0.5927 กรัม)

3) กรดซอร์บิค 5,000 ส่วนในล้านส่วน

ละลายซอร์บิคแอซิคโพแทสเซียมซอล 0.6699 กรัม ด้วยน้ำปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร (น้ำหนักซอร์บิคแอซิคโพแทสเซียมซอลคิดตามความบริสุทธิ์ซอร์บิคแอซิคโพแทสเซียมซอลมีความบริสุทธิ์ 98.94 เปอร์เซ็นต์ ต้องชั่งน้ำหนักเป็น 0.6771กรัม)

4) ผสมสารละลายมาตรฐาน 1,000 ส่วนในล้านส่วนปิเปตสารละลาย ในข้อ 1, 2, 3 มาอย่างละ 10.0 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 50 มิลลิลิตร

5) ผสมสารละลายมาตรฐาน 10, 30, 50, 70 และ 90 ส่วนในล้านส่วน

5.1) ปิเปตสารละลายข้อ 4) มา 1.0, 3.0, 5.0, 7.0 และ 9.0 มิลลิลิตร ในแต่ละขวดวัดปริมาตร ขนาด 100 มิลลิลิต

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

5.2) เติมสารละลายสกัด ประมาณ 80 มิลลิลิตร เติม carrez I และ carrez II อย่างละ 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ถึงขีดด้วย สารละลายสกัด เขย่าให้เข้ากัน

5.3) ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที กรองด้วยกระดาษกรอง เบอร์ 42 แล้วกรองด้วย แผ่นกรองเมมเบรน ขนาด 0.45 ไมโครเมตร

3.2.2. การเตรียมสารละลายสำหรับสกัดตัวอย่าง

1) สารละลายเมทานอลกรองด้วยแผ่นกรองเมมเบรนขนาด 0.45 ไมโครเมตร

2) สารละลายแอมโมเนียมอะซีเตตบัฟเฟอร์มีค่าความเป็นกรดด่าง 4.5-4.6 ละลายแอมโมเนียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ปริมาณ 1.5435 กรัม ในบีกเกอร์ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร1,900 มิลลิลิตรปรับความเป็นกรดด่างด้วยกรดอะซีติคจนได้ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5-4.6 แล้วปรับให้ได้ปริมาตร 2,000 มิลลิลิตร กรองด้วยแผ่นกรองเมมเบรน ขนาด 0.45 ไมโครเมตร

3) สารละลายสกัดโดยนำสารละลายในข้อ 2) มา 60 ส่วน ผสมให้เข้ากับสารละลายในข้อ 1) จำนวน 40 ส่วน

4) สารละลายเฟสเคลื่อนที่โดยนำสารละลายข้อ 2) มา 60 ส่วน ผสมให้เข้ากับสารละลายในข้อ 1) จำนวน 40 ส่วน

5) สารละลาย Carrez I ละลาย โพแทสเซียมเฟอร์โรไซยาไนด์ 150 กรัม ด้วยน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

6) สารละลาย Carrez II ละลายซิงค์อะซีเตต 230 กรัม ด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

3.2.3 การสกัดและวิเคราะห์ปริมาณกรกเบนโซอิค กรดซอร์บิคและกรดซาลิไซลิคในตัวอย่าง

1) การเตรียมตัวอย่างโดยสุ่มตัวอย่างมาอย่างน้อย 50 เปอร์เซนต์เขย่าตัวอย่างให้เข้ากัน แบ่งใส่ภาชนะที่สะอาดและมีฝาปิด

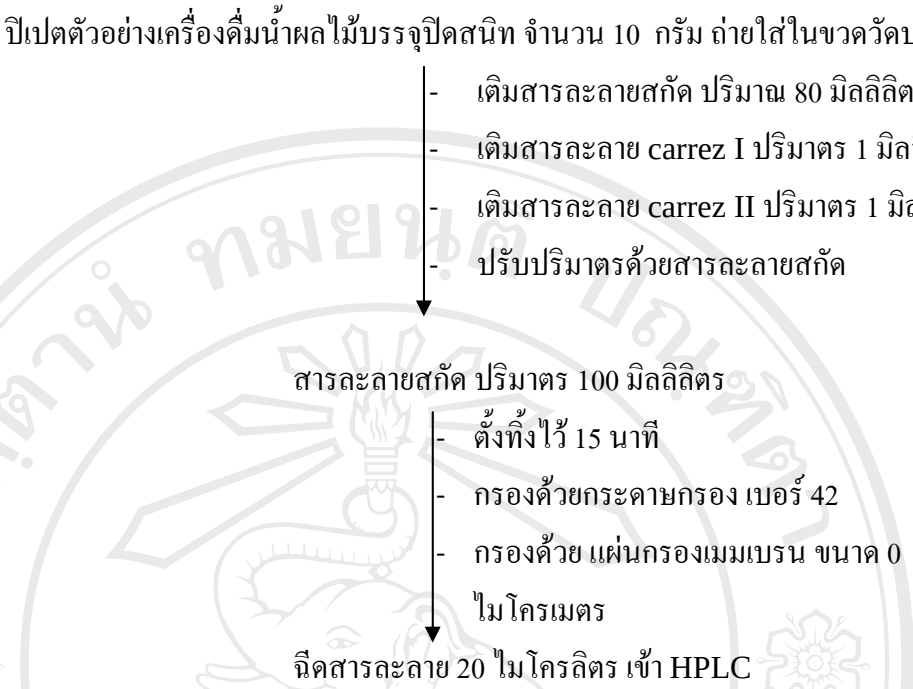
2) ปิเปตตัวอย่างเครื่องดื่มน้ำผลไม้บรรจุปิดสนิทปริมาณ 10 กรัม ถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร

3) เติมสารละลายสกัด ประมาณ 80 มิลลิลิตร เติมสารละลาย carrez I และสารละลาย carrez II อย่างละ 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ถึงขีดด้วยสารละลายสกัด เขย่าให้เข้ากัน

4) ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที กรองด้วยกระดาษกรอง เบอร์ 42 แล้งกรองด้วยแผ่นกรองเมมเบรน ขนาด 0.45 ไมโครเมตร

5) ฉีดสารละลายเข้าเครื่อง HPLC ปริมาตร 20 ไมโครลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 3.1 ขั้นตอนการหาปริมาณกรดเบนโซอิค กรดซอร์บิค และกรดซาลิไซลิคในเครื่องดื่มบรรจุปิดสนิทที่ผลิตนอกเขต จังหวัดเชียงใหม่

3.2.4. การคำนวณปริมาณกรดเบนโซอิค กรดซอร์บิค และกรดซาลิไซลิค

คำนวณจากกราฟมาตรฐานของ สารละลายมาตรฐาน โดยหาค่าความชัน (slope) และจุดตัดแกน Y (intercept)

จากสมการเส้นตรง $Y = AX + B$

A = ความชัน (slop)

B = ส่วนของพื้นที่ของกราฟเหลื่อมซ้อนกัน (intercept)

X = ปริมาณที่พบ (มิลลิกรัม/กิโลกรัม)

Y = พื้นที่ใต้กราฟหรือความสูงกราฟของตัวอย่างที่วิเคราะห์

V_f = ปริมาตรสุดท้าย (มิลลิลิตร)

D = การเจือจาง (dilution)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ความเข้มข้นที่แน่นอนคำนวณจาก

$$X = \left[\frac{Y - B}{A} \right] \times \frac{V_f D}{wt}$$; wt = น้ำหนักของตัวอย่าง (กรัม)

3.2.5 การหาเปอร์เซ็นต์การคืนกลับ

1) ชั่งตัวอย่างเครื่องดื่มน้ำผลไม้บรรจุปิดสนิท A ปริมาณ 10 กรัม ถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร

2) เติมสารละลายมาตรฐานกรดเบนโซอิค เข้มข้น 30 ส่วนในล้านส่วน ปริมาตร 3 มิลลิลิตร

3) เติมสารละลายสกัด ประมาณ 80 มิลลิลิตร เติมสารละลาย carrez I และสารละลาย carrez II อย่างละ 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ถึงขีดด้วยสารละลายสกัดเขย่าให้เข้ากัน

4) ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที กรองด้วยกระดาษกรอง เบอร์ 42 แล้งกรองด้วย กรองด้วยแผ่นกรองเมมเบรน ขนาด 0.45 ไมโครเมตร

5) ฉีดสารละลายเข้าเครื่อง HPLC ปริมาตร 20 ไมโครลิตร

6) คำนวณปริมาณตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานกรดเบนโซอิค

7) คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การคืนกลับ

$$\text{เปอร์เซ็นต์การคืนกลับ} = \left[\frac{\text{ปริมาณตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐาน} - \text{ปริมาณตัวอย่างที่ไม่เติมสารละลายมาตรฐาน}}{\text{จำนวนไมโครกรัมของ สารมาตรฐานที่เติม/น้ำหนักตัวอย่างเป็นกรัมที่เติมสารละลายมาตรฐาน}} \right] \times 100$$

หมายเหตุ การหาเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของกรดซอร์บิค และกรดซาลิไซลิค สามารถคำนวณเช่นเดียวกันกับกรดเบนโซอิค

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.6. การวิเคราะห์ทางเคมี

1) ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) โดยใช้ pH-meter ; SCHOTT-GERATE® รุ่น CG 804, Germany

2) ปริมาณความชื้น (Moisture Content) และของแข็งทั้งหมด (Total Solid)โดยใช้ตู้อบลมร้อนตามวิธี AOAC (2000)

3) ปริมาณกรดที่ไตเตรตได้ทั้งหมด (Total Titrable Acidity) ตามวิธี AOAC (2000)

3.2.7. วิธีวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิจัยครั้งนี้เป็นการเก็บตัวอย่างแบบสำรวจ หลังจากตรวจวิเคราะห์แล้วนั้น นำข้อมูลมาวิเคราะห์ความแปรปรวนที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ตามโปรแกรม SPSS (วิเชียร, 2541) เพื่อทำให้ทราบถึงความแตกต่างของชนิดและปริมาณกรดเบนโซอิค กรดซอร์บิคและกรดซาลิไซลิค ในน้ำผลไม้บรรจุปิดสนิททั้ง 3 ช่วงการผลิต คือ เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2547 ถึง เดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2548 เดือนมีนาคม ถึง เดือนเมษายน พ.ศ. 2548 และ เดือนพฤษภาคม ถึง เดือนตุลาคม พ.ศ 2548

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved