ภาคผนวก ค

วิธีวิเคราะห์ทางเคมี

ค.1 การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น

การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น (AOAC, 1997) มีขั้นตอนดังนี้

1. ชั่งตัวอย่าง 5 กรัม ใส่ในถ้วยอะลูมิเนียมที่อบแห้งและทราบน้ำหนักที่แน่นอนแล้ว (ทำ 3 ซ้ำ)

2. บันทึกน้ำหนักของตัวอย่างพร้อมถ้วยอะลูมิเนียม

3. ไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 100 – 105 องศาเซลเซียส ในตู้อบลมร้อนนานประมาณ 3 ชั่วโมง นำออกมาจากตู้อบและปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้น และชั่งน้ำหนัก

4. นำไปอบซ้ำหลายๆ ครั้ง จนได้น้ำหนักที่คงที่ โดยค่าที่วัดได้มีความแตกต่างกันไม่เกิน 0.05 กรัม

5. คำนวณหาปริมาณความชื้น (% โดยน้ำหนักสด) จากสูตร

$$\text{ปริมาณความชื้น (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างที่หายไปหลังจากอบแห้ง}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}} \times 100$$

ค.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (AOAC, 1997) มีขั้นตอนดังนี้

1. ชั่งตัวอย่างอาหาร 1.0 – 1.5 กรัม ใส่ลงใน Kjeldahl flask 500 มิลลิลิตร พร้อมทั้งบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน (ทำ 3 ซ้ำ)

2. เติม $CuSO_4.5H_2O$ 0.5 กรัม และ K_2SO_4 5 กรัม หรือ 1000 Kjeltabs Cu/3,5 จำนวน 1 เม็ด แล้วเติม conc. H_2SO_4 25 มิลลิลิตร

3. วาง Kjeldahl flask ลงบนเครื่องย่อย แล้วทำการย่อยตัวอย่างโดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส รอจนควันจางลง จึงเพิ่มเป็น 250 องศาเซลเซียส ให้ความร้อนนาน 15 นาที จากนั้นเพิ่มเป็น 350 องศาเซลเซียส จนได้สารละลายสีฟ้าใสของแอมโมเนียมซัลเฟต หลังจากการย่อยเสร็จสมบูรณ์ให้ยกชุดกลั่นทั้งชุดขึ้นวางพัก

4. ตั้งสารละลายไว้ให้เย็น เติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

5. เติม boiling chips ลงไป 2 – 3ชิ้น แล้วต่อ distilling flask เข้ากับ distisllation unit โดยที่ปลายอีกด้านหนึ่งของ condenser จุ่มอยู่ใต้ระดับของสารละลาย 4% boric acid (H_3BO_3) 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่หยด methyl red - bromocresol green indicator ลงไปแล้ว 2 – 3 หยด สังเกตสีของสารละลาย boric acid จะมีสีม่วงแดง

6. เติมสารละลาย 50% NaOH 75 มิลลิลิตร ลงไปใน distilling flask ผสมสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน ทั้งนี้ปริมาณ NaOH ที่เติมลงไปจะต้องมากเกินพอ โดยสังเกตจากสารละลายจะมีสีดำ ถ้าปริมาณที่กำหนดไม่มากเกินพอให้เพิ่มปริมาณ NaOH ที่ใช้

7. ตั้งระยะเวลาการกลั่นนาน 6 นาที หรือให้ได้ปริมาตร condensate ประมาณ 150 มิลลิลิตร ทั้งนี้สารละลาย boric acid จะเปลี่ยนจากสีม่วงแดงเป็นสีเขียว

8. ใช้น้ำกลั่นชะสารละลายที่ค้างบริเวณปลาย condenser และ receiver ลงในขวดรูปชมพู่ของ condensate

9. นำสารละลาย condensate ที่ได้ไปไทเทรตกับสารละลาย HCl ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนประมาณ 0.1 N โดยใช้สารละลาย methyl red – bromocresol green เป็นอินดิเคเตอร์ ทั้งนี้ที่จุดยุติสารละลายจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีม่วงแดง บันทึกปริมาตรของสารละลาย HCl ที่ใช้

10. ทำ blank เช่นเดียวกับข้อ 1 – 9 แต่ไม่ต้องใส่ตัวอย่าง

11. คำนวณหาปริมาณโปรตีน (% โดยน้ำหนักสด) จากสูตร

$$\text{ปริมาณโปรตีน (\%)} = \frac{V_{(sample - blank)} \times N \times F \times 14.007 \times 100}{\text{mg of sample}}$$

โดย V = volume of used titrant

N = normality of titrant

F = Kjeldahl factor = 6.25

14.007 = atomic weight of nitrogen

ค.3 การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน

การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน (AOAC, 1997) มีขั้นตอนดังนี้

1. ชั่งตัวอย่างที่แห้ง ซึ่งเป็นตัวอย่างที่ผ่านการหาปริมาณความชื้นแล้ว 2 กรัม พร้อมทั้งบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน แล้วห่อตัวอย่างด้วยกระดาษกรอง แล้วใส่ลงใน thimble (ทำ 3 ซ้ำ)

2. ใส่ thimble ที่บรรจุตัวอย่างลงใน soxhlet extraction tube ผ่านที่อบแห้งและทราบน้ำหนักที่แน่นอน

3. ใส่ petroleum ether ประมาณ 150 มิลลิลิตร ลงใน extraction tube หรือจนท่วมตัวอย่าง

4. นำไปสกัดไขมัน โดยตั้งสภาวะในการสกัด ดังนี้

extraction temperature	150 องศาเซลเซียส
boiling time	30 นาที
solvent reduction A	5 x 15 มิลลิลิตร
extraction time	80 นาที
solvent reduction B	8 นาที
solvent reduction C	5 นาที
solvent reduction interval	3 นาที
solvent reduction phase	3 วินาที

5. นำส่วน petroleum ether ที่ละลายไขมันที่สกัดได้ไปไล่ petroleum ether ออกด้วยการให้ความร้อนบน water bath หรือ hot plate ภายในตู้ควัน

6. นำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้นแล้วชั่งน้ำหนัก

7. คำนวณหาปริมาณไขมัน (% โดยน้ำหนักแห้ง) จากสูตร

$$\text{ปริมาณไขมัน (\% โดยน้ำหนักแห้ง)} = \frac{\text{น้ำหนักไขมันที่สกัดได้}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างแห้ง}} \times 100$$

8. คำนวณหาปริมาณไขมัน (% โดยน้ำหนักสด) จากสูตร

$$\text{ปริมาณไขมัน (\% โดยน้ำหนักสด)} = \frac{\text{ปริมาณไขมัน \% โดยน้ำหนักแห้ง}}{(100 + \text{ปริมาณความชื้น \% โดยน้ำหนักสด})} \times 100$$

ค.4 การวิเคราะห์ปริมาณเส้นใย

การวิเคราะห์ปริมาณเส้นใย (AOAC, 1997) มีขั้นตอนดังนี้

1. ชั่งตัวอย่างที่ผ่านการสกัดไขมัน 2 กรัม พร้อมบันทึกน้ำหนักที่แน่นอนใส่ในบีกเกอร์ ขนาด 600 มิลลิลิตร (ทำ 3 ซ้ำ)

2. เติมสารละลาย 1.25% (w/v) H_2SO_4 ที่เดือด 200 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่าง และใส่ boiling chips ลงไป 2 – 3 ชิ้น นำไปต่อกับเครื่องย่อยและต้มนาน 30 นาที

3. เอาบีกเกอร์ออกจากเครื่องย่อยแล้วนำตัวอย่างไปกรองผ่านเครื่องกรอง

4. ล้างกากด้วยน้ำกลั่นที่เดือด 50 – 75 มิลลิลิตร กรองผ่านเครื่องกรองทำซ้ำอย่างนี้ 3 ครั้ง หรือจนกว่าจะหมดกรด

5. นำกากที่ล้างแล้วใส่ในบีกเกอร์ขนาด 600 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย 1.25% (w/v) NaOH ที่เดือด 200 มิลลิลิตร และใส่ boiling chips ลงไป 2 – 3 ชิ้น นำไปต่อกับเครื่องย่อยและต้มนาน 30 นาที

6. นำกากมากรอง แล้วล้างกากด้วยสารละลาย 1.25% (w/v) H_2SO_4 ที่เดือด 25 มิลลิลิตร ทำซ้ำ 3 ครั้ง ตามด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร 3 ครั้ง และสารละลาย 95% ethyl alcohol 25 มิลลิลิตร

7. นำกากที่ได้ไปใส่ใน crucible แล้วไปทำให้แห้ง โดยอบที่อุณหภูมิ 130 ± 20 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ทำให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนัก

8. นำไปเผาในเตาเผาที่อุณหภูมิ 300 ± 15 องศาเซลเซียส 30 นาที ทำให้เย็นในโถดูดความชื้น

9. คำนวณหาปริมาณเส้นใย (% โดยน้ำหนักสด) จากสูตร

$$\text{ปริมาณเส้นใย (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักแห้งของกาก}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}} \times 100$$

ค.5 การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า

การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า (AOAC, 1997) มีขั้นตอนดังนี้

1. ชั่งตัวอย่าง 10 กรัม ใส่ใน crucible ที่ผ่านการเผาที่ 500 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น พร้อมทั้งบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน (ทำ 3 ซ้ำ)

2. นำมาให้ความร้อนบน hot plate จนไม่มีควันดำก่อนจะนำไปเผาในเตาเผา

3. นำไปเผาในเตาเผาที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส จนกระทั่งได้เถ้าสีขาว เอาออกจากเตาเผา ทำให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วชั่งหาน้ำหนักเถ้า

4. คำนวณหาปริมาณเถ้า (% โดยน้ำหนักสด) จากสูตร

$$\text{เถ้า (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักของเถ้า}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}} \times 100$$

ค.5 การคำนวณปริมาณคาร์โบไฮเดรต

ปริมาณคาร์โบไฮเดรต (% โดยน้ำหนักสด) คำนวณได้โดยใช้ปริมาณความชื้น โปรตีน ไขมัน เส้นใย และเถ้า (% โดยน้ำหนักสด) ด้วยสูตร

คาร์โบไฮเดรต (%) = 100 – (ความชื้น + เถ้า + เส้นใย + ไขมัน + โปรตีน)

ค.6 การวิเคราะห์ค่า TBA

การวิเคราะห์ค่า TBA (Egan และคณะ, 1981) มีขั้นตอนดังนี้

1. ชั่งตัวอย่างที่บดละเอียด 10 กรัม พร้อมทั้งบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร (ทำ 3 ซ้ำ)
2. ผสมให้เข้ากัน วางทิ้งไว้ 2 นาที
3. เทใส่ใน distillation flask ขนาด 500 มิลลิลิตร โดยล้างตัวอย่างที่ค้างด้วยน้ำกลั่น 75 มิลลิลิตร
4. เติม 4 M HCl 2.5 มิลลิลิตร หยด antifoam 2 – 3 หยด และใส่ glass bead ลงไป 2 – 3 เม็ด
5. กลั่นเก็บ distillate ประมาณ 50 มิลลิลิตร ภายในเวลา 10 นาที นับจากเริ่มเดือด
6. ปิเปต distillate 13 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองแก้ว
7. เติม 0.2883% TBA reagent (เตรียมโดยชั่ง thiobarbituric acid 0.2883 กรัม ละลายด้วย 90% acetic acid จำนวน 100 มิลลิลิตร) 13 มิลลิลิตร ปิดฝาหลอดทดลองแก้ว
8. เขย่าให้เข้ากัน และแช่ในน้ำเดือดเป็นเวลา 35 นาที
9. นำลงแช่ในน้ำเย็น 10 นาที และทิ้งให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้อง
10. เตรียม blank เช่นเดียวกับตัวอย่าง โดยใช้น้ำกลั่น 13 มิลลิลิตรแทน distillate
11. วัดค่า absorbance ของตัวอย่างและ blank ที่ความยาวคลื่น 538 นาโนเมตร
12. คำนวณค่า TBA (mg malonaldehyde/kg sample) จากสูตร

TBA value = 0.78 x D x W

เมื่อ D = absorbance ของตัวอย่าง - absorbance ของ blank

W = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)