

ภาคผนวก

## วิธีการวิเคราะห์หาความชื้น และวัตถุแห้ง

### 1. หลักการ

ความชื้นหรือน้ำเป็นองค์ประกอบอย่างหนึ่งในวัตถุดิบอาหารสัตว์ ซึ่งจะมีปริมาณ ผกผันกับปริมาณของวัตถุแห้ง (Dry matter) วัตถุดิบอาหารสัตว์แต่ละชนิดมีปริมาณความชื้น แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดและปัจจัยต่างๆ

### 2. อุปกรณ์

2.1 เตาอบแห้ง (drying oven)

2.2 จานอลูมิเนียม (aluminium pan)

2.3 โถดูดความชื้น (dessicator)

2.4 คีมสำหรับจับจานอลูมิเนียม (tong)

2.5 เครื่องชั่งละเอียด ทศนิยม 4 ตำแหน่ง

### 3. วิธีการหาความชื้นโดยการอบแห้ง

3.1 ให้น้ำหนักที่แน่นอนของถ้วยหาความชื้นโดยนำถ้วยหาความชื้นที่สะอาดเข้าอบ ในตู้อบที่อุณหภูมิ 100-200 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วเอาใส่โถดูดความชื้นทิ้งไว้ให้ เย็นนาน 30 นาที

3.2 ชั่งตัวอย่างที่บดละเอียด 2-5 กรัม ใส่ลงในถ้วยหาความชื้น

3.3 นำถ้วยหาความชื้น เข้าอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 100-102 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-6 หรือ 12 ชั่วโมง

3.4 นำถ้วยหาความชื้น ออกจากตู้อบ ทำให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนัก

### 4. การคำนวณ

$$\% \text{ ความชื้น} = \frac{(A-B)}{A} \times 100$$

$$\% \text{ วัตถุแห้ง} = \frac{(X-Y)}{W} \times 100$$

A = น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ

B = น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ

X = น้ำหนักถ่วงหาความชื้น + ตัวอย่างหลังอบ

Y = น้ำหนักถ่วงหาความชื้น (ถ่วงเปล่า)

W = น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ

## การวิเคราะห์หาปริมาณไขมัน

### 1. หลักการ

ไขมันเป็นสารอินทรีย์ (Organic matter) ที่มีอยู่ในเนื้อเยื่อของพืชและสัตว์ มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ (Water insoluble) แต่ละลายได้ดีใน organic solvent เช่น benzene, ether, chloroform, dichloromethane และอื่นๆ ไขมันในอาหารสัตว์ที่ได้จากการสกัดด้วยสาร organic solvent ประกอบไปด้วยไขมันแท้ (true fat) และสารคล้ายไขมัน (fat like substances) เช่น wax, volatile acids, alcohol และ pigments ต่างๆ

### 2. การหาค่าไขมันโดยคำนวณจากน้ำหนักอาหารที่หายไป

2.1 ชั่งน้ำหนักอาหาร 2 กรัม ใส่ใส่กระดาษกรอง (ห่อกระดาษให้แน่นเพื่อไม่ให้อาหารหลุดออกมาในขณะที่ทำการสกัดไขมัน) นำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ทำให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนัก

2.2 นำห่อตัวอย่างใส่ใน soxhlet tube แล้วต่อเข้ากับ condenser และ extraction flask

2.3 เติม Petroleum ether ลงในฟลาสประมาณ 2/3 ของฟลาส

2.4 ทำการกลั่นโดยควบคุมให้มีการควบแน่นของสารเคมี 5-6 หยดต่อนาที่เป็นเวลา 10-16 ชั่วโมง

2.5 นำห่อตัวอย่างออกจาก soxhlet tube และนำเข้าไปในตู้อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หรือจนกว่าตัวอย่างแห้ง

2.6 ทำให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนัก (น้ำหนักที่หายไปเป็นน้ำหนักของ ether extract หรือ crude fat)

### 3. การคำนวณ

$$\% \text{ Ether extract} = \frac{(X-Y) \times 100}{W}$$

$X = \text{น้ำหนักกระดาษกรอง} + \text{ตัวอย่างอาหาร (หลังอบในตู้อบ 2 ชั่วโมง)}$

$Y = \text{น้ำหนักกระดาษกรอง} + \text{ตัวอย่างอาหาร (หลังจากสกัดไขมัน)}$

$W = \text{น้ำหนักตัวอย่าง}$

## การวิเคราะห์โปรตีน

### 1. หลักการ

ไนโตรเจนส่วนใหญ่ในอาหารสัตว์คือโปรตีน โดยปกติโปรตีนจะมีปริมาณไนโตรเจนอยู่ประมาณ 16 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นเมื่อวิเคราะห์หาค่าไนโตรเจน แล้วคูณด้วย 6.25 จะได้เปอร์เซ็นต์โปรตีนในตัวอย่าง

### 2. วิธีการ

ใช้วิธี Kjeldahl Method ซึ่งเป็นวิธีหาไนโตรเจนทั้งหมดที่มีอยู่ในอาหาร มี 3 ขั้นตอน ดังนี้

2.1 การย่อย เป็นการเปลี่ยนสารไนโตรเจนให้อยู่ในรูปของ  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  โดยใช้กรดกำมะถันเข้มข้น

2.2 การกลั่น เป็นการกลั่นเพื่อนำแอมโมเนียออกมาโดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ และเก็บไว้ในสารละลายกรดบอริก

2.3 การไตเตรทเพื่อหาปริมาณสารละลายกรดมาตรฐานที่ทำปฏิกิริยากับแอมโมเนีย

### 3. อุปกรณ์

3.1 เตาย่อยตัวอย่างพร้อมเครื่องดูดไอกกรด

3.2 เครื่องกลั่นโปรตีน พร้อม cooling bath circulator

3.3 กระจกตวงขนาด 20 มล., 25 มล.

3.4 ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล.

3.5 ปีกเกอร์ ขนาด 250 มล., 100 มล.

3.6 หลอดย่อยสำหรับเตาย่อย

3.7 ขั้วนตักสาร

3.8 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

3.9 บิวเรต พร้อม Stand

#### 4. สารเคมี

4.1 Catalyst mixture (ประกอบด้วย โปตัสเซียมซัลเฟต 100 กรัม บวกคอปเปอร์ซัลเฟต 7 กรัม)

4.2 กรดซัลฟูริกเข้มข้น

4.3 สารละลาย NaOH 40 %

4.4 สารละลาย NaOH 20 %

4.5 สารละลายมาตรฐาน  $H_2SO_4$  0.1 N

4.6 สารละลายกรดบอริก 4 %

4.7 Mix indicator

#### 5. ขั้นตอนการวิเคราะห์โปรตีนด้วยเครื่องกึ่งอัตโนมัติ (VELP)

5.1 การเตรียมเครื่องดูดไอกรด และปรับให้เป็นกลาง

5.1.1 ใส่น้ำลงในอ่างของเครื่องให้ได้ขีด Maximum

5.1.2 ใส่ขวดพลาสติกบรรจุสารละลาย NaOH 20 % 1 ลิตร และขวดพลาสติก

เปล่าที่ตัวเครื่อง

5.1.3 เปิดสวิตซ์ให้เครื่องทำงาน

5.1.4 กด set เพื่อเลือก menu ที่ DK6

5.2 การเตรียม และย่อยตัวอย่าง

5.2.1 ชั่งตัวอย่างอาหาร 0.5-1.5 กรัม (ทราบน้ำหนักที่แน่นอน) ใส่ลงในหลอดย่อย

5.2.2 เติม Catalyst mixture ลงไป 7-10 กรัม

5.2.3 เติมกรดกำมะถันเข้มข้น ประมาณ 20 มล. (ทำในตู้ดูดควัน)

5.2.4 ตั้งส่วนผสมที่อยู่ในหลอดบนเตาย่อย เปิดเตาให้ทำงานย่อย ที่อุณหภูมิ 420 องศาเซลเซียส เปิดชุดดูดควันพร้อมย่อยจนกว่าส่วนผสมทั้งหมดใส เมื่อใสแล้วปิดเตาย่อย และทิ้งไว้ให้เย็น (ประมาณ 20 นาที ขึ้นอยู่กับความร้อนที่สะสมในเตา)

5.3 การกลั่น

5.3.1 นำหลอดที่ใส่ส่วนผสมที่ใส ซึ่งผ่านการย่อยแล้ว ไปต่อเข้าเครื่องกลั่น แล้วนำขวดรูปชมพู่ที่ใส่สารละลายบอริก จำนวน 50 มล. และ Mix indicator ประมาณ 3 หยด วางรองรับแอมโมเนียที่ได้จากการกลั่น ให้ปลายของคอนเดนเซอร์จุ่มอยู่ต่ำกว่าระดับของสารละลายกรดบอริก

5.3.2 ให้เครื่องกลั่นเติมน้ำกลั่นและสารละลาย NaOH 40 % ลงไป โดยตั้งโปรแกรมของเครื่องที่ program 01 (ตั้งเวลากลั่นไว้ 4 นาที) โดยการกด enter สังเกตการเปลี่ยนสีของหลอดย่อยจะเป็นสีฟ้าเขียว แสดงถึงแอมโมเนียที่เกิดขึ้นจะถูกจับไว้ด้วยสารละลายกรดบอริก 4 %

#### 5.4 การไตเตรต

นำสารละลายที่กลั่นได้ไปไตเตรต กับสารละลายมาตรฐานกรดเกลือ หรือกรดกำมะถัน 0.1 N (สารละลายในขวดเปลี่ยนกลับเป็นสีเดิม)

#### 5.5 การคำนวณ

$$\% \text{ Nitrogen (N)} = \frac{(V2 - V1) \times N \times 1.4}{W}$$

$$\% \text{ Crude Protein} = 6.25 \times \% \text{ Nitrogen}$$

$$N = \text{ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน } H_2SO_4 = 0.1 \text{ N}$$

$$V1 = \text{ปริมาตรของของสารละลายมาตรฐาน } H_2SO_4 \text{ ที่ใช้ในการไตเตรต blank}$$

$$V2 = \text{ปริมาตรของของสารละลายมาตรฐาน } H_2SO_4 \text{ ที่ใช้ในการไตเตรตตัวอย่าง}$$

$$W = \text{น้ำหนักตัวอย่าง}$$

### การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า

#### 1. หลักการ

เผาตัวอย่างอาหารด้วยความร้อนสูง (ประมาณ 550-600 องศาเซลเซียส) สารอินทรีย์จะสลายตัวกลายเป็นน้ำและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ส่วนที่เหลือคือเถ้า ซึ่งเป็นสารอนินทรีย์ประกอบด้วยแร่ธาตุหลายชนิด

#### 2. วิธีการ

2.1 หาน้ำหนักที่แน่นอนของถ้วยเผา (ล้างถ้วยเผาให้สะอาดนำไปเผาที่อุณหภูมิ 550-600 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง แล้วทำให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักทำจนได้น้ำหนักคงที่)

2.2 ชั่งตัวอย่างอาหารที่บดละเอียด ประมาณ 2-5 กรัม ใส่ลงในถ้วยเผา

2.3 นำไปเผาให้หมดควัน (ในตู้ดูดควัน) ด้วย hot plate

2.4 นำถ้วยเผาเข้าเผาต่อในเตาเผา ที่อุณหภูมิ 550-600 องศาเซลเซียส นานประมาณ 3-10 ชั่วโมง หรือจนกว่าจะได้เถ้าที่สมบูรณ์ ไม่มีส่วนที่เป็นสีดำเหลืออยู่ (ระยะเวลาที่ใช้เผาขึ้นอยู่กับ

กับชนิดและปริมาณของตัวอย่าง) หรือถ้าหลังจากเผาแล้วยังไม่เป็นสีขาวให้หยดน้ำกลั่นหรือแอมโมเนียคาร์บอนेटลงไปให้ถ้าเปียก ระเหยให้แห้งแล้วเผาต่อ

2.5 นำถ้วยเผาใส่ในโถดูดความชื้น ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วชั่งน้ำหนัก

### 3. การคำนวณ

$$\% \text{ เถ้า} = \frac{B - A}{W} \times 100$$

A = น้ำหนักกรูชีเบิลเปล่า

B = น้ำหนักกรูชีเบิล + ตัวอย่างหลังเผา

W = น้ำหนักตัวอย่าง

## การวิเคราะห์ปริมาณเยื่อใย

### 1. หลักการ

ทำให้สารที่ไม่ใช่พวกผนังเซลล์ของพืช อยู่ในรูปของสารละลายโดยใช้สารละลายกรดและด่าง คือ Sulfuric acid และ Potassium hydroxide หรือ Sodium hydroxide (สารเหล่านี้คือพวกสารประกอบภายในเซลล์เป็นส่วนใหญ่ ได้แก่ แป้ง น้ำตาลและโปรตีน เป็นต้น)

### 2. อุปกรณ์

2.1 เครื่องวิเคราะห์เยื่อใย

2.2 ภาชนะใส่สารละลายกรดและด่างที่สามารถต้มได้

2.3 hotplate

2.4 Filter หรือ sintered glass crucible

2.5 เครื่องชั่งละเอียด

2.6 โถดูดความชื้น

2.7 hot air over

2.8 Muffle furnace

### 3. สารเคมี

3.1 Sulfuric acid 1.25 %

3.2 Potassium hydroxide หรือ Sodium hydroxide 1.25 %

3.3 N-octanol ใช้เป็น Antifoam

3.4 Acetone

### 3.5 Celited

#### 4. วิธีการวิเคราะห์

4.1 ชั่งน้ำหนักตัวอย่างที่บดละเอียดประมาณ 1 กรัม โดยทราบน้ำหนักที่แน่นอนใส่ลงใน Filter glass crucible แล้วใส่ สารซีโลสลงไปใน glass crucible ให้มีความสูงประมาณ 0.5 เซนติเมตร เพื่อช่วยในการกรอง (กรณีตัวอย่างเป็นอาหารชั้น)

4.2 วาง Filter glass crucible ที่มีตัวอย่างบนแป้นเครื่อง ในส่วนที่สกัดด้วยความร้อน แล้วโยกคั่นลือค

4.3 เติม Sulfuric acid 1.25 % 150 มล. หลังจากทำให้ร้อนเพื่อลดเวลาในการต้มให้เดือด

4.4 เติม N-octanol 3-5 หยด เพื่อป้องกันการเกิดฟอง

4.5 เปิดสวิตช์ไฟให้ความร้อนสูงสุด เพื่อต้มสารละลายที่มีตัวอย่างอยู่ให้เดือด หลังจากส่วนผสมเดือดแล้ว ลดความร้อนลงประมาณครึ่งหนึ่ง แล้วต้มต่อไปอีก 30 นาที

4.6 เมื่อครบเวลา 30 นาที เปิดลิ้นไปที่ Vacuum เพื่อระบาย Sulfuric acid ออก

4.7 ล้างด้วยน้ำกลั่นร้อน 3 ครั้งๆ ละ 30 มล. ในการล้างแต่ละครั้งให้เปิดลิ้นไปที่ Pressure เพื่อดันให้อากาศผ่านฐาน crucible ทำให้ส่วนผสมใน crucible คลุกเคล้าโดยตลอด

4.8 หลังจากปล่อยน้ำล้างครั้งสุดท้ายออกจนหมดแล้วเติมสารละลาย Potassium hydroxide 12.5 % ที่ทำให้ร้อนไว้ก่อนแล้วลงไป 150 มล. พร้อมกับเติม N-octanol 3-5 หยด

4.9 ต้มให้เดือดนาน 30 นาที เช่นเดียวกับข้อ 5

4.10 ทำขั้นตอนที่ 6 และ 7 ซ้ำ

4.11 ล้างด้วยน้ำกลั่นเย็นอีก 1 ครั้ง แล้วล้างอีก 3 ครั้งด้วย Acetone ประมาณ 25 มล.

4.12 ทำให้แห้งโดยอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ทำให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนักซึ่งค่านี้เป็นน้ำหนักแห้งของ Filter glass crucible ที่มีเยื่อใยรวมกับน้ำหนักของแก้ว

4.13 นำ crucible ในข้อ 12 ไปเผาในเตาเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง หรือ ที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนัก น้ำหนักที่ได้เป็นน้ำหนักของแก้วบวกกับ Filter glass crucible เมื่อนำน้ำหนักที่ได้ ไปหักออกจากน้ำหนักในข้อ 12 จะได้น้ำหนักของเยื่อใย

**หมายเหตุ** ก่อนเปิดสวิตช์ให้เครื่องสกัดเยื่อใยทำงาน ต้องเปิดสวิตช์ บั้มที่ cooling bath circulator ซึ่งตั้งอุณหภูมิน้ำไว้ประมาณ 10-12 องศาเซลเซียส เพื่อให้ น้ำเย็นไหลเข้าเครื่อง

## 5. การคำนวณ

$$\% \text{ เยื่อใย} = \frac{(X - Y)}{W} \times 100$$

X = น้ำหนักของ Filter glass crucible ที่มีตัวอย่างหลังต้มด้วยเครื่องและอบที่ อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส

Y = น้ำหนักของ Filter glass crucible ที่มีตัวอย่างหลังเผาที่ อุณหภูมิ 500-550 องศาเซลเซียส

W = น้ำหนักตัวอย่าง

## การวิเคราะห์ปริมาณธาตุแคลเซียม

## 1. หลักการ

เปลี่ยนแคลเซียมที่รวมตัวกับธาตุอื่นๆ ให้อยู่ในรูปของ oxide แล้วตกตะกอน แคลเซียมออกมาในรูปของ oxalate ซึ่งละลายได้ในกรดซัลฟูริก จากนั้นไตเตรตด้วยสารละลายมาตรฐาน  $\text{KMnO}_4$

## 2. อุปกรณ์

- 2.1 ถ้วยเผา (Crucible)
- 2.2 บีกเกอร์ขนาด 250 มล.
- 2.3 วอลลูเมตริกฟลาส ขนาด 250 มล.
- 2.4 กระดาษกรองเบอร์ 40
- 2.5 กระจกนาฬิกา
- 2.6 เตาเผา (Muffle furnace)
- 2.7 Hot plate

## 3. สารเคมี

- 3.1 กรด  $\text{HNO}_3$  เข้มข้น
- 3.2 HCL 50 %
- 3.3 HCL 6 N
- 3.4 Ammonium hydroxide เข้มข้น ( $\text{con.NH}_4\text{OH}$ )
- 3.5 กรดซัลฟูริกเข้มข้น ( $\text{con.H}_2\text{SO}_4$ )
- 3.6 Urea

- 3.7 Ammonium oxalate 4 % หรือ saturated
- 3.8 Ammonium solution (ใช้ ammonium hydroxide : น้ำกลั่น = 1 : 50 มล.)
- 3.9 Std.  $\text{KMnO}_4$  0.05 N
- 3.10 Methyl red (indicator)

#### 4. วิธีทำ

##### 4.1 การเตรียมสารละลายสำหรับหาแคลเซียม

4.1.1 ชั่งตัวอย่างอาหารที่บดละเอียดแล้วใส่ในถ้วยเผา 2-5 กรัม (รู้น้ำหนักแน่นอน)

4.1.2 นำไปเผาให้หมดควันแล้วเอาไปเผาต่อในเตาเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส นาน 4-6 ชั่วโมง หรือเผาจนได้เถ้าสมบูรณ์ นำออกมาทิ้งไว้ให้เย็น

4.1.3 หยดกรดไนตริกเข้มข้น ( $\text{HNO}_3$  conc.) ลงไปในเถ้าให้เปียกชื้นให้ทั่ว

4.1.4 นำไปเผาให้แห้งบน hot plate (เผาในตู้ดูดควัน) จนหมดควันกรด แล้วนำเข้าเผาในเตาเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส 1 ½ ชั่วโมง จะได้เถ้าสีขาว – เทา ให้ทำข้อ

##### 4.1.3 ซ้ำ

4.1.5 เมื่อได้เถ้าสีขาว – เทา แล้วให้เติม NCL 50 % จำนวน 10 มล. แล้วนำไปต้มเพื่อละลายเถ้า (ใช้เวลาประมาณ 20-30 นาที ต้มในตู้ดูดควัน)

4.1.6 ถ่ายสารละลายที่เย็นแล้วลงในขวดลลูเมตริกฟลาส ขนาด 250 มล. โดยใช้ น้ำกลั่น 2 ครั้ง ชะล้างสารละลายให้หมด แล้วเติมน้ำกลั่น 2 ครั้ง ให้ได้ปริมาตร 250 มล.

##### 4.2 การวิเคราะห์หาแคลเซียม

4.2.1 ไปเปิดเอาสารละลายในขวดลลูเมตริกฟลาส มา 50 มล. ใส่ลงในบีกเกอร์ ขนาด 250 มล. แล้วหยด methyl red ลงไป 1-2 หยด

4.2.2 หยด ammonium hydroxide เข้มข้น ( $\text{NH}_4\text{OH}$  conc.) ลงไปที่ละลายหยด พร้อมคนสารละลายจนได้สีเหลือง

4.2.3 เติม HCL 6 N ใส่ลงไป 1-5 มล.

4.2.4 ชั่งยูเรีย 5 กรัม ใส่ลงไป

4.2.5 เติม ammonium oxalate 4 % จำนวน 5 มล. ใส่ลงไป ปิดบีกเกอร์ด้วยกระดาษฟิวส์ นำไปต้มใช้ไฟไม่แรงนักจนเดือดและได้สารละลายเป็นสีส้ม (อย่าต้มจนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีอื่น) ระบายลงปล่อยทิ้งไว้ให้เย็น

4.2.6 นำสารละลายกรอง (ใช้กระดาษกรองเบอร์ 40) โดยชะล้างเอาตะกอนลงมาให้หมดด้วยสารละลายแอมโมเนีย แล้วล้างตะกอนด้วยสารละลายแอมโมเนีย เพื่อเอา ammonium oxalate ออกให้หมด

4.2.7 ชะล้างตะกอนลงในปิเปตเตอร์ใบเดิมที่ใช้ต้ม ใช้น้ำกลั่น 2 ครั้ง ชีดล้างตะกอนลงไปให้หมด จำนวนน้ำกลั่นที่ใช้ล้างควรจะใช้ประมาณ 75-100 มล. (กระดาษกรองให้เก็บไว้ก่อน)

4.2.8 เดิมกรดซัลฟูริก (con.H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 2.5 มล. ใส่ลงไป

4.2.9 นำไปต้มให้สารละลายร้อนมีไอกรุ่นๆ (หรือมีอุณหภูมิตั้งแต่ 80 องศาเซลเซียส) แล้วรีบนำไปไตเตรตด้วย KMnO<sub>4</sub> 0.05 N จนสารละลายในปิเปตเตอร์เปลี่ยนเป็นสีม่วงหยุดไตเตรต นำเอากระดาษกรองจากข้อ 7 ใส่ลงไปปิเปตเตอร์ กดให้จมอยู่ในสารละลายแล้วไตเตรตต่อ จนได้สีของสารละลายเป็นสีม่วงคงอยู่ 30 วินาที จดปริมาตรของ KMnO<sub>4</sub> ที่ใช้นำไปคำนวณหา % แคลเซียม

#### 5. การคำนวณ

$$\% \text{ Ca} = \frac{V \times 0.001 \times C \times 100}{W}$$

V = ปริมาตรของ KMnO<sub>4</sub> ที่ใช้ในการไตเตรต

C = อัตราส่วนของปริมาตรสารละลายทั้งหมดที่เตรียม : ปริมาตรที่นำไปวิเคราะห์

W = น้ำหนักตัวอย่าง

Std. KMnO<sub>4</sub> 0.05 N จำนวน 1 มล. = แคลเซียม 0.001 กรัม

#### 6. ข้อควรระวัง

6.1 หลังจากไตเตรตเสร็จแล้วให้รีบทำความสะอาดบิวเรตทันที อย่าใส่ KMnO<sub>4</sub> แชน้ทิ้งไว้ในบิวเรต

6.2 ระวังอย่าให้ไอของ ammonium hydroxide เข้มข้นเข้าตาและจมูก หลังจากใช้ ammonium hydroxide เข้มข้นเสร็จแล้วให้เก็บไว้ในตู้เย็น

### การวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟัสโดยใช้เครื่อง Spectrophotometer

#### 1. อุปกรณ์

1.1 เครื่อง Spectrophotometer

1.2 วอลลูเมตริกฟลาส ขนาด 100, 200, 1000, 2000 มล.

1.3 ไปเปิด

## 2. สารเคมี

2.1 Ammonium molybdate  $[(\text{NH}_4)_6 \text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$

2.2 Ammonium metavanadate  $(\text{NH}_4\text{VO}_3)$

2.3 Potassium dihydrogen phosphate  $(\text{KH}_2\text{PO}_4)$

2.4 HCL (1:3)

2.5 Perchloric acid (70%),  $\text{HClO}_4$

## 3. วิธีการ

### 3.1 การเตรียมสารละลาย Molybdovanadate

3.1.1 ละลายสาร Ammonium molybdate 40 กรัม ในน้ำกลั่นร้อน 400 มล. แล้วตั้งไว้ให้เย็น

3.1.2 ละลายสาร Ammonium metavanadate 2 กรัม ในน้ำกลั่นร้อน 250 มล. ตั้งไว้ให้เย็นแล้วเติม  $\text{HClO}_4$  (70%) 250 มล.

3.1.3 เทสารละลายในข้อ 3.1.1 ลงในสารละลายข้อ 3.1.2 อย่างช้าๆ คนให้เข้ากัน แล้วปรับให้ได้ปริมาตร 2 ลิตร

### 3.2 การเตรียมสารละลาย Phosphorus standard

3.2.1 เตรียม Stock solution ที่มีความเข้มข้นของฟอสฟอรัสเท่ากับ 2 มก./มล. ละลาย  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  จำนวน 8.788 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วปรับให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร

3.2.2 เตรียม Working solution ที่มีความเข้มข้นของฟอสฟอรัสเท่ากับ 0.1 มก./มล. ไปเปิดสารละลาย Stock solution จำนวน 50 มล. แล้วปรับให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร

### 3.3 การเตรียม Standard curve

3.3.1 เตรียม Working solution มาจำนวน 5, 8, 10 และ 15 มล. (ความเข้มข้นของฟอสฟอรัสเท่ากับ 0.5, 0.8, 1.0 และ 1.5 มก./มล. ตามลำดับ) ใส่ลงในวอลลูเมตริกฟลาส ขนาด 100 มล.

3.3.2 เทสารละลาย Working solution ใส่ลงในหลอดอ่านค่า

3.3.3 นำไปอ่านค่า Absorbance จากเครื่อง Spectrophotometer ที่ 400 nm. (ต้องทำ blank ด้วย)

3.3.4 นำค่าที่อ่านได้ไป Plot curve ความเข้มข้นของฟอสฟอรัส (มก.) ต่อค่า Absorbance ที่อ่านได้เป็น Standard curve

### 3.4 วิธีการหาฟอสฟอรัสในอาหารสัตว์

3.4.1 ชั่งตัวอย่างประมาณ 2 กรัม (ถ้าเป็นตัวอย่างที่มีฟอสฟอรัสน้อยควรใช้ตัวอย่างเพิ่มขึ้นเป็น 4-5 กรัม) ใส่ในกรูชีเบิล

3.4.2 นำไปเผาที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง นำออกมาตั้งไว้ให้เย็น

3.4.3 เติม HCL (1:3) จำนวน 40 มล. และ HNO<sub>3</sub> เข้มข้น 8-10 หยด นำไปต้มให้เดือดแล้วยกลงตั้งไว้ให้เย็น ถ่ายตะกอนลงในวอลลูเมตริกฟลาส แล้วปรับให้ได้ปริมาตร 200 มล.

3.4.4 ไปเปตสารละลาย จากข้อ 3.4.3 จำนวน 2 มล. (ถ้าเป็นตัวอย่างอาหารที่มีฟอสฟอรัสน้อย ต้องเพิ่มเป็น 20 มล.) ใส่ลงในวอลลูเมตริกฟลาส ขนาด 100 มล.

3.4.5 เติมสารละลาย Molybdovanadate จำนวน 20 มล. แล้วปรับให้ได้ปริมาตร 100 มล. ผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้ 10 นาที

3.4.6 นำไปอ่านค่า Absorbance จากเครื่อง Spectrophotometer ที่ 400 nm. แล้วเปลี่ยนเป็นค่าความเข้มข้นของฟอสฟอรัส (มก.) โดยเทียบจาก Standard curve

### 4. การคำนวณ

$$\% P = \frac{\text{mg.P} \times C}{W \times 10}$$

C = อัตราส่วนของสารละลายทั้งหมด : จำนวนสารละลายที่ใช้วิเคราะห์

W = น้ำหนักตัวอย่างอาหาร

### 5. ข้อแนะนำ

5.1 ต้องทำ blank ทุกครั้ง

5.2 ควรทำการเช็ค Standard curve บ่อยๆ

5.3 ถ้าสาร HClO<sub>4</sub> หยดลงบนโต๊ะปฏิบัติการให้รีบทำความสะอาดทันที ด้วยน้ำจำนวนมากๆ



ภาพ 1 แหนแดงที่เลี้ยงในบ่อทดลอง



ภาพ 2 การเก็บแหนแดง



ภาพ 3 การตากแหนแดง



ภาพ 4 แहनแดงเมื่อตากไว้ 1 วัน



ภาพ 5 อาหารสูตรแป้งมัน



ภาพ 6 อาหารสูตร آهنแดง



ภาพ 7 อาหารสูตรไปกระถิน



ภาพ 8 กรงทดสอบการย่อยได้