

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก การวิเคราะห์องค์ประกอบพื้นฐาน

การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น

การหาปริมาณความชื้นของน้ำมันหูกวางตามวิธีการของ AOAC. Method 40.1.04 (1995) ทำได้ดังนี้

1. ชั่งถ้วยอลูมิเนียมพร้อมฝาที่ผ่านการอบแห้งจนมีน้ำหนักคงที่แล้ว บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน
2. ตักตัวอย่างใส่ลงในถ้วยอลูมิเนียมประมาณ 2 กรัม เคลี่ยให้ตัวอย่างแผ่ด้วยความหนาสม่ำเสมอ ปิดฝา บันทึกน้ำหนัก
3. วางตัวอย่างในตู้อบลมร้อนโดยเปิดฝาคู่ยอลูมิเนียมเล็กน้อย อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง
4. เมื่อครบเวลา ปิดฝาคู่ย แล้วนำตัวอย่างใส่โถที่มีสารดูดความชื้น ตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งอุณหภูมิลดลงเท่ากับอุณหภูมิห้อง (ใช้เวลาประมาณ 45 นาที)
5. นำตัวอย่างออกมาชั่ง บันทึกน้ำหนัก
6. นำตัวอย่างอบต่ออีกประมาณ 30 นาที เก็บตัวอย่างใส่โถที่มีสารดูดความชื้นจนเย็น ชั่งน้ำหนักซ้ำอีกครั้งจนได้น้ำหนักคงที่ บันทึกน้ำหนักสุดท้าย
7. คำนวณค่าปริมาณความชื้นจากน้ำหนักที่หายไป

การคำนวณ

$$\text{ร้อยละความชื้น} = \frac{(\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ} - \text{น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ})}{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ}} \times 100$$

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

การหาปริมาณโปรตีนของน้ำมันหูกวางตามวิธีการของ AOAC. Method 40.1.06 (1995) ทำการวิเคราะห์โปรตีนโดยใช้ชุดวิเคราะห์ Buchi ซึ่งประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนย่อย (digestion system) และ ส่วนกลั่น (distilled unit)

1. ในช่วงการย่อย

- 1.1 ชั่งตัวอย่างประมาณ 1.3 กรัม (น้ำหนักที่แน่นอน) ใส่ในหลอดย่อย จากนั้นเติม คะตะลิสต์เม็ดเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 25 มิลลิลิตร

1.2 ปิดฝาหลอดย่อยให้สนิท ยกไปใส่เตาย่อยให้ความร้อนที่อุณหภูมิระดับ 8-10 เมื่อเริ่มต้นการย่อย จากนั้นปรับลดอุณหภูมิลงย่อยจนกระทั่งได้สารละลายสีทิ้งให้เย็น

1.3 นำไปกลั่นโดยหลอดควบคุ่ม (blank) ประกอบด้วยสารเคมีทุกอย่างยกเว้นตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์

2. การกลั่นสารที่ผ่านการย่อย

2.1 เตรียมเครื่องกลั่นโดยการอุ่นเครื่องกลั่นประมาณ 2 นาที โดยใช้ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตรรองรับ

2.2 ทำการกลั่นตัวอย่างโดยนำหลอดย่อยที่เตรียมไว้และนำขวดรูปชมพู่ที่บรรจุกรดบอริกร้อยละ 4 ปริมาตร 60 มิลลิลิตร โดยหยดอินดิเคเตอร์ 2-3 หยด จะได้สารละลายสีชมพู มาเข้าเครื่องกลั่น

2.3 กดปุ่มเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 40 ประมาณ 3 เท่าของกรด หลังการเติมสารละลายต่างในหลอดย่อยจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ตั้งเวลาการกลั่นประมาณ 4 นาที เมื่อครบเวลา สารละลายในขวดรูปชมพู่ที่รองรับจะมีสีเขียวอมฟ้า

2.4. นำไปไทเทรตกับสารละลายกรดซัลฟูริกมาตรฐานเข้มข้น 0.1 N จนกระทั่งสารละลายในขวดรูปชมพู่เปลี่ยนเป็นสีชมพู บันทึกปริมาตรกรดที่ใช้ในการไทเทรตนำไปคำนวณหาปริมาณร้อยละโปรตีนดังนี้

การคำนวณ

ร้อยละไนโตรเจน =
$$\frac{(V1 - V2) \times N \times 1400}{E}$$

ร้อยละโปรตีน = ร้อยละไนโตรเจน x 6.25

- โดย
- V1= ปริมาตรของสารละลายกรดซัลฟูริกที่ใช้ในการไทเทรต (มิลลิลิตร)
 - V2= ปริมาตรของสารละลายกรดซัลฟูริกที่ใช้ในการไทเทรตตัวอย่างควบคุ่ม (มิลลิลิตร)
 - N = ความเข้มข้นของสารละลายกรดซัลฟูริกมาตรฐาน (N)
 - E = น้ำหนักตัวอย่าง (มิลลิกรัม)

การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า

การหาปริมาณเถ้าของน้ำมันหูกวางตามวิธีการของ AOAC. Method 40.1.03 (1995) ทำได้ดังนี้

1. ชั่งน้ำหนักตัวอย่างประมาณ 2 กรัม ใส่ในครุชชีเบล (crucible) ที่ทราบน้ำหนักแน่นอน
2. นำไปเผาเพื่อไล่ควันออกจนหมด จากนั้นนำเข้าเตาเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง
3. นำครุชชีเบลที่ใส่ตัวอย่างเข้าโถดูดความชื้น จนกระทั่งเย็น นำมาชั่งน้ำหนักจนได้น้ำหนักคงที่

การคำนวณ

$$\text{ร้อยละปริมาณเถ้า} = \frac{(W3 - W2) \times 100}{W1}$$

โดย $W1$ = น้ำหนักตัวอย่างแห้ง (กรัม)

$W2$ = น้ำหนักครุชชีเบลที่ทราบน้ำหนักแน่นอน (กรัม)

$W3$ = น้ำหนักครุชชีเบลมีเถ้าหลังการเผา (กรัม)

การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน

การหาปริมาณไขมันของน้ำมันหูกวางตามวิธีการของ AOAC. Method 40.1.05 (1995) ทำได้ดังนี้

1. อบขวดก้นกลมในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 104 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนัก
2. ชั่งตัวอย่างแห้งบนกระดาษกรอง 2 กรัม นำตัวอย่างใส่ลงใน thimble อุดสำลีลงบน thimble เพื่อป้องกันมิให้ตัวทำละลายหยดถูกตัวอย่างโดยตรง
3. ใส่ thimble ลงใน extraction tube และต่อเข้ากับเครื่อง condenser
4. เติมหেকเซน ลงในขวดก้นกลมประมาณ 200 มิลลิลิตร
5. เปิดเตาให้ความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 80 องศาเซลเซียส ใช้เวลาในการสกัดประมาณ 8 ชั่วโมง
6. เมื่อครบเวลาแล้วนำขวดไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เก็บในโถดูดความชื้นจนเย็น
7. ชั่งน้ำหนักขวดและคำนวณน้ำหนักของไขมันที่ได้เป็นร้อยละ

การคำนวณ

$$\text{ร้อยละปริมาณไขมัน} = \frac{(\text{น้ำหนักขวดพร้อมไขมัน} - \text{น้ำหนักขวดเปล่า})}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}} \times 100$$

การวิเคราะห์ปริมาณเยื่อใย

การหาปริมาณเยื่อใยของน้ำมันหูกวางตามวิธีการของ AOAC. international 40.1.07 (1995) ทำได้ดังนี้

1. ชั่งน้ำหนักที่แน่นอนของตัวอย่างประมาณ 1 กรัม ใส่ลงครุชีเบล (W)
2. เติมสารละลาย H_2SO_4 ร้อน (อุณหภูมิ 95-100 องศาเซลเซียส) ความเข้มข้น 0.128 M ปริมาณ 150 มิลลิลิตร
3. เติมออกทานอล (Octanol) 2-3 หยด เพื่อป้องกันการเกิดฟอง
4. ค่อยๆ ให้ความร้อนกับสารละลายจนเดือด แล้วลดความร้อนลง ต้มให้เดือดเล็กน้อยต่อไปเป็นเวลาประมาณ 30 นาที
5. กรอกและล้างด้วยน้ำร้อน 3 ครั้ง ครั้งละ 25 มิลลิลิตร
6. เติมสารละลาย KOH ความเข้มข้น 0.233 M ปริมาณ 150 มิลลิลิตร ทำเช่นเดียวกับข้อ 3 – 5
7. นำครุชีเบลออกจากเครื่องในส่วนสกัดด้วยความร้อน
8. ล้างด้วยอะซิโตน อย่างน้อย 3 ครั้ง ครั้งละ 25 มิลลิลิตร
9. นำครุชีเบลไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 100-120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง หรืออบที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น (Desicator) ชั่งน้ำหนักและบันทึกน้ำหนักที่ได้ (W1)
10. นำครุชีเบลไปเผาในตู้อบอุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น จากนั้นนำไปชั่งน้ำหนักและบันทึกน้ำหนักที่ได้ (W2)

การคำนวณ

$$\text{ร้อยละปริมาณเยื่อใย} = \frac{(W1 - W2) \times 100}{W}$$

โดย W = น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น

W_1 = ปริมาณเยื่อใยกับเถ้า

W_2 = ปริมาณของเถ้าที่เหลือหลังจากการเผา

ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด

การคำนวณ

$$\text{ร้อยละคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด} = 100 - (\% \text{ความชื้น} - \% \text{เถ้า} - \% \text{ไขมัน} - \% \text{โปรตีน} - \% \text{เยื่อใย})$$

ภาคผนวก ข การวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพ

การวิเคราะห์ค่าสี

การหาค่าสีของน้ำมันหูกวางโดยระบบ CIE (L^* a^* และ b^*) ด้วยเครื่อง Hunter lab รุ่น DP 9000 สามารถทำได้ดังนี้

1. เปิดเครื่องคอมพิวเตอร์ เข้าโปรแกรม universal software
2. ไปเมนู standardize แล้ววางแผ่นมาตรฐานสีดำ บนเครื่อง กด read sample ตามด้วยแผ่นมาตรฐานสีขาว กด read sample
3. นำตัวอย่างน้ำมันใส่แก้วสำหรับวัดค่าสี วางบนเครื่องวัดค่าสี แล้วกด read sample บันทึกผลที่ได้

การวิเคราะห์ความหนืด

การหาค่าความหนืดด้วยเครื่อง Brookfield DV-I โดยใช้หัว S 0 ความเร็วรอบ 100 รอบ/นาที่ ที่อุณหภูมิห้อง ทำได้ดังนี้

1. เปิดเครื่องวัดความหนืด ใส่หัวเบอร์ 0
2. ทำการตั้งค่าชนิดของหัววัดและเลือกความเร็วรอบในการวัดโดยใช้ 100 รอบ/นาที่
3. นำน้ำมันประมาณ 16 มิลลิลิตร ใส่ในกระบอกสำหรับวัดความหนืด
4. ยกแกนลงมาให้หัววัดจุ่มลงในน้ำมัน
5. กด start เพื่อทำการวัดค่า จดผลการทดลอง โดยกดปุ่ม select display หาค่าความหนืดที่ต้องการ

การวิเคราะห์ความถ่วงจำเพาะ

การหาปริมาณความถ่วงจำเพาะของน้ำมันหูกวางตามวิธีการของ AOAC. Method 40.1.08 (1990) ทำได้ดังนี้

1. ชั่งขวดหาค่าความถ่วงจำเพาะแห้งและบันทึกน้ำหนัก
2. เปิดจุก เติมน้ำที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส จนเต็ม แล้วจุ่มลงในอ่างน้ำ ที่มีอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที
3. ยกขวดออกมาเช็ดให้แห้งสนิทแล้วชั่งน้ำหนัก
4. กรองน้ำมันด้วยกระดาษกรอง แล้วปรับให้ได้ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส
5. ทดลองเช่นเดียวกันโดยใช้น้ำมันแทนน้ำ

การคำนวณ

ความถ่วงจำเพาะ = $\frac{\text{น้ำหนักน้ำมัน}}{\text{น้ำหนักน้ำที่ปริมาตรเท่ากัน}}$

การวิเคราะห์จุดหลอมเหลว

การหาค่าจุดหลอมเหลวด้วยเครื่อง Differential Scanning Calorimeters (DSC) ตามวิธีการของ Tan and Cheman (2000)

- 1. นำตัวอย่างน้ำมันมาโฮโมจีไนส์ (homogenized) และกรองด้วยกระดาษกรอง
- 2. ให้ความร้อนที่ 50 องศาเซลเซียสจนทำลายผลึกของน้ำมัน และทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง
- 3. นำตัวอย่างน้ำมัน ประมาณ 16 มิลลิกรัม ใส่จานอลูมิเนียมสำหรับการวิเคราะห์ด้วย DSC โดยใช้อุณหภูมิในช่วง -50 ถึง 50 องศาเซลเซียส ที่อัตราการความร้อน 10 องศาเซลเซียสต่อนาที
- 4. ค่าจุดหลอมเหลวได้จากรูปที่ได้จาก เครื่อง Differential Scanning Calorimeters (DSC)

ภาคผนวก ค การวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมี

การวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมัน

การหาปริมาณกรดไขมันของน้ำมันหูกวางตามวิธีการ AOAC. Method 969.33 (2005) ซึ่งประกอบด้วย 2 ส่วน คือ การสaponification และ วิเคราะห์ด้วย GC (gas chromatography)

1. การสaponification (saponification)

1.1 ปิเปต Tricosanoic acid (C23:0) 1 มิลลิลิตร ใส่ ในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร

1.2 นำไป blow ด้วยแก๊สไนโตรเจน

1.3 ชั่งน้ำหนักหลอดทดลองเปล่าและหลอดทดลองที่มี internal standard อยู่

1.4 ดูดตัวอย่างใส่หลอดทดลองทั้งสอง 3-5 หยด

1.5 ชั่งน้ำหนักหลอดทดลองแล้วเติม 0.5N NaOH ในmethanol 4 มิลลิลิตร

1.6 นำไป vortex และวางใน water bath เป็นเวลา 10 นาที (เขย่าทุกๆ 3 นาที) เมื่อครบเวลา ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

1.7 เติม 14% boron trifluoride ใน methanol 4 มิลลิลิตร และ เติม hexane 3 มิลลิลิตรเขย่าแล้ววางใน water bath เป็นเวลา 10 นาที

1.8 เติม Saturated NaCl 3 มิลลิลิตร หมุนเหวี่ยงที่ 2500 rpm อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายส่วนใสใส่ขวดรูปชมพู่

1.9 นำไประเหย เติม Isopropanol และ hexane นำไประเหยต่อ ชั่งน้ำหนัก

1.10 เติม hexane ลงในขวดก้นกลมให้มีปริมาตรเป็น 40 เท่าของน้ำหนักสารที่ชั่งได้

1.11 ดูดใส่ vial เพื่อทำการวิเคราะห์ GC

2. GC condition

2.1 Gas: N₂: Air zero: H₂

2.2 Injector: 250 องศาเซลเซียส

2.3 Detector: 200 องศาเซลเซียส

2.4 Flow rate: 2 ml/min

การวิเคราะห์ค่าสaponifiy

การหาค่าสaponifiyของน้ำมันหูกวางตามวิธีการของ AOAC. Method 920.160 (1995) ได้ดังนี้

สารเคมี

- ก. สารละลายแอลกอฮอล์โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์
- ข. สารละลายมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.5 นอร์มัล
- ค. สารละลายฟีนอล์ฟธาไลน์ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

วิธีการทดลอง

1. การหาค่าซาฟอนิไฟเคชัน ต้องทำ blank ไปพร้อมกันโดยไม่ต้องใส่น้ำมันตัวอย่างลงไป และต้องทำตัวอย่าง 2 ข้างพร้อมกัน
2. ชั่งน้ำมันตัวอย่างประมาณ 2 กรัม ให้ทราบน้ำหนักอย่างละเอียด ถึงทศนิยม 4 ตำแหน่ง ใส่ลงไปในขวดรูปชมพูนขนาด 250 มิลลิลิตร
3. ปิเปตสารละลายแอลกอฮอล์โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ 25 มิลลิลิตร โดยใช้ volumetric pipette ขนาด 25 มิลลิลิตร ใส่ลงไปในขวดรูปชมพู่
4. ปิดจุก โดยจุกที่ใช้ปิดต้องอยู่กับ reflux condenser
5. reflux สารผสมในขวดรูปชมพู่ประมาณ 1 ชั่วโมง ใน boiling water-bath
6. เขย่าเป็นระยะๆ ตลอดเวลาที่ reflux เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
7. นำสารผสมในขวดรูปชมพู่มาไตเตรตหาต่างที่เหลือกับสารละลายกรดไฮโดรคลอริก มาตรฐานความเข้มข้น 0.5 นอร์มัล โดยหยดสารละลายฟีนอล์ฟธาไลน์ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ลงไป 2-3 หยด เพื่อเป็นอินดิเคเตอร์
8. ไตเตรตจนถึงจุดยุติซึ่งมีสีชมพูอ่อน และเก็บขวดรูปชมพู่ที่มีสารละลายไว้ใช้วิเคราะห์หาปริมาณสารที่ซาปอนิไฟด์ไม่ได้ (unsaponifiable matter) ต่อไป
9. บันทึกปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกมาตรฐานความเข้มข้น 0.5 นอร์มัล ที่ใช้กับน้ำมัน ตัวอย่าง มีค่า = A และที่ใช้กับ blank มีค่า = B

การคำนวณ

ค่าซาฟอนิไฟเคชัน
$$= \frac{(B - A) \times N \times 56.1}{W}$$

- โดย N = ความเข้มข้นของสารละลายกรดไฮโดรคลอริกมาตรฐานเป็นนอร์มัล
- A = จำนวนมิลลิลิตรของกรดไฮโดรคลอริก ที่ใช้ไตเตรตกับน้ำมันตัวอย่าง
- B = จำนวนมิลลิลิตรของกรดไฮโดรคลอริก ที่ใช้ไตเตรตกับ blank
- W = น้ำหนักตัวอย่างน้ำมันที่ใช้หน่วยเป็นกรัม

การวิเคราะห์ค่าสารที่สปอนนิฟายไม่ได้

การหาค่าสปอนนิฟายไม่ได้ของน้ำมันหูกวางตามวิธีการของ AOAC. Method 933.08 (1955) ได้ดังนี้

สารเคมี

ก. สารละลายโพแตสเซียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 3 โมลาร์

ข. กรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.5 นอร์มัล

ค. สารละลายไดเอทิลอีเธอร์

ง. สารละลายโพแตสเซียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์

วิธีการทดลอง

1. เมื่อได้เตรตหาค่าซาฟอนิฟิเคชัน นำสารละลายทั้งหมดที่อยู่ในขวดรูปชมพู่มาทำให้เป็นต่างอีกครั้งหนึ่ง โดยการเติมสารละลายโพแตสเซียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 3 โมลาร์ ลงไป 1 มิลลิลิตร

2. เทสารละลายทั้งหมดใส่ลงในกรวยแยก (separator)

3. ล้างด้วยน้ำกลั่น ปริมาตรของน้ำที่ใช้ 50 มิลลิลิตร ลบด้วยปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.5 นอร์มัล ที่ใช้หาค่าซาฟอนิฟิเคชัน

4. สกัดสารละลายด้วยไดเอทิลอีเธอร์ 3 ครั้ง ๆ ละ 50 มิลลิลิตร

5. แยกไดเอทิลอีเธอร์ที่สกัดได้แต่ละครั้งใส่รวมกันในกรวยแยก อีกอันหนึ่งที่มีน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร

6. เขย่าให้ผสมกันเพื่อล้างไดเอทิลอีเธอร์ด้วยน้ำ ปล่อยตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้นแล้วแยกเอาน้ำออกทิ้ง

7. ล้างไดเอทิลอีเธอร์ด้วยน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร ซ้ำอีก 2 ครั้ง

8. ล้างไดเอทิลอีเธอร์ด้วยสารละลายโพแตสเซียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ครั้งละ 20 มิลลิลิตร อีก 2 ครั้ง

9. ล้างด้วยน้ำกลั่นครั้งละ 20 มิลลิลิตร อีกอย่างน้อย 2 ครั้ง จนน้ำที่ล้างไม่เป็นต่างต่อฟีนอล์ฟทาไลน์

10. เทไดเอทิลอีเธอร์ในขวดรูปชมพู่ที่สะอาดแห้ง และทราบน้ำหนัก

11. ระเหยเอาไดเอทิลอีเธอร์ออกจนแห้งสนิทที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส (จนได้น้ำหนักคงที่)

12. ชั่งน้ำหนักที่ได้และคำนวณหาปริมาณของสารที่ซาฟอนิฟิเคชันไม่ได้

การคำนวณ

% ค่ำสปอนนิฟายไม่ได้ = $\frac{100 \times a}{P}$

โดย a = น้ำหนักของสารที่เหลือ (กรัม)
P = น้ำหนักน้ำมัน (กรัม)

การวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด

การหาค่าความเป็นกรดของน้ำมันหูกวางตามวิธีการของ AOAC. Method 940.28 (1900) ได้ดังนี้

สารเคมี

- ก. เอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 95
- ข. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.25 นอร์มอล
- ค. สารละลายฟีนอล์ฟทาลีน ร้อยละ 2

วิธีการทดลอง

- 1. ชั่งตัวอย่าง 2 กรัม ลงในขวดรูปชมพูนขนาด 250 มิลลิลิตร
- 2. เติมตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงไปในขวดรูปชมพู จากนั้นเติมสารละลายฟีนอล์ฟทาลีน ร้อยละ 2 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
- 3. นำไปไตเตรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.25 นอร์มอล จนได้สารละลายสีชมพู

การคำนวณ

ค่ากรด (มิลลิกรัม) = $\frac{V \times N \times 56.1}{W}$
ปริมาณกรดไขมันอิสระ = $\frac{V \times N \times 282}{1000}$
ปริมาณกรดไขมันอิสระคิดเป็นร้อยละ = $\frac{V \times N \times 28.2}{W}$

โดย V = ปริมาณต่างที่ใช้ในการไตเตรต (มิลลิลิตร)
N = ความเข้มข้นต่าง (0.25 นอร์มอล)
W = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

หมายเหตุ น้ำหนักโมเลกุลของกรดลอริก = 200
 น้ำหนักโมเลกุลของกรดปาล์มิติก = 256
 น้ำหนักโมเลกุลของกรดโอเลอิก = 282

ในการคำนวณนี้ใช้ค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดโอเลอิกเป็นตัวแทนของกรดไขมันอื่นๆ

การวิเคราะห์ค่าเปอร์ออกไซด์

การหาค่าเปอร์ออกไซด์ของน้ำมันหูกวางตามวิธีการของ AOAC. Method 965.33 (1990) ได้ดังนี้

สารเคมี

- ก. สารละลายกรดอะซิติกกับคลอโรฟอร์ม อัตราส่วน 3 : 2
- ข. สารละลายอิมตัวโพแตสเซียมไอโอไดด์
- ค. สารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต ความเข้มข้น 0.01 นอร์มอล
- ง. น้ำแข็ง ความเข้มข้นร้อยละ 1

วิธีการทดลอง

1. ชั่งตัวอย่าง 2 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร
2. เติมสารละลายกรดอะซิติกกับคลอโรฟอร์ม อัตราส่วน 3 : 2 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
3. เติมสารละลายอิมตัวโพแตสเซียมไอโอไดด์ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มีด 1 นาที โดยมีการเขย่าเป็นบางครั้ง จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 30 มิลลิลิตร
4. ไตเตรตด้วยสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต ความเข้มข้น 0.01 นอร์มอล จนกระทั่งสารละลายสีเหลืองจางหายไป แล้วเติมน้ำแข็งสุกความเข้มข้นร้อยละ 1 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ไตเตรตต่อจนสารละลายสีน้ำเงินหมดไป
5. เตรียมและไตเตรต bank เช่นเดียวกับข้อ 2-4

การคำนวณ

$$\text{ค่าเปอร์ออกไซด์ (มิลลิอิควิวาเลนต์ต่อกิโลกรัม)} = \frac{(S-B) \times N \times 1000}{W}$$

โดย S = ปริมาณสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟตที่ใช้ในการไตเตรตตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

B = ปริมาณสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟตที่ใช้ในการไตเตรตแบลงค์ (มิลลิลิตร)

N = ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต (0.01 N)

W = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินอี

การหาปริมาณวิตามินอีของน้ำมันหูกวางตามวิธีการของ AOCS Ce 8-89 (1993) ได้ดังนี้ เตรียมตัวอย่างน้ำมัน 2 กรัมละลายใน *n*-hexane 25 มิลลิลิตร แล้วนำไปหาวิตามินอีโดยใช้เครื่อง HPLC

HPLC condition

1. Mobile phase (*n*-hexane: isopropanol): 99.5:0.5
2. Flow rate (ml/min): 1.2
3. Detector (nm): 292
4. Injection volume (ไมโครลิตร): 20
5. ชนิดของคอลัมน์: Hypersil Silica, 250 x 4.6 mm, Particle size 5 μ m

คำนวณหาปริมาณวิตามินอีในตัวอย่างโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน (standard curve)

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณวิตามินอี (มิลลิกรัม/100กรัม)} = \frac{100 \times X \times V \times D}{W}$$

โดย X = ปริมาณวิตามินอีจาก Calibration curve

V = ปริมาตรทั้งหมด (มิลลิลิตร)

D = dilute factor

W = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

การวิเคราะห์ปริมาณสเตอรอล

การหาปริมาณสเตอรอลของน้ำมันหูกวางตามวิธีการของ Laakso (2005) โดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (HP 6890 series GC) ซึ่งต่อกับ Flame Ionization Detector (FID)

GC condition

1. ฉีดตัวอย่างแบบ split ด้วยอัตราส่วน 1: 15 ปริมาตร 1 ไมโครลิตร
2. อุณหภูมิ injector 290 องศาเซลเซียส
3. การแยกไฟโตสเตอรอลใช้แคปิลารีคอลัมน์ HP ultra-1 ขนาด 30 เมตร x 0.25 มิลลิเมตร x 0.25 ไมโครเมตร
4. ใช้แก๊สฮีเลียมความบริสุทธิ์ ร้อยละ 99.999 เป็นแก๊สนำพา (carrier gas) โดยมีอัตราการไหล 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที
5. อุณหภูมิที่ใช้ในการแยกสารเริ่มที่ 200 องศาเซลเซียส คงไว้ที่อุณหภูมิดังกล่าวเป็นเวลา 20 นาที แล้วเพิ่มอุณหภูมิด้วยอัตรา 10 องศาเซลเซียสต่อนาทีจนถึง 300 องศาเซลเซียสคงอุณหภูมินี้ไว้ 10 นาที

การบ่งชี้ชนิดของไฟโตสเตอรอลทำโดยการเปรียบเทียบค่า retention time จากสารมาตรฐาน ที่ได้จากการนำสารละลายมาตรฐานมาทำการวิเคราะห์ภายใต้สภาวะเดียวกัน หาพื้นที่ใต้พีคของสารแล้วคำนวณหาปริมาณไฟโตสเตอรอลแต่ละชนิด

การวิเคราะห์ปริมาณโลหะ

การหาปริมาณโลหะของน้ำมันหูกวางได้แก่ เหล็ก (Fe) ทองแดง (Cu) ตะกั่ว (Pb) สารหนู (As) โดยใช้เครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer (AAS) ทำได้ดังนี้

1. ชั่งตัวอย่างน้ำมัน 1 กรัม ใส่ในครุชีเบล แล้วนำไปเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 8 ชั่วโมง จนได้เถ้าสีขาวมีน้ำหนักคงที่
2. นำเถ้าที่เผาได้ไปทำการย่อย (digest) ใส่ในบีกเกอร์แล้วเติมกรดไฮโดรคลอริก 25% จำนวน 20 มิลลิลิตร ลงไป
3. ตั้งทิ้งไว้ใน water bath จนมีปริมาตรลดลงเหลือ 7 มิลลิลิตร
4. นำสารที่ได้ไปปรับปริมาตรด้วย volumetric flask 50 มิลลิลิตร
5. จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง AAS

การวิเคราะห์ค่ากรดไทโอบาร์บิทูริก (thiobarbituric acid; TBARS)

การหาค่ากรดไทโอบาร์บิทูริกของน้ำมันหูกวางตามวิธีการของ Buege and Aust (1978) ทำได้ดังนี้

1. ชั่งตัวอย่างน้ำมัน 2 กรัมลงในหลอดทดลองขนาด 25 มิลลิลิตร
2. นำไป homogenize เป็นเวลา 2 นาที กับสารละลายไทโอบาร์บิทูริก
3. นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
4. นำไปทำให้เย็น
5. นำไปหมุนเหวี่ยงที่เครื่อง centrifuge ที่ความเร็วรอบ 5500 g เป็นเวลา 25 นาที
6. วัดค่า absorbance ที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร

การคำนวณ

$$\text{TBARS} = 7.8 D$$

โดย D = ค่าที่เครื่อง spectrophotometry ที่อ่านได้

ภาคผนวก ง ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่องน้ำมันและไขมัน

(สำเนา)

ประกาศกระทรวงสาธารณสุข

(ฉบับที่ 205) พ.ศ.2543

เรื่อง น้ำมันและไขมัน

โดยที่เป็นการสมควรปรับปรุงประกาศกระทรวงสาธารณสุขว่าด้วยเรื่อง น้ำมันและไขมัน อาศัยอำนาจตามความในมาตรา 5 และมาตรา 6(3)(4)(5)(6)(7) และ (10) แห่งพระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ.2522 อันเป็นพระราชบัญญัติที่มีบทบัญญัติบางประการเกี่ยวกับการจำกัดสิทธิและเสรีภาพของบุคคล ซึ่งมาตรา 29 ประกอบกับมาตรา 35 มาตรา 48 และมาตรา 50 ของรัฐธรรมนูญแห่งราชอาณาจักรไทยบัญญัติให้กระทำได้โดยอาศัยอำนาจตามบทบัญญัติแห่งกฎหมาย รัฐมนตรีว่าการกระทรวงสาธารณสุขออกประกาศไว้ ดังต่อไปนี้

ข้อ 1 ให้ยกเลิก

(1) ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 22 (พ.ศ.2522) เรื่อง กำหนดน้ำมันและไขมันเป็นอาหารควบคุมเฉพาะและกำหนดคุณภาพหรือมาตรฐาน วิธีการผลิต และฉลาก สำหรับน้ำมันและไขมัน ลงวันที่ 13 กันยายน พ.ศ.2522

(2) ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 72 (พ.ศ.2525) เรื่อง แก้ไขเพิ่มเติมประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 22 (พ.ศ.2522) ลงวันที่ 19 พฤศจิกายน พ.ศ.2525

(3) ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 134 (พ.ศ.2534) เรื่อง น้ำมันและไขมันผสม (ฉบับแก้ไขเพิ่มเติม) ลงวันที่ 15 กุมภาพันธ์ พ.ศ.2534

(4) ประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 164) พ.ศ.2538 เรื่อง แก้ไขเพิ่มเติมประกาศกระทรวงสาธารณสุขว่าด้วยเรื่อง น้ำมันและไขมัน (ฉบับที่ 3) ลงวันที่ 19 กรกฎาคม พ.ศ.2538

ข้อ 2 ให้น้ำมันและไขมันที่ใช้เป็นอาหารได้ ซึ่งได้แก่ กลีเซอรีนของกรดไขมันต่าง ๆ ที่ได้จากพืชหรือสัตว์ซึ่งใช้เป็นอาหารและบรรจุในภาชนะที่ปิดสนิท กล่อง ของ หรือสิ่งห่อหุ้มที่ปิดผนึกเพื่อจำหน่าย เป็นอาหารที่กำหนดคุณภาพหรือมาตรฐาน ทั้งนี้ไม่รวมถึงเนยและเนยเทียม

ข้อ 3 น้ำมันและไขมันที่ใช้เป็นอาหาร แบ่งออกเป็นสามชนิด

(1) น้ำมันและไขมันที่ได้จากพืช

(2) น้ำมันและไขมันที่ได้จากสัตว์

(3) น้ำมันและไขมันผสม ได้แก่ น้ำมันและไขมันที่ได้จากพืชต่างชนิดผสมกันไม่เกินสองชนิด หรือน้ำมันและไขมันที่ได้จากพืชหรือสัตว์ตั้งแต่สองชนิดขึ้นไปผสมกันโดยผ่านกรรมวิธีไฮโดรจีเนชัน (Hydrogenation) หรือเอสเตอริฟิเคชัน (Esterification) หรือน้ำมันและไขมันผสมตามชนิดและกรรมวิธีอื่นที่ได้รับความเห็นชอบจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา

ข้อ 4 พืชหรือไขมันของสัตว์ที่จะนำมาผลิตเอาน้ำมันและไขมัน ต้องมีสภาพที่เหมาะสมจะใช้ผลิตอาหาร และอยู่ในสภาพที่ให้น้ำมันและไขมันซึ่งบริโภคได้โดยปราศจากอันตราย

ข้อ 5 วิธีการผลิตน้ำมันและไขมันให้ทำได้ ดังนี้

(1) วิธีธรรมชาติ ทำโดยการบีบอัดโดยใช้ความร้อนหรือวิธีธรรมชาติอื่นตามที่ได้รับความเห็นชอบจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา และนำมาทำให้สะอาดโดยการล้าง การตั้งไว้ให้ตกตะกอน การกรอง หรือการหมุนเหวี่ยง

(2) วิธีผ่านกรรมวิธี ทำโดยนำน้ำมันและไขมันที่ได้จากวิธีธรรมชาติ หรือที่ได้จากการสกัดด้วยสารละลายตามที่ได้รับความเห็นชอบจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา และนำมาผ่านกรรมวิธีทำให้บริสุทธิ์อีกครั้งหนึ่ง

(3) วิธีอื่นตามที่ได้รับความเห็นชอบจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา

ข้อ 6 น้ำมันและไขมันต้องมีคุณภาพหรือมาตรฐาน ดังต่อไปนี้

(1) มีค่าของกรด (Acid Value) คิดเป็นมิลลิกรัมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ต่อน้ำมันหรือไขมัน 1 กรัม

(1.1) ได้ไม่เกิน 4.0 สำหรับน้ำมันและไขมันซึ่งทำโดยวิธีธรรมชาติ

(1.2) ได้ไม่เกิน 0.6 สำหรับน้ำมันและไขมันซึ่งทำโดยวิธีผ่านกรรมวิธี

(1.3) ได้ไม่เกิน 4.0 สำหรับน้ำมันและไขมันผสมซึ่งทำโดยวิธีธรรมชาติ

(1.4) ได้ไม่เกิน 0.6 สำหรับน้ำมันและไขมันผสมซึ่งทำโดยวิธีผ่านกรรมวิธี

(1.5) ได้ไม่เกิน 1.0 สำหรับน้ำมันและไขมันซึ่งทำโดยวิธีผ่านกรรมวิธีผสมกับน้ำมันและไขมันซึ่งทำโดยวิธีธรรมชาติ

(2) มีค่าเปอร์ออกไซด์ (Peroxide Value) คิดเป็นมิลลิกรัมสมมูลย์ ต่อน้ำมันและไขมัน 1 กิโลกรัม ได้ไม่เกิน 10

(3) มีน้ำและสิ่งที่จะระเหยได้ (Water and Volatile Matter) ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสได้ไม่เกินร้อยละ 0.2 ของน้ำหนัก

(4) มีปริมาณสบู่ (Soap Content) ได้ไม่เกินร้อยละ 0.005 ของน้ำหนัก

(5) มีสิ่งอื่นที่ไม่ละลาย (Insoluble Impurities) ได้ไม่เกินร้อยละ 0.05 ของน้ำหนัก

(6) มีกลิ่นและรสตามลักษณะเฉพาะของน้ำมันและไขมัน ยกเว้นน้ำมันและไขมันผสม

(7) ไม่มีกลิ่นหืน

(8) ตรวจพบสารปนเปื้อนได้ไม่เกินที่กำหนด ดังต่อไปนี้

(8.1) ไม่พบน้ำมันแร่ (Mineral oil)

(8.2) เหล็ก

ในน้ำมันหรือไขมันธรรมชาติและในน้ำมันหรือไขมันผสมไม่เกิน 5.0 มิลลิกรัม ต่อน้ำมันหรือไขมัน 1 กิโลกรัม

ในน้ำมันหรือไขมันผ่านกรรมวิธีไม่เกิน 1.5 มิลลิกรัม ต่อน้ำมันหรือไขมัน 1 กิโลกรัม

(8.3) ทองแดง

ในน้ำมันหรือไขมันธรรมชาติและในน้ำมันหรือไขมันผสมไม่เกิน 0.4 มิลลิกรัม ต่อน้ำมันหรือไขมัน 1 กิโลกรัม

ในน้ำมันหรือไขมันผ่านกรรมวิธีไม่เกิน 0.1 มิลลิกรัม ต่อน้ำมันหรือไขมัน 1 กิโลกรัม

(8.4) ตะกั่ว ไม่เกิน 0.1 มิลลิกรัม ต่อน้ำมันหรือไขมัน 1 กิโลกรัม

(8.5) สารหนู ไม่เกิน 0.1 มิลลิกรัม ต่อน้ำมันหรือไขมัน 1 กิโลกรัม

(8.6) อฟลาท็อกซิน (Aflatoxin) ไม่เกิน 20 ไมโครกรัม ต่อน้ำมันหรือไขมัน 1 กิโลกรัม (ไม่เกิน 20 ส่วนในพันล้านส่วน)

(8.7) ไซโคลโพรเพนอยด์ แฟตตี้ แอซิด (Cyclopropenoid Fatty Acid) ไม่เกินร้อยละ 0.4 โดยน้ำหนัก

น้ำมันและไขมันผสมนอกจากต้องมีคุณภาพหรือมาตรฐานตามวรรคหนึ่งแล้ว อาจมีคุณภาพหรือมาตรฐานอื่นตามที่ได้รับความเห็นชอบจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาด้วยก็ได้

น้ำมันและไขมันที่ผลิตตามวิธีอื่นในข้อ 5(3) ให้มีคุณภาพหรือมาตรฐานตามที่ได้รับความเห็นชอบจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา

ข้อ 7 การใช้วัตถุเจือปนอาหาร ให้ใช้ได้ตามชนิดและปริมาณที่กำหนดไว้ในบัญชีท้ายประกาศนี้

การใช้วัตถุเจือปนอาหารชนิดอื่นนอกจากที่กำหนดให้ใช้ได้ตามวรรคแรก ต้องได้รับความเห็นชอบจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา

ข้อ 8 ผู้ผลิตหรือนำเข้าน้ำมันและไขมันเพื่อจำหน่าย ต้องปฏิบัติตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขว่าด้วยเรื่อง วิธีการผลิต เครื่องมือเครื่องใช้ในการผลิต และการเก็บรักษาอาหาร

ข้อ 9 การใช้ภาชนะบรรจุน้ำมันและไขมัน ให้ปฏิบัติตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขว่าด้วยเรื่อง ภาชนะบรรจุ

ข้อ 10 การแสดงฉลากของน้ำมันและไขมัน ให้ปฏิบัติตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขว่าด้วยเรื่อง ฉลาก

ข้อ 11 ให้ใบสำคัญการขึ้นทะเบียนตำรับอาหารหรือใบสำคัญการใช้ฉลากอาหารตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 22 (พ.ศ.2522) เรื่อง กำหนดน้ำมันและไขมันเป็นอาหารควบคุมเฉพาะ และกำหนดคุณภาพหรือมาตรฐาน วิธีการผลิต และฉลาก สำหรับน้ำมันและไขมัน ลงวันที่ 13 กันยายน พ.ศ. 2522 แก้ไขเพิ่มเติมโดยประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 72 (พ.ศ.2525) เรื่อง แก้ไขเพิ่มเติมประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 22 (พ.ศ.2522) ลงวันที่ 19 พฤศจิกายน พ.ศ.2525 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 134 (พ.ศ.2534) เรื่อง น้ำมัน

และไขมันผสม (ฉบับแก้ไขเพิ่มเติม) ลงวันที่ 15 กุมภาพันธ์ พ.ศ.2534 และประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 164) พ.ศ.2538 เรื่อง แก้ไขเพิ่มเติมประกาศกระทรวงสาธารณสุขว่าด้วยเรื่อง

น้ำมันและไขมัน (ฉบับที่ 3) ลงวันที่ 19 กรกฎาคม พ.ศ.2538 ซึ่งออกให้ก่อนวันที่ประกาศนี้ใช้บังคับยังคงใช้ต่อไปได้อีกสองปี นับแต่ประกาศนี้ใช้บังคับ

ข้อ 12 ให้ผู้ผลิต ผู้นำเข้า น้ำมันและไขมันที่ได้รับอนุญาตอยู่ก่อนวันที่ประกาศนี้ใช้บังคับยื่นคำขอรับเลขสารบบอาหารภายในหนึ่งปี นับแต่วันที่ประกาศนี้ใช้บังคับ เมื่อยื่นคำขอดังกล่าวแล้วให้ได้รับการผ่อนผันการปฏิบัติตามข้อ 8 ภายในสองปี นับแต่วันที่ประกาศนี้ใช้บังคับ และให้คงใช้ฉลากเดิมที่เหลืออยู่ต่อไปจนกว่าจะหมดแต่ต้องไม่เกินสองปี นับแต่วันที่ประกาศนี้ใช้บังคับ

ข้อ 13 ประกาศนี้ให้ใช้บังคับเมื่อพ้นกำหนดหนึ่งร้อยแปดสิบวันนับแต่วันถัดจากวันประกาศในราชกิจจานุเบกษาเป็นต้นไป

ประกาศ ณ วันที่ 19 กันยายน พ.ศ.2543

กร ทัพพะรังสี

รัฐมนตรีว่าการกระทรวงสาธารณสุข

(ราชกิจจานุเบกษาฉบับประกาศทั่วไป เล่ม 118 ตอนพิเศษ 6 ง. ลงวันที่ 24 มกราคม พ.ศ.2544)