

ภาคผนวก

ภาคผนวก 1. การวิเคราะห์องค์ประกอบของสบู่ดำ

1.1 การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น

หลักการ

ตัวอย่างจะถูกทำให้ระเหยในภาชนะที่ทราบน้ำหนักแน่นอนแล้ว และนำไปอบจนกระทั่งได้น้ำหนักคงที่ในตู้อบที่อุณหภูมิ 103 – 105 องศาเซลเซียส น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นจากน้ำหนักภาชนะเปล่า ถือเป็นตัวแทนของปริมาณของแข็งทั้งหมด ซึ่งค่าความชื้นจะคิดจากการนำค่าปริมาณของแข็งหักออกจากค่า 100

เครื่องมือ

1. ถ้วยอลูมิเนียมและฝาปิด
2. ตู้อบไฟฟ้า
3. เดสิคเคเตอร์
4. คีมคีบ และ/หรือ ถุงมือพลาสติก
5. ช้อนตักสาร
6. เครื่องชั่งละเอียด

วิธีวิเคราะห์

1.1.1 นำถ้วยอลูมิเนียมไปอบที่ 105-107 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำออกมาใส่ในเดสิคเคเตอร์ ให้เย็นชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอนด้วยเครื่องชั่งละเอียด (A)

1.1.2 ชั่งตัวอย่างในถ้วยให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 5 กรัม บันทึกน้ำหนักตัวอย่าง (B)

1.1.3 นำไปอบที่ตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105-107 องศาเซลเซียส นานประมาณ 5 ชั่วโมงนำออกไปชั่งใส่เดสิคเคเตอร์ ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปชั่ง จดน้ำหนัก

1.1.4 อบซ้ำนานครั้งละ 30 นาทีจนได้น้ำหนักต่างกันไม่เกิน 2 มิลลิกรัม จดน้ำหนักที่น้อยที่สุดถือเป็นน้ำหนักของถ้วยอลูมิเนียมและตัวอย่างหลังจากอบแห้งแล้ว (C)

วิธีคำนวณ

$$\text{ปริมาณความชื้น (ร้อยละของน้ำหนัก)} = \frac{100 \times (A+B) - C}{B}$$

เมื่อ A คือ น้ำหนักของถ้วยอลูมิเนียม (กรัม)

B คือ น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ (กรัม)

C คือ น้ำหนักของถ้วยอลูมิเนียมและน้ำหนักของตัวอย่างหลังจากอบแห้งแล้ว (กรัม)

1.2 การวิเคราะห์ปริมาณแก้ว

เครื่องมือ

1. ถ้วยอลูมิเนียมและฝาปิด
2. ตู้อบไฟฟ้า
3. เดสิคเคเตอร์
4. คีมคีบ และ/หรือ ถุงมือพลาสติก
5. ช้อนตักสาร
6. เครื่องชั่งละเอียด

วิธีวิเคราะห์

1.2.1 นำจานกระเบื้องไปเผาในเตาเผาไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 600 ± 20 °C นานประมาณ 1 ชม. จากนั้นนำมาใส่ในเดสิคเคเตอร์ ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำไปชั่ง

1.2.2 ทำการเผาจานกระเบื้องซ้ำอีกนาน 30 นาที จากนั้นนำมาใส่ในเดสิคเคเตอร์ ทิ้งไว้ให้เย็น ในอุณหภูมิห้อง นำไปชั่ง

1.2.3 ทำการทดลองซ้ำในข้อ 1.2 กระทั่งน้ำหนัก 2 ครั้งต่อเนื่องไม่ต่างกันเกิน 1 mg จดน้ำหนักที่น้อยที่สุด ถือเป็นน้ำหนักของจานกระเบื้องเคลือบ (W)

1.2.4 ชั่งตัวอย่างประมาณ 5 กรัม (W_1) ใส่ในจานกระเบื้องเคลือบที่เตรียมไว้ในข้อ 1.2.1-1.2.3

1.2.5 นำไปเผาด้วยไฟอ่อนๆ จนหมดควัน

1.2.6 นำไปใส่เตาเผาไฟฟ้าที่อุณหภูมิ $600 \pm 20^\circ\text{C}$ นานประมาณ 2-3 ชม. จนกระทั่งได้เถ้าสีขาวหรือสีเทา

1.2.7 นำออกมาใส่เตลิกเคเตอร์ ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องนำไปชั่ง (W_2)

วิธีคำนวณ

$$\text{ปริมาณเถ้าร้อยละของน้ำหนัก} = \frac{(W_2 - W) \times 100}{W_1}$$

W คือ น้ำหนักของจานกระเบื้องเคลือบ (กรัม)

W_1 คือ น้ำหนักของตัวอย่าง (กรัม)

W_2 คือ น้ำหนักของจานกระเบื้องเคลือบและตัวอย่างหลังจากเผาจนได้น้ำหนักคงที่ (กรัม)

1.3 การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน

สารเคมี และเครื่องมือ

1. ปีโตรเลียมอีเทอร์ ที่มีจุดเดือด $40-60^\circ\text{C}$
2. ชุดวิเคราะห์ไขมัน
3. ตู้อบลมร้อน
4. คีมคีบ และ/หรือ ถุงมือพลาสติก
5. ช้อนตักสาร
6. เครื่องชั่งละเอียด

วิธีวิเคราะห์

1.3.1 หาน้ำหนักแห้งของ can ไขมันโดยนำ can ไขมันไปอบที่อุณหภูมิ 105°C 3-5 ชั่วโมง

- 1.3.2 นำมาทำให้เย็นในเดสิคเคเตอร์ แล้วชั่งน้ำหนัก (A)
- 1.3.3 ชั่งตัวอย่าง 2.0-2.5 กรัม (W) ใส่ในกระดาษกรองเบอร์ 1 จด น้ำหนักที่แน่นอนไว้
- 1.3.4 ใส่ตัวอย่างลงใน thimble แล้วปิดด้วยวงแหวน
- 1.3.5 ใส่ petroleum ether 45 ml. ลงใน can ตั้งเวลาสกัด 20 นาที
- 1.3.6 ปิด switch ตั้งเวลาระเหย 45 นาที
- 1.3.7 นำ can ไขมันไปอบที่อุณหภูมิ 105° C 3-5 ชั่วโมง
- 1.3.8 นำมาทำให้เย็นในเดสิคเคเตอร์ แล้วชั่งน้ำหนัก (B)

วิธีคำนวณ

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

W คือ น้ำหนักแห้งของตัวอย่าง (กรัม)

1.4 การวิเคราะห์ปริมาณ NDF (Neutral Detergent Fiber)

หลักการ : Dietary Fiber : Non-starchy (ex. Non- α -glucan) polysaccharides plus Lignin.

NDF = Cellulose + Hemicellulose + Lignin

ADF = Cellulose + Lignin

\therefore NDF - ADF = Hemicellulose

เครื่องมือ

- 1.4.1 เครื่องชั่งละเอียด (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง)
- 1.4.2 เครื่องย่อย (Digestion Apparatus) ที่มีคอนเดนเซอร์ (Condenser) สำหรับควบคุมปริมาตรสารละลายให้คงที่ตลอดเวลาการย่อย
- 1.4.3 Vacuum pump
- 1.4.4 ตู้อบไฟฟ้า (สามารถตั้งค่าอุณหภูมิ 55 °C)
- 1.4.5 ตู้อบไฟฟ้า (สามารถตั้งค่าอุณหภูมิ 105 °C)

1.4.6 เตาเผาไฟฟ้า(สามารถตั้งค่าอุณหภูมิ 525 °C)

1.4.7 อ่างน้ำเดือด

1.4.8 AutoPipette ขนาด 100 ul

1.4.9 เครื่องแก้วและอุปกรณ์ :

- Beaker ชนิดไม่มีปากสำหรับย่อย ขนาด 600 มิลลิลิตร

- Fritted(sintered) glass crucibles ขนาด 50 มิลลิลิตร ชนิด

P₂ crucibles

40-90µm

- ชุดกรอง(Suction set)

- Beaker, Cylinder, คีมคีบ

สารเคมี

1. Enzyme α -amylase : Heat stable amylase (Termamyl)

[Activities = 10,000 + 1,000 units/ml. โดยวิธี

Nelson/Somogyi reducing sugar ที่มี soluble starch เป็น substrate เมื่อ 1 unit = ปริมาณ enzyme ที่ใช้ย่อยใน 1 นาทีได้ reducing sugar 1 µmole ที่ pH 6.5, 40°C]

2. Cold α -amylase

[Activities = 10,000 + 1,000 units/ml. โดยวิธี

Nelson/Somogyi reducing sugar ที่มี soluble starch เป็น substrate เมื่อ 1 unit = ปริมาณ enzyme ที่ใช้ย่อยใน 1 นาทีได้ reducing sugar 1 µmole ที่ pH 6.5, 40°C]

3. สารซักฟอกที่เป็นกลาง (Neutral Detergent) ประกอบด้วย

3.1sodium lauryl sulfat 148.5 g. ละลายในน้ำกลั่น 3 L.

3.2disodium EDTA 92.12 g. + Sodium

tetraborate(Na₂B₄O₇.10H₂O) 33.7 g. ละลายในน้ำกลั่น 1 L.(ให้ความร้อนขณะละลาย)

3.3sodium phosphate dibasic anhydrous(Na₂HPO₄) 22.57

g. ละลายในน้ำกลั่น 1 L.(ให้ความร้อนขณะละลาย)

ผสมสารละลาย 2.1 + 2.2 + 2.3 ในอัตราส่วน 3: 1 : 1 แล้วปรับ pH = 6.9 – 7.1 ด้วย NaOH หรือ HCl

4. Acetone

วิธีวิเคราะห์

- 1.4.1 บดตัวอย่างให้มีความละเอียดผ่าน sieve ขนาด 20 mesh
- 1.4.2 ทำการวิเคราะห์หาความชื้นของตัวอย่าง
- 1.4.3 ชั่งตัวอย่าง 0.5 g.(บันทึกน้ำหนัก(W₁) ทศนิยม 4 ตำแหน่ง -- 0.5xxx g.) ใส่ในปิកเกอร์สำหรับย่อย
- 1.4.4 เติมสารซักฟอกที่เป็นกลาง 100 ml. ลงในตัวอย่าง ตั้งบนเครื่องย่อย ต้มให้เดือดภายในเวลา 5 นาที
- 1.4.5 ลดอุณหภูมิให้ตัวอย่างเดือดอย่างสม่ำเสมอ ทำการย่อย (reflux) 60 นาที (สำหรับตัวอย่างที่มีปริมาณแป้งสูง ให้เติม Enzyme α -amylase 0.1 ml. เมื่อทำการย่อยไปแล้ว 30 นาที)
- 1.4.6 รongตัวอย่างผ่านถ้วยกรอง (sinter glass crucible) ที่ต่อกับชุดกรอง แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นร้อน 120 ml.(3 x 40 ml.)
- 1.4.7 แช่ถ้วยกรองในปิกเกอร์ 250 ml ที่มีสารละลาย Cold α -amylase (Enzyme 10 ml. + น้ำกลั่นร้อน 15 ± 2 ml) ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที กรอง Enzyme ทิ้งและล้างด้วยน้ำกลั่นร้อน 20 ml จากนั้นแช่ถ้วยกรองในสารละลาย Cold α -amylase (Enzyme 10 ml. + น้ำกลั่นร้อน 15 ± 2 ml) อีกครั้ง บ่มในตู้อบที่อุณหภูมิ 55°C $1 - 1\frac{1}{2}$ ชั่วโมง กรอง Enzyme ทิ้งและล้างด้วยน้ำกลั่นร้อน 20 ml (***)ดูหมายเหตุ(***)
- 1.4.8 กรองตัวอย่างแล้วล้างด้วยน้ำกลั่นร้อน 120 ml.(3 x 40 ml.)
- 1.4.9 ล้างตัวอย่างด้วย Acetone 40 ml. (2 x 20 ml.) กรองให้แห้ง
- 1.4.10 อบถ้วยกรองที่มีตัวอย่างในตู้อบที่อุณหภูมิ 105°C ประมาณ 12 ชั่วโมง(1 คืน) ใส่ในเดลิคเค-เตอร์ที่อุณหภูมิห้อง แล้วชั่งน้ำหนักด้วยกรongหลังอบ (W₂)
- 1.4.11 เผาตัวอย่างในเตาเผา ที่อุณหภูมิ 525°C 4 ชั่วโมง ใส่ในเดลิคเคเตอร์ที่อุณหภูมิห้อง แล้วชั่งน้ำหนักด้วยกรongหลังเผา (W₃)

- เตรียมด้วยกรอง - นำด้วยกรองเปล่าไปอบที่ 105 °C ประมาณ 1 คืน ทิ้งให้เย็น
ในเตลิกเคเตอร์ที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งน้ำหนักด้วยกรองเปล่าหลังอบ
(B1)
- นำด้วยกรองเปล่าไปเผาที่ 525 °C ประมาณ 4 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็น
ในเตลิกเคเตอร์ที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งน้ำหนักด้วยกรองเปล่าหลังเผา
(B2)

วิธีคำนวณ

$$\% \text{ Neutral Detergent Fiber (w/w)} = \frac{(W_2 - W_3 - B) \times 100}{W_1}$$

เมื่อ B คือ ผลต่างของด้วยกรองเปล่าหลังอบ และ
หลังเผา (g.)

คือ B1 - B2

W_1 คือ น้ำหนักแห้งของตัวอย่าง (กรัม)

W_2 คือ น้ำหนักด้วยกรองหลังอบ (กรัม)

W_3 คือ น้ำหนักด้วยกรองหลังเผา (กรัม)

หมายเหตุ กรณีไม่มี Cold α -amylase อาจดัดแปลงใช้สารละลาย heat stable α -amylase (Enzyme 1 ml. + น้ำกลั่นร้อน 100 ml) ให้ท่วมประมาณครึ่งหนึ่งของ
ด้วยกรอง บ่มในตู้อบที่อุณหภูมิ 55 °C 1 - 1 1/2 ชั่วโมง (โดยทำการทดลองแล้ว
ว่าสามารถย่อยแป้งในตัวอย่างได้หมด)

1.5 การวิเคราะห์ ADF (Acid Detergent Fiber) และลิกนิน (Lignin)

หลักการ : Dietary Fiber : Non-starchy (ex. Non- α -glucan)

polysaccharides plus Lignin.

$$\text{ADF} = \text{Cellulose} + \text{Lignin}$$

Cellulose ละลายในสารละลาย 72% H_2SO_4

$$\therefore \text{Lignin} = \text{ADF} - \text{Cellulose}$$

เครื่องมือ

1. เครื่องชั่งละเอียด (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง)
2. เครื่องย่อย (Digestion Apparatus) ที่มีคอนเดนเซอร์ (Condenser) สำหรับควบคุมปริมาตรสารละลายให้คงที่ตลอดเวลาการย่อย
3. Vacuum pump
4. ตู้อบไฟฟ้า(สามารถตั้งค่าอุณหภูมิ 105 °C)
5. เตาเผาไฟฟ้า(สามารถตั้งค่าอุณหภูมิ 500 °C)
6. เครื่องแก้วและอุปกรณ์ : - Beaker ชนิดไม่มีปากสำหรับย่อย ขนาด 600 มิลลิลิตร
7. Fritted(sintered) glass crucibles ขนาด 50 มิลลิลิตร ชนิด P₂ crucibles
8. 40-90µm
9. ชุดกรอง(Suction set)
10. Beaker, Cylinder, คีมคีบ

สารเคมี

1. สารซักฟอกที่เป็นกรด (Acid Detergent)
2. ละลาย cetyltrimethylammonium bromide(C₁₉H₄₂NBr) 20 g. ในสารละลาย 0.5 M H₂SO₄
3. ปริมาตร 1 Lit.
4. Acetone
5. 72%(w/w) H₂SO₄

วิธีวิเคราะห์ Acid Detergent Fiber (ADF)

- 1.5.1 อบด้วยกรงเปล่าในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 °C มากกว่า 4 ชั่วโมง (หรือ 1 คืน) ใส่ในเดสิคเคเตอร์ที่อุณหภูมิห้อง แล้วชั่งน้ำหนักด้วยกรงเปล่าหลังอบ (W₁)
- 1.5.2 บดตัวอย่างให้มีขนาด 1 mm.(ร่อนผ่าน sieve ขนาด 18 mesh)

1.5.3 ทำการวิเคราะห์หาความชื้นของตัวอย่าง

1.5.4 ชั่งตัวอย่าง 1.0 g.(บันทึกน้ำหนัก(W_2) ทศนิยม 4 ตำแหน่ง – 1.0xxx g.) ใส่ในปิ๊กเกอร์สำหรับย่อย

1.5.5 เติมสารซักฟอกที่เป็นกรด 100 ml. ลงในตัวอย่าง ตั้งบนเครื่องย่อย ต้มให้เดือดภายในเวลา 5 นาที

1.5.6 ลดอุณหภูมิให้ตัวอย่างเดือดอย่างสม่ำเสมอ ทำการย่อย(reflux) 60 นาที

1.5.7 กรองตัวอย่างผ่านถ้วยกรอง (sinter glass crucible) ที่ต่อกับชุดกรอง แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นร้อน 40 ml. ใช้แท่งแก้วคนตัวอย่างด้วย กรองให้แห้ง จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นร้อนซ้ำอีก 2 ครั้ง

1.5.8 ล้างตัวอย่างด้วย Acetone 40 ml. (2 x 20 ml.) กรองให้แห้ง

1.5.9 อบถ้วยกรองที่มีตัวอย่างในตู้อบที่อุณหภูมิ 105°C มากกว่า 3 ชั่วโมง(หรือ 1 คืน) ใส่ในเคิลิกเคเตอร์ที่อุณหภูมิห้อง แล้วชั่งน้ำหนักถ้วยกรองหลังอบ (W_3)

วิธีคำนวณ

$$\% \text{ Acid Detergent Fiber (w/w)} = \frac{(W_3 - W_1) \times 100}{W_2}$$

เมื่อ	W_1	คือ น้ำหนักถ้วยกรองเปล่าหลังอบ (กรัม)
	W_2	คือ น้ำหนักแห้งของตัวอย่าง (กรัม)
	W_3	คือ น้ำหนักถ้วยกรองหลังอบ (กรัม)

วิธีวิเคราะห์ Lignin

1. นำถ้วยกรองที่มีตัวอย่างจากการวิเคราะห์ Acid Detergent Fiber ใส่ลงในปิ๊กเกอร์ 50 ml. แล้วเติม 72%(w/w) H_2SO_4 ประมาณ 25 ml. ให้ท่วมตัวอย่างในถ้วยกรอง ใช้แท่งแก้วคนให้เส้นใยกระจายตัว แช่แท่งแก้วไว้ในปิ๊กเกอร์ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ $20 - 23^{\circ}\text{C}$ เวลา 1 ชั่วโมง

2. กรองสารละลายกรดทิ้งโดยต่อกับชุดกรอง เปลี่ยน 72%(w/w) H_2SO_4 ใหม่ทุก 1 ชั่วโมง จนครบ 3 ชั่วโมงแล้วล้างด้วยน้ำกลั่นร้อนใช้แท่งแก้วคน

ตัวอย่างด้วย จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นร้อนซ้ำวัดค่า pH ของน้ำที่กรองได้ให้เป็นกลาง ล้างด้านข้างของถ้วยกรองและแท่งแก้วไม่ให้มีตัวอย่างติด กรองให้แห้ง

3. อบถ้วยกรองที่มีตัวอย่างในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 °C ประมาณ 1 คืน ใส่ในเตลิกเคเตอร์ที่อุณหภูมิห้อง แล้วชั่งน้ำหนักถ้วยกรองหลังอบ (W_4)

4. เผาตัวอย่างในเตาเผา ที่อุณหภูมิ 500 °C 2 ชั่วโมง(หรือจนเป็นเถ้า) ใส่ในเตลิกเคเตอร์ที่อุณหภูมิห้อง แล้วชั่งน้ำหนักถ้วยกรองหลังเผา (W_5)

วิธีคำนวณ

$$\% \text{ Lignin (w/w)} = \frac{(W_4 - W_5) \times 100}{W_2}$$

เมื่อ	W_2	คือ	น้ำหนักแห้งของตัวอย่าง (กรัม)
	W_4	คือ	น้ำหนักถ้วยกรองหลังอบ (กรัม)
	W_5	คือ	น้ำหนักถ้วยกรองหลังเผา (กรัม)

ภาคผนวก 2. การวิเคราะห์สมบัติเคมีของน้ำมัน

2.1 การวัดค่าไอโอดีน

เครื่องมือ

1. ขวดแก้วรูปชมพู่แบบมีฝาขนาด 500 มล.
2. ขวดปริมาตรขนาด 1 ลิตร สำหรับเตรียมสาร
3. ปิเปตขนาด 25 มล.
4. แท่งแม่เหล็กกวน
5. Burette
6. กระจกกรองเบอร์ 41H หรือเทียบเท่า

สารเคมี

1. Wijs solution

2. สารละลาย KI เข้มข้น 10 % (w/v) (เตรียมใหม่ทุกครั้ง)
3. สารละลายไซโคลเฮกเซน:กรดอะซิติก (1:1 โดยปริมาตร)
4. กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น
5. 1% soluble starch (เตรียมใหม่ทุกครั้ง)
6. สารละลาย $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ เข้มข้น 0.1 N (สอบเทียบมาตรฐานด้วย $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$)

วิธีวิเคราะห์

- 2.1.1 ชั่งตัวอย่าง 0.2 ± 0.05 กรัม ใส่ขวดแก้วรูปชมพู่
- 2.1.2 เติมสารละลายไซโคลเฮกเซน: กรดอะซิติก (1:1) 15 มล. และเขย่าให้เข้ากัน
- 2.1.3 เติมสารละลาย Wijs 25 มล. ปิดฝาขวดให้แน่น เขย่าจนเข้ากันดี
- 2.1.4 ตั้งขวดแก้วทิ้งไว้ในที่มืด 1 ชม.
- 2.1.5 เติมสารละลาย KI เข้มข้น 10 % 20 มล. และเติมน้ำกลั่น 100 มล. ภายใน 3 นาที
- 2.1.6 ไทเทรตกับสารละลาย $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ เข้มข้น 0.1 N (ภายใน 30 นาที) (ค่อย ๆ เติมอย่างสม่ำเสมอ พร้อมเขย่าแรง ๆ ให้เข้ากันดี จนสีเหลืองเกือบจางหายไป)
- 2.1.7 เติม 1% soluble starch 1-2 มล.
- 2.1.8 ไทเทรตต่อจนสีน้ำเงินจางหายไป

หมายเหตุ ทำการวิเคราะห์ Blank ควบคู่กันไป

วิธีคำนวณ

$$\text{Iodine value} = \frac{(B-S) \times N \times 12.69}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}}$$

เมื่อ B คือ ปริมาตร $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ เข้มข้น 0.1 N ที่ใช้ไทเทรต Blank (มล.)

S คือ ปริมาตร $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ เข้มข้น 0.1 N ที่ใช้ไทเทรตตัวอย่าง (มล.)

N คือ ความเข้มข้นของ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (N)

วิธีสอบเทียบมาตรฐาน $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ เข้มข้น 0.1 N

1. ชั่ง $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ที่ผ่านการอบแห้งเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จำนวน 0.16-0.22 กรัม (W) ใส่ขวดแก้วรูปชมพู่
2. เติมน้ำกลั่น 25 มล. และกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 5 มล.
3. เติมสารละลาย KI เข้มข้น 15 % 20 มล. และเขย่าจนเข้ากันดี
4. ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที
5. เติมน้ำกลั่น 100 มล. เขย่าให้เข้ากัน
6. ไทเทรตกับสารละลาย $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (ภายใน 30 นาที) (ค่อย ๆ เติมอย่างสม่ำเสมอ พร้อมเขย่าแรง ๆ ให้เข้ากันดี จนสีเหลืองเกือบจางหายไป)
7. เติม 1% soluble starch 1-2 มล.
8. ไทเทรตต่อจนสีน้ำเงินจางหายไป

วิธีการคำนวณ

$$\text{Normality of } \text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \text{ solution} = \frac{20.394 \times W}{V}$$

เมื่อ W คือ น้ำหนักแห้งของ $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (กรัม)

V คือ ปริมาตร $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ที่ใช้ไทเทรต (มล.)

2.2 การวัดค่าเปอร์ออกไซด์

เครื่องมือ

1. ขวดรูปชมพู่แบบมีฝาขนาด 250 มล.
2. ขวดปริมาตรขนาด 1 ลิตร สำหรับเตรียมสาร
3. Auto pipette ขนาด 1 มล.
4. Burette

สารเคมี

1. สารละลายไอโซออกเทน: กรดอะซิติก (3:2 โดยปริมาตร)
2. สารละลาย KI อิมัตัว (เตรียมใหม่ทุกครั้ง)
3. สารละลาย $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ เข้มข้น 0.1 N (สอบเทียบมาตรฐานด้วย $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$)
4. สารละลาย $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ เข้มข้น 0.01 N
5. 1% soluble starch (เตรียมใหม่ทุกครั้ง)
6. สารละลาย Sodium lauryl sulfate (SDS) เข้มข้น 10 % (w/v)

วิธีวิเคราะห์

- 2.2.1 ชั่งตัวอย่าง 5.00 ± 0.05 กรัม (W) ในขวดแก้ว
- 2.2.2 เติมสารละลายไอโซออกเทน: กรดอะซิติก (3:2) 50 มล. และหมุนขวดแก้วเพื่อให้ตัวอย่างละลาย
- 2.2.3 เติมสารละลาย KI อิมัตัว 0.5 มล.
- 2.2.4 ทิ้งไว้ 1 นาทีโดยเขย่าให้ทั่วถึง อย่างน้อย 3 ครั้งในช่วงเวลา 1 นาที
- 2.2.5 เติมน้ำกลั่น 30 มล. ทันที
- 2.2.6 ไทเทรตกับสารละลาย $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ เข้มข้น 0.01 N (ค่อยๆ เติมอย่างสม่ำเสมอ พร้อมเขย่าแรงๆ ให้เข้ากันดี จนสีเหลืองเกือบจางหาย)
- 2.2.7 เติมสารละลาย SDS เข้มข้น 10 % 0.5 มล.
- 2.2.8 เติม 1% soluble starch 0.5 มล.
- 2.2.9 ไทเทรตต่อด้วยสารละลาย $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ที่ละหยด จนสีน้ำเงินจางหายไป

หมายเหตุ - ทำการวิเคราะห์ Blank ควบคู่กันไป

- ตัวอย่างแยกชั้น ไทเทรตจนกระทั่งสีน้ำเงินในชั้นล่างหมดไป เกิดเป็นสารละลายสีขาว

วิธีคำนวณ

$$\text{Peroxid value (meq. Peroxid/1000 g sample)} = \frac{(S-B) \times N \times 1000}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}}$$

เมื่อ B คือ ปริมาตร $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ เข้มข้น 0.1 N ที่ใช้ไทเทรต Blank (มล.)

S คือ ปริมาตร $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ เข้มข้น 0.1 N ที่ใช้ไทเทรตตัวอย่าง (มล.)

N คือ ความเข้มข้นของ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (N)

2.3 การวัดปริมาณกรดไขมันอิสระ

เครื่องมือ

1. ขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 250 มล.
2. Burette
3. Hot plate
4. กระจกตวง

สารเคมี

1. เอทานอล 95 %
2. สารละลายฟีนอล์ฟทาลีน 1 % ในเอทานอล 95 %
3. สารละลาย NaOH 0.25 N (สอบเทียบมาตรฐานด้วย $\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$)

วิธีวิเคราะห์

2.3.1 ชั่งตัวอย่าง 7.05 ± 0.05 กรัมในขวดแก้ว

2.3.2 เติมเอทานอล 95 % 75 มล. ผสมสารละลายฟีนอล์ฟทาลีน 1% 2 มล. (ปรับเป็นกลางด้วย NaOH โดยอุ่นให้ร้อนก่อนใช้ทุกครั้ง)

2.3.3 ไทเทรตกับสารละลาย NaOH 0.25 N เขย่าแรง ๆ จนเกิดสีชมพูใกล้เคียงกับสารละลายเอทา-นอล 95 % ก่อนเติมตัวอย่าง และคงอยู่ 30 วินาที

วิธีคำนวณ

$$\text{Free fatty acid as oleic (\%)} = \frac{S \times N \times 28.2}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}}$$

เมื่อ S คือ ปริมาตร NaOH เข้มข้น 0.25 N ที่ใช้ไทเทรตตัวอย่าง (มล.)
N คือ ความเข้มข้นของ NaOH (N)

$$\text{Acid value} = (\text{Free fatty acid as oleic (\%)}) \times 1.99$$

วิธีสอบเทียบมาตรฐาน NaOH เข้มข้น 0.25 N

1. ชั่ง $\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$ กรัม ในขวดแก้ว
2. เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการต้มไล่คาร์บอนไดออกไซด์ 50 มล.
3. ปิดจุก และเขย่าให้เข้ากันดี
4. หยดสารละลายฟีนอล์ฟทาลีน 3 หยด
5. ไทเทรตด้วยสารละลาย NaOH เข้มข้น 0.25 N จนได้สารละลาย

สีชมพูอ่อน

วิธีคำนวณ

$$\text{Normality} = \frac{W}{V \times 0.20444}$$

เมื่อ W คือ น้ำหนักแห้งของ $\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$ (กรัม)
V คือ ปริมาตร NaOH ที่ใช้ไทเทรต (มล.)

2.4 การวิเคราะห์กรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันสบู่ดำโดย เครื่อง Gas chromatography

เนื่องจากกรดไขมันของน้ำมันสกัดจากสบู่ดำมีขนาดโมเลกุลใหญ่ ทำให้ไม่สามารถระเหยได้ในขณะทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC (GC-BPX 70) จึงจำเป็นต้องผ่านการทำปฏิกิริยา Saponification และ Methylation ก่อน

เครื่องมือ

1. Micropipette
2. Glass pipette 15 ml
3. 50 และ 100 ml flat bottom flask
4. 100 ml separatory funnel
5. 50 และ 500 ml duran bottle
6. 250 ml beaker
7. Rotary Evaporator
8. pH paper

สารเคมี

1. สารละลาย KOH เข้มข้น 1 M ในเอทานอล 95%
2. สารละลาย Hexane:diethyl ether (1:1 โดยปริมาตร)
3. สารละลาย HCl เข้มข้น 6 N
4. Anhydrous Na_2SO_4
5. สารละลาย Hexane
6. 2 % methanolic acid

วิธีวิเคราะห์

■ Saponification and Extraction

1. ชั่งตัวอย่างน้ำมันสบู่ดำ 100 มิลลิกรัม ใส่ใน flat bottom flask ขนาด 100 มล.

2. เติมสารละลาย KOH เข้มข้น 1 M 20 มล.
3. Reflux เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส
4. ถ่ายสารละลายที่ได้จากข้อ 3 ลงในกรวยแยกขนาด 100 มล. และเติมน้ำกลั่น 100 มล.
5. สารละลาย Hexane: diethyl ether (1:1 โดยปริมาตร) 50 มล.
6. เขย่าให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้ให้เกิดการแยกชั้น
7. แยกเก็บสารละลายส่วนบน (Organic phase)
8. นำส่วนล่าง (Aqueous phase) ใส่คืนกลับไปในกรวยแยก
9. ทำขั้นตอนตามข้อ 5-7 จำนวน 3 ครั้ง และเก็บสารละลายส่วนล่าง (Aqueous phase) ใส่ในกรวยแยก
10. เติมสารละลาย HCl เข้มข้น 6 N 4 มล. ในสารละลายส่วนล่าง (Aqueous phase) จากข้อ 9 และตรวจ pH ให้ต่ำกว่า 3 ด้วย pH paper
11. เติมสารละลาย Hexane: diethyl ether (1:1 โดยปริมาตร) 50 มล. เขย่าให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้ให้เกิดการแยกชั้น
12. เก็บสารละลายส่วนบน (Organic phase) ใส่ใน flat bottom flask ขนาด 100 มล.
13. ทำขั้นตอนตามข้อ 11 และ 12 จำนวน 3 ครั้ง
14. นำสารละลายส่วนบน (Organic phase) จากข้อ 13 มาระเหยด้วย Rotary Evaporator
15. จดน้ำหนักที่แน่นอนของสารที่ได้

■ Methylation

1. นำสารที่ได้จากข้อ 15 ละลายด้วยสารละลาย Hexane 1.5 มล. และเก็บสารละลายที่ได้ใน eppendrop
2. คูดสารละลายจากข้อ 2 ให้มีปริมาณสารเท่ากับ 50 มก.
3. นำมาระเหยด้วย Rotary Evaporator และจดน้ำหนักที่แน่นอน
4. เติมสารละลาย 2 % methanolic acid 5 มล.
5. Reflux เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส
6. คูดสารละลายที่ได้ลงในขวดฝาเกลียวขนาด 20 มล.

7. เติมสารละลาย Hexane 5 มล. เขย่าให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้ให้เกิดการแยกชั้น
8. ดูดสารละลายส่วนบนเก็บไว้ใน flat bottom flask ขนาด 100 มล.
9. ทำขั้นตอนตามข้อ 8 และ 9 จำนวน 3 ครั้ง
10. นำสารละลายระเหยด้วย Rotary Evaporator และจดน้ำหนักที่แน่นอน
11. ละลายสารละลายที่ได้ด้วยสารละลาย Hexane 1.5 มล. และเก็บสารละลายที่ได้ใน eppendrop
12. เจือจางสารละลายที่ได้ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1 มก./มล. ด้วยสารละลาย Hexane
13. เก็บสารละลายที่ได้ในขวด vial เพื่อเตรียมฉีด GC

■ Gas Chromatography (GC)

ฉีดตัวอย่างปริมาณ 1 ไมโครลิตร เข้าเครื่อง GC ซึ่งควบคุมอุณหภูมิหัวฉีดที่อุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส (สูงกว่าจุดเดือดขององค์ประกอบที่ระเหยได้น้อยที่สุด) คัดแยกองค์ประกอบต่างๆออกจากกันตามความแตกต่างของลักษณะการแบ่งส่วน (partitioning behavior) ขององค์ประกอบในเฟสก๊าซเคลื่อนที่และเฟสคงที่ในคอลัมน์คานาปิลลารี (70% Cyanopropyl Polysilphenylene-siloxane) ซึ่งมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตร ความยาว 30 เมตร โดยใช้ความดัน 141 กิโลปาสคาล อัตราการเคลื่อนที่ 25 มิลลิลิตร/นาที ปรับให้คอลัมน์มีอุณหภูมิเริ่มต้นคงที่ที่อุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียส และคงไว้เป็นเวลา 30 วินาที เพิ่มอุณหภูมิเป็น 200 องศาเซลเซียส ในอัตรา 10 องศาเซลเซียส/นาที และคงไว้เป็นเวลา 2 นาที โดยใช้เวลาในการทดสอบทั้งสิ้น 6.5 นาที วิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันต่างๆ โดยเทียบกับปริมาณกรดไขมันมาตรฐาน

ภาคผนวก 3. การวิเคราะห์ปริมาณสารพิษฟอรับออลเอสเทอร์

เครื่องมือ

1. เครื่อง Soxhlet Extraction

2. อุปกรณ์ในการสกัด

สารเคมี

1. สารละลายเมทานอล
2. สารละลาย Acetonitrile (HPLC grade): น้ำกลั่น (80:20 โดยปริมาตร)

วิธีวิเคราะห์

1. ชั่งกากสมุนไพร 10 กรัม สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล 250 มล. ด้วยเครื่อง Soxhlet Extraction เป็นเวลา 4 ชั่วโมง
2. สารสกัดที่ได้จะนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสาร Phorbol Esters โดยใช้เครื่อง HPLC
3. การวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง HPLC

ใช้คอลัมน์ Reversed phase column ขนาด 125 x 4 mm. สภาวะที่ใช้ คือ คอลัมน์ถูกควบคุมให้มีอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ใช้สารละลายผสมของ Acetonitrile: น้ำกลั่น (80:20 โดยปริมาตร) เป็นตัว eluent ด้วยอัตราเร็วในการไหลเท่ากับ 1 มล/นาที Detector จะใช้ UV detector โดยตั้งค่าความยาวคลื่นเท่ากับ 280 นาโนเมตร การฉีดตัวอย่างวิเคราะห์จะใช้ปริมาตรเท่ากับ 20 ไมโครลิตร

การทำกราฟมาตรฐานทำโดยใช้สาร Phorbol Esters ชนิด TPA (Tetradecanoyl Phorbol Acetate) ของบริษัท Sigma จำกัด เป็น external standard

ภาคผนวก 4 การวิเคราะห์ปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน (Hamerstrand *et al*, 1981)

การเตรียมสารเคมี

1. Tris-Buffer ชั่ง aminomethane (hydroxymethyl) 1.21 กรัม และ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.59 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 180 มิลลิลิตร ปรับพีเอช

ประมาณ 8.2 ด้วย 1N HCl ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 200 มิลลิลิตร สารละลายนี้ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เพื่อใช้สำหรับการเตรียมสารละลาย BAPA

2. สารละลาย BAPA (Benzoyl-DL-arginine-p-nitroanalide hydrochloride) ชั่ง BAPA 0.080 กรัม ละลายใน dimethyl sulfoxide ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 200 มิลลิลิตรด้วย tris-buffer

3. สารละลายทริปซิน (Trypsin solution) ชั่งทริปซิน 0.0040 กรัม ละลายใน 0.001 N HCl ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 200 มิลลิลิตร

การสกัดสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินออกจากตัวอย่างกากสับุดำ

ตัวอย่างกากสับุดำ 1 กรัมใน 0.01 N NaOH ปรับ pH ให้อยู่ระหว่าง 8.4-10.0 ผสมเข้ากันเป็นเวลา 3 ชั่วโมง กรองเอาแต่ส่วนใสมาวิเคราะห์

วิธีการวิเคราะห์

1. ตัวอย่างส่วนใสที่ได้จากการสกัดปริมาตร 2 มิลลิลิตร เติมสารละลายทริปซินปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที สำหรับสารละลายทริปซินมาตรฐาน ใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง

2. เติมสารละลาย BAPA (บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสก่อนใช้) อย่างรวดเร็ว ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

3. เติม 30% acetic acid ปริมาตร 1 มิลลิลิตรเพื่อหยุดปฏิกิริยา ผสมให้เข้ากัน

สำหรับ sample blank ใช้ตัวอย่างส่วนใสที่ได้จากการสกัด ทำเหมือนกับตัวอย่าง แต่ให้เติมสารละลายทริปซิน หลังจากที่ยหยุดปฏิกิริยาด้วย 30% acetic acid แล้ว

การคำนวณ

$$TI \text{ (mg/g sample)} = (OD_{\text{std trypsin}} - OD_{\text{sample}}) / 19 \times \text{dilution factor}$$

ภาคผนวก 5 ต้นทุนการผลิตไบโอดีเซลจากสบู่ดำ (จากการสอบถามภาคสนาม)

ตารางผนวกที่ 1 ต้นทุนการผลิตน้ำมันสบู่ดำ

รายการ	
ราคาซื้อเมล็ดสบู่ดำ (บาท/กิโลกรัม)	5-18
กำลังการผลิตน้ำมันสบู่ดำ (ลิตร/วัน)	30
ค่าน้ำมันดิบสำหรับเครื่องหีบ (บาท/ลิตร)	1.06
ค่าแรง (บาท/วัน)	150
ปริมาณน้ำมันสบู่ดำที่หีบได้ (ลิตร/เมล็ดสบู่ดำ 100 กิโลกรัม)	25
ปริมาณกากสบู่ดำที่ได้จากการหีบ (กิโลกรัม/เมล็ดสบู่ดำ 100 กิโลกรัม)	75
ราคาจำหน่ายกากสบู่ดำ (บาท/กิโลกรัม)	3

ตารางผนวกที่ 2 ต้นทุนการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันสบู่ดำ

รายการ	
ราคาโซเดียมไฮดรอกไซด์ (บาท/กิโลกรัม)	40-45
ราคาเมทานอล (บาท/กิโลกรัม)	12-30
กำลังการผลิตไบโอดีเซล (ลิตร/วัน)	100-200
ค่าแรง (บาท/วัน)	150
ค่าไฟฟ้า และค่าน้ำ (บาท/ลิตร)	2
ราคาจำหน่ายกลีเซอรอล (บาท)	3