

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การวิเคราะห์เยื่อใย (Crude Fiber)

เยื่อใยเป็นสารประกอบพอลิเมอร์คาร์โบไฮเดรตชนิดหนึ่ง ที่พบมากในพืช ประกอบด้วย เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน เป็นส่วนใหญ่ สัตว์โดยทั่วไปใช้คาร์โบไฮเดรตชนิดนี้ไม่ได้ เพราะไม่มีน้ำย่อยในระบบย่อยอาหารของสัตว์ชนิดใดสามารถย่อยได้ นอกจากสัตว์เคี้ยวเอื้อง และ สัตว์พวกกระต่ายและม้าเท่านั้น โดยที่ในกระเพาะรวมของสัตว์เคี้ยวเอื้อง และไส้ติ่งของสัตว์พวก กระต่าย และม้า มีจุลินทรีย์ที่สามารถย่อย คาร์โบไฮเดรตชนิดนี้ได้

คาร์โบไฮเดรตเป็นโภชนะสำคัญที่ให้พลังงานและความร้อนแก่ร่างกายสัตว์ เป็น สารอินทรีย์ที่มีสูตรโครงสร้าง ประกอบด้วยธาตุคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน โดยที่ อัตราส่วนระหว่างธาตุไฮโดรเจนกับออกซิเจนเป็น 2:1 เท่ากับในโมเลกุลของน้ำ คาร์โบไฮเดรต แบ่งเป็น 2 ชนิดคือ

- เยื่อใย (Crude fiber หรือ Structural carbohydrate) ทำหน้าที่เป็นโครงสร้างส่วนต่างๆ ของ พืช ทำให้พืชคงรูปร่างอยู่ได้ เยื่อใยประกอบด้วยเซลลูโลสประมาณ 95% ของเยื่อใย ทั้งหมด และมีลิกนิน และเฮมิเซลลูโลส ประกอบอยู่บ้างเล็กน้อย
- Nitrogen Free Extract (NFE หรือ Non Structural carbohydrate) เป็น คาร์โบไฮเดรต ส่วนที่สัตว์ทุกชนิดย่อยได้ง่าย และนำไปใช้ประโยชน์ได้ ประกอบด้วยแป้ง และน้ำตาล

ปริมาณเยื่อใยในอาหารสัตว์ใช้วัดคุณค่าทางอาหารของสัตว์แต่ละประเภท เพราะสัตว์บาง พวก เช่น สัตว์ปีกใช้ประโยชน์จากเยื่อใยได้น้อยมากดังนั้นอาหารที่มีเยื่อใยสูง จัดเป็นอาหารที่มี คุณภาพต่ำสำหรับสัตว์ปีก ในขณะที่สัตว์เคี้ยวเอื้อง อาหารที่มีเยื่อใยต่ำได้แก่ อาหารข้น จัดว่ามี คุณภาพสูงเพราะสัตว์ทุกชนิดย่อยได้ง่าย แต่อาหารที่มีปริมาณเยื่อใยสูงได้แก่ อาหารหยาบ เช่น พืช อาหารสัตว์ จัดเป็นอาหารที่มีคุณภาพต่ำ เพราะสัตว์ย่อยได้ยาก ถึงแม้เยื่อใยจะเป็นส่วนของอาหาร ที่สัตว์ย่อยได้ไม่มาก แต่สัตว์จำเป็นต้องได้รับอาหารพวกนี้บ้างเพื่อให้ระบบการย่อยอาหารเป็นไป ตามปกติ และระบบขับถ่ายของเสียต่างๆ ที่ตกค้างในร่างกายเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ

วิธีการ

1. อบถ้วย crucible NO.2 ในตู้อบอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 1 ชม.นำออกจากตู้อบ และปล่อยให้เย็นในโถอบแห้ง ชั่งน้ำหนัก (W1)
2. ชั่งตัวอย่างที่ผ่านการสกัดไขมันแล้ว 1.02 กรัม บันทึกน้ำหนัก (W 2)
3. นำถ้วย crucible ที่มีตัวอย่างเข้าเครื่อง Hot Extraction Unit 1020
4. ใส่สารละลายกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1.25 เปอร์เซนต์ ลงใน column ปริมาตร 150 ml. ใช้เวลาในการย่อยตัวอย่าง 30 นาที
5. เมื่อครบระยะเวลาย่อย ให้ล้างตัวอย่างด้วยน้ำร้อน จนหมดฟอง (เช็ค pH เป็นกลาง)
6. เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1.25 เปอร์เซนต์ ลงใน column ปริมาตร 150 ml. ใช้เวลาในการย่อยตัวอย่าง 30 นาที
7. เมื่อครบระยะเวลาย่อย ให้ล้างตัวอย่างด้วยน้ำร้อน จนหมดฟอง (เช็ค pH เป็นกลาง)
8. นำถ้วย crucible ที่มีตัวอย่าง ล้างด้วย Acetone ประมาณ 3 ครั้ง ครั้งละ 25 มิลลิลิตร
9. อบตัวอย่างที่ผ่านการย่อยในตู้อบอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 5 ชม.นำออกจากตู้อบ และปล่อยให้เย็นในโถอบแห้ง ชั่งน้ำหนัก (W3)
10. เผาตัวอย่างที่ผ่านการอบในเครื่องเผาอุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 2 ชม.นำออกจากตู้อบ และปล่อยให้เย็นในโถอบแห้ง ชั่งน้ำหนัก (W4)
11. คำนวณหาปริมาณเยื่อใยหยาบ

การคำนวณ

$$\% \text{เยื่อใยหยาบ} = \frac{\text{น้ำหนักถ้วยพร้อมตัวอย่างหลังเผา (W 4) - น้ำหนักถ้วยพร้อมตัวอย่างหลังอบ (W3)} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (W2)}}$$

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์ Acid detergent fiber (ADF) (งานวิเคราะห์อาหารสัตว์, 2553)

ADF คือส่วน ที่เหลือจากการนำตัวอย่างพืชไปย่อยด้วยสารละลาย Acid Detergent ซึ่งมีความเข้มข้นของกรดในสารละลายเท่ากับ 1 N. และมี detergent คือ Cetyl trimethylammonium bromide จะย่อยโปรตีนในเซลล์พืช ส่วน Acetone จะละลายไขมันและเมือตีสต่างๆ ส่วนที่เหลือที่ไม่ละลายในสารละลาย จะเป็นสารที่อยู่ในส่วนของ ADF ได้แก่ Cellulose Lignin Cutin และ Acid Insoluble ash (AIA)

ADF มิได้หมายถึงเยื่อใยในอาหารหรือในพืชทั้งหมด เพราะไม่ได้รวมส่วนของ Hemicellulose รวมอยู่ด้วย ทำให้ปริมาณที่ได้ส่วนใหญ่ จะมีค่าสูงกว่าค่าของ CF แสดงให้เห็นชัดว่าการหาปริมาณของเยื่อใย โดยการใช้ CF ในอาหารนั้นต่ำกว่าความเป็นจริง ปริมาณของ ADF ในอาหารสัตว์ก็เป็นในทำนองเดียวกันกับปริมาณของ NDF คือในอาหารชั้นจะมีปริมาณของ NDF ต่ำกว่าในอาหารหยาบ และในพืชอาหารสัตว์ปริมาณของ ADF จะเพิ่มขึ้นตามอายุการเก็บเกี่ยวของพืช

วิธีการ

1. อบถ้วย crucible NO.2 ในตู้อบอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 1 ชม. นำออกจากตู้อบ และปล่อยให้เย็นในโถอบแห้ง ชั่งน้ำหนัก(W1)
2. ชั่งตัวอย่างใส่ crucible 1.02 กรัม บันทึกน้ำหนัก (W 2)
3. นำถ้วย crucible ที่มีตัวอย่างเข้าเครื่อง Hot Extraction Unit 1020
4. ใส่สารละลาย Acid Detergent ลงใน column ปริมาตร 100 ml. ใช้เวลาในการย่อยตัวอย่าง 60 นาที
5. เมื่อครบระยะเวลาย่อย ให้ล้างตัวอย่างด้วยน้ำร้อน จนหมดฟอง (เช็ค pH เป็นกลาง)
6. นำถ้วย crucible ที่มีตัวอย่าง ล้างด้วย Acetone ประมาณ 3 ครั้ง ครั้งละ 25 ml.
7. อบตัวอย่างที่ผ่านการย่อยในตู้อบอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 5 ชม. นำออกจากตู้อบและปล่อยให้เย็นในโถอบแห้ง ชั่งน้ำหนัก(W3)
8. เผาตัวอย่างที่ผ่านการอบในเครื่องเผาอุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 2 ชม. นำออกจากตู้อบและปล่อยให้เย็นในโถอบแห้ง ชั่งน้ำหนัก(W4)
9. คำนวณหาปริมาณ ADF

การคำนวณ

$$\% \text{ ADF} = \frac{\text{น้ำหนักถ้วยพร้อมตัวอย่างหลังเผา (W4)} - \text{น้ำหนักถ้วยพร้อมตัวอย่างหลังอบ (W3)}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (W2)} \times 100}$$

$$\% \text{ Hemicellulose} = \% \text{ NDF} - \% \text{ ADF}$$

ภาคผนวก ก

การวิเคราะห์ Neutral detergent fiber (NDF) (งานวิเคราะห์อาหารสัตว์, 2553)

NDF หมายถึงกลุ่มของสารเคมีต่างๆที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ของพืช ซึ่งส่วนใหญ่ได้แก่ Cellulose Hemicellulose และ Lignin รวมทั้ง Cutin Silica และ Tannin โดยปกติสัตว์กระเพาะเคี้ยว ไม่สามารถจะย่อย หรือย่อยได้เป็นส่วนน้อย ส่วนสัตว์เคี้ยวเอื้อง หรือสัตว์กระเพาะรวม ซึ่งมีจุลินทรีย์อาศัยอยู่ในกระเพาะ สามารถจะย่อยบางส่วนของ NDF ได้บ้าง แต่ความสามารถย่อยได้มากน้อย แปรผันขึ้นอยู่กับปริมาณของ lignin cutin และ silica ที่อยู่ในอาหารนั้นๆ ดังนั้นจึงมักถือว่าอาหารสัตว์ที่มีระดับของ NDF สูงจะย่อยยาก หรือมีคุณภาพต่ำกว่าอาหารที่มี NDF ต่ำ เช่นอาหารหยาบมีปริมาณของ NDF สูงกว่าในอาหารข้น พืชอาหารสัตว์ตระกูลหญ้ามีปริมาณของ NDF สูงกว่าพืชตระกูลถั่ว หรือพืชอาหารสัตว์ที่เก็บเกี่ยวเมื่อมีอายุมาก ปริมาณของ NDF ก็สูงกว่าพวกที่ตัดเมื่ออายุน้อย โดยปกติอาหาร หรือพืชที่มีปริมาณของ NDF สูงการย่อยได้ของ NDF มักจะต่ำไปด้วย

NDS เป็นส่วนของเซลล์พืชที่ละลายในสารละลาย Neutral detergent เรียกว่า Neutral detergent soluble ซึ่ง ประกอบด้วย คาร์โบไฮเดรตที่ละลายง่าย แป้ง กรดอินทรีย์ต่างๆ โปรตีน และ pectin สารต่างๆนี้สัตว์ทุกชนิดสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้

วิธีการ

1. อบถ้วย crucible NO.2 ในตู้อบอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 1 ชม.นำออกจากตู้อบและปล่อยให้เย็นในโถอบแห้ง ชั่งน้ำหนัก(W1)
2. ชั่งตัวอย่างใส่ crucible 1.02 กรัม บันทึกน้ำหนัก (W 2) ใส่สาร sodium sulphite 0.5 กรัม
3. นำถ้วย crucible ที่มีตัวอย่างเข้าเครื่อง Hot Extraction Unit 1020
4. ใส่สารละลาย Neutral Detergent ลงใน column ปริมาตร 100 ml.ใช้เวลาในการย่อยตัวอย่าง 60 นาที
5. เมื่อครบระยะเวลาย่อย ให้ล้างตัวอย่างด้วยน้ำร้อน จนหมดฟอง (เช็ค pH เป็นกลาง)
- 6.นำถ้วย crucible ที่มีตัวอย่าง ล้างด้วย Acetone ประมาณ 3 ครั้ง ครั้งละ 25 ml.
7. อบตัวอย่างที่ผ่านการย่อยในตู้อบอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 5 ชม.นำออกจากตู้อบและปล่อยให้เย็นในโถอบแห้ง ชั่งน้ำหนัก(W3)
8. เผาตัวอย่างที่ผ่านการอบในเตาเผาอุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 2 ชม.นำออกจาก

ตุ๋บและปล่อยให้เย็นในโถอบแห้ง ชั่งน้ำหนัก (W4)

9. คำนวณหาปริมาณ NDF

การคำนวณ

$$\% \text{ NDF} = \frac{\text{น้ำหนักถ้วยพร้อมตัวอย่างหลังเผา (W 4) - น้ำหนักถ้วยพร้อมตัวอย่างหลังอบ (W3)} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (W2)}}$$

$$\% \text{ NDS} = 100 - \text{NDF}$$

ภาคผนวก ง

การวิเคราะห์ Lignin (งานวิเคราะห์อาหารสัตว์, 2553)

lignin ประกอบด้วยธาตุคาร์บอน ไฮโดรเจน และ ออกซิเจน แต่ปริมาณของคาร์บอนจะมีมากกว่าคาร์โบไฮเดรต นอกจากนี้ยังพบว่ามีธาตุไนโตรเจนรวมอยู่ด้วย Lignin เป็นสารที่แม้แต่จุลินทรีย์ก็ไม่สามารถย่อยได้ ดังนั้น ลิกนินเป็นสารที่มีอยู่ในอาหารที่สัตว์ทุกชนิดไม่สามารถย่อยได้ และยังเป็นตัวที่ไปทำให้การย่อยได้ของสารอื่นเยื่อใยอื่นๆ โดยเฉพาะ Cellulose และ Hemicellulose ลดลงด้วย

ปริมาณของลิกนินในพืชตระกูลถั่วจะมีปริมาณสูงกว่าในพืชตระกูลหญ้า แต่การย่อยได้ของวัตถุแห้งในพืชตระกูลถั่ว จะสูงกว่าพวกตระกูลหญ้า เนื่องจากลิกนินจะมีอิทธิพลต่อการย่อยได้ของส่วน NDF ซึ่งเป็นส่วนของเยื่อใยเท่านั้น แต่จะไม่มีผลต่อการย่อยได้ของ NDS แต่อย่างใด ดังนั้น แม้ว่าส่วนของ NDF ในถั่วจะย่อยได้ยากกว่าในหญ้า แต่พืชตระกูลถั่วมีปริมาณ NDS ซึ่งเป็นส่วนที่สัตว์ย่อยได้ง่ายสูง ดังนั้นเมื่อคิดถึงวัตถุแห้งที่สัตว์ย่อยได้ทั้งหมด จึงมีค่าได้สูงกว่าพวกพืชตระกูลหญ้า

วิธีการ

1. นำ crucible ที่มีตัวอย่างที่ผ่านการวิเคราะห์ ADF วางในถาดที่มีน้ำกลั่นอยู่สูงประมาณ 1 ซม.
2. เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 72 % ลงไปในถ้วย crucible ประมาณครึ่งถ้วย ใช้แท่งแก้วคนตัวอย่างให้แตกกระจาย คอยเติมกรด จนกระทั่งปริมาณของกรดในถ้วยไม่แห้ง ทิ้งไว้ 3 ชม.
3. เมื่อครบระยะเวลา กรองกรดออกและล้างด้วยน้ำร้อนจน pH เป็นกลาง
4. อบตัวอย่างที่ผ่านการย่อยในตู้อบอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 5 ชม. นำออกจากตู้อบ และปล่อยให้เย็นในโถอบแห้ง ชั่งน้ำหนัก
5. เผาตัวอย่างที่ผ่านการอบในเครื่องเผาอุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 2 ชม. นำออกจากตู้อบ และปล่อยให้เย็นในโถอบแห้ง ชั่งน้ำหนัก

การคำนวณ

$$\% \text{ ADL} = \frac{\text{น้ำหนักถ้วยพร้อมตัวอย่างหลังเผา} - \text{น้ำหนักถ้วยพร้อมตัวอย่างหลังอบ}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}} \times 100$$

$$\% \text{ Cellulose} = \% \text{ ADF} - \% \text{ ADL}$$

ภาคผนวก จ

การวิเคราะห์น้ำตาสดรีดิวซ์โดยวิธีโซโมจาย – เนลสัน (วีรบุรุษ, ศกุนตริ และสุภาภรณ์, 2551)

สารเคมีและวิธีการเตรียม Low-Alkalinity Reagent

สารละลาย A : เตรียมโดย

1. ชั่ง Rochelle Salt (Na-K Tartrate) 12 กรัม Anhydrous Na_2CO_3 24 กรัม
2. ละลายสารทั้ง 2 ในน้ำกลั่นที่ต้มแล้วประมาณ 250 มิลลิลิตร

สารละลาย B : เตรียมโดย

1. ชั่ง $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \bullet 5\text{H}_2\text{O}$ 2.0 กรัม
2. ละลายลงในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร

สารละลาย C : เตรียมโดย

1. ชั่ง Anhydrous Na_2SO_4 180 กรัม
2. ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร
3. นำไปต้มและทำให้เย็น

วิธีการผสม

1. เติมสารละลาย B ลงในสารละลาย A ค่อยๆ เติม NaHCO_3 16 กรัม
2. เติมสารละลาย C ลงไป เติมน้ำกลั่นที่ต้มแล้วลงไปเพื่อปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1000 มิลลิลิตร
3. นำสารละลายเก็บไว้ในที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 1 สัปดาห์ จึงรินส่วนที่ลอยมาใช้

Arsenomolybdate Reagent of Nelson

สารละลาย D : เตรียมโดย

1. ชั่ง Ammonium Molybdate 25 กรัม
2. ละลายในน้ำกลั่น 450 มิลลิลิตร
3. เติมกรดซัลฟิวริก (96เปอร์เซ็นต์) 21 มิลลิลิตร

สารละลาย E : เตรียมโดย

1. ชั่ง Na_2HAsO_4 3 กรัม
2. ละลายในน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร

วิธีการผสม

1. เติมสารละลาย E ในสารละลาย D
2. เติมน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุดท้าย 1000 มิลลิลิตร
3. บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เก็บในขวดสีชา

สารละลายกลูโคสมาตรฐาน

เตรียมชั่งน้ำตาล 0.0200 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 200 ไมโครกรัม/ลบ.ซม. จากนั้นนำมาเจือจางให้ได้สารละลายกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้นตั้งแต่ 0 – 200 ไมโครกรัม/ลบ.ซม. ดังนี้

ตารางที่ 5 แสดงค่าความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่เตรียมได้

หลอดที่	สารละลายกลูโคส (200 ไมโครกรัม/ลบ.ซม.) (ลบ.ซม.)	น้ำกลั่น (ลบ.ซม.)	สารละลายกลูโคส (ไมโครกรัม/ลบ.ซม.)
1	0.00	1.00	0
2	0.25	0.75	50
3	0.50	0.50	100
4	0.75	0.25	150
5	1.00	0.00	200

วิธีการ

1. ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่มีปริมาณกลูโคสไม่เกิน 200 ไมโครกรัม หรือสารละลายกลูโคสมาตรฐาน (ความเข้มข้น 0 – 200 ไมโครกรัม) ปริมาตร 1.0 ลบ.ซม. ลงในหลอดทดลอง
2. เติม Low-Alkalinity Reagent of Somogyi ลงไป 1.0 ลบ.ซม.
3. นำไปต้มในอ่างน้ำร้อนเป็นเวลา 10 นาที แล้วทำให้เย็น
4. เติม Arsenomolybdate Reagent of Nelson 1.0 ลบ.ซม. เขย่าให้เข้ากัน

5. เติมน้ำกลั่นลงไปปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 25 ลบ.ซม. ตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 15 นาที แต่ไม่ควรเกิน 40 นาที

6. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร

7. นำค่าการดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน เพื่อหาความเข้มข้นของกลูโคสในสารละลายตัวอย่าง หรือคำนวณได้จาก

ความเข้มข้นของกลูโคส (กรัม/ลิตร) = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 500 นาโนเมตร x (อัตราการใช้)

(ความชันของกราฟมาตรฐาน) x (1000)

ภาคผนวก จ

การใช้วิธี Standard Addition ในการหาปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมัก (วีรณัฐ, ศกุนตริ และ สุภาภรณ์, 2551)

อุปกรณ์

1. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความเข้มข้น 600 นาโนเมตร
2. คิวเวต (Cuvette)
3. อ่างควบคุมอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส
4. ขวดปรับปริมาตร 250 มิลลิลิตร
5. ปิเปตขนาด 1 และ 5 มิลลิลิตร
6. หลอดทดลองขนาดกลางที่มีฝาปิด
7. แท่งแก้วคนสาร

สารเคมีและวิธีเตรียม

1. สารละลายโพแทสเซียมไดโครเมตความเข้มข้น 0.1 โมล/ลิตร ในกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น

วิธีเตรียม : ละลายโพแทสเซียมไดโครเมตหนัก 7.35 กรัม ในสารละลายไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 12 นอร์มอล ปริมาตร 10.42 มิลลิลิตร ปรับปริมาตร 250 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

2. เอทานอลบริสุทธิ์

3. สารละลายเอทานอลมาตรฐานค่าความเข้มข้นในช่วง 0.1 – 1.5 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร

วิธีเตรียม : เจือจางเอทานอลบริสุทธิ์ด้วยน้ำกลั่นให้มีค่าความเข้มข้นในช่วง 0 – 1.5 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร โดยเตรียมใส่หลอดฝาเกลียวปิดสนิท

การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล

1. ทำการเจือจางสารละลายตัวอย่างให้มีความเข้มข้นของเอทานอลโดยประมาณให้มีช่วงความเข้มข้น 0.3 – 1.5 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร

2. ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่ทำการเจือจางแล้ว ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมตความเข้มข้น 0.1 โมล / ลิตร ในกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.5 นอร์มอล ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ในหลอดฝาเกลียวปิดสนิท

3. เติมน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร ปิดฝาให้แน่น นำไปต้มเดือด 5 นาที เมื่อครบเวลาทำให้เย็นทันที
4. นำสารละลายจากข้อ 3 ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร บันทึกค่าโดย เปรียบเทียบกับสารละลายเบส

หมายเหตุ ถ้าสารละลายตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์มีค่าความเข้มข้นเกินกว่าช่วงที่กำหนดให้เจือจางสารละลายเอทานอลลงแล้วคูณกลับด้วยค่าคงที่ของการเจือจางเป็นค่าความเข้มข้นที่ถูกต้อง การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลด้วยวิธี Standard Addition นั้นคือการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคการเติมสารชนิดเดียวกันกับสารที่ต้องการวิเคราะห์ไปเป็นสารมาตรฐานโดยต้องทราบปริมาณที่แน่นอนของสารที่เติมลงไป เพื่อนำไปคำนวณย้อนกลับมาเป็นปริมาณความเข้มข้นของสารที่ต้องการตรวจสอบ ในการทำปริมาณวิเคราะห์จึงใช้วิธีการวัดความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์ ทั้งก่อนและหลังเติมสารมาตรฐาน โดยให้คิดว่า ความสัมพันธ์ของความเข้มข้นที่วัดได้กับความเข้มข้นจะต้องเป็นเส้นตรง (Linear Relationship)

จากรูปอธิบายได้ว่าเมื่อทำการเติมสารชนิดเดียวกันกับสารที่ต้องการวิเคราะห์ในปริมาณความเข้มข้นต่างๆกัน จะได้กราฟเส้นตรงที่มีความชันคงรูป และเมื่อทำการลากเส้นตรงลงมาจนกระทั่งบรรจบกับแกน X จะได้ค่าความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์ (คำนวณหาค่า X จากสมการของกราฟ)

การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล มีการเตรียมสารละลายตัวอย่าง อย่างละ 6 หลอดการทดลอง โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. เตรียมสารละลายเอทานอลมาตรฐานความเข้มข้น 6 นอร์มอล ปริมาตร 250 มิลลิลิตร
2. เตรียมสารละลายจากข้อ 1 ลงไปในหลอดทดลองต่างๆ ดังนี้
 - หลอดที่ 1 เติมสารละลายลงไปปริมาณ 60 ไมโครลิตร
 - หลอดที่ 2 เติมสารละลายลงไปปริมาณ 120 ไมโครลิตร
 - หลอดที่ 3 เติมสารละลายลงไปปริมาณ 180 ไมโครลิตร
 - หลอดที่ 4 เติมสารละลายลงไปปริมาณ 240 ไมโครลิตร
 - หลอดที่ 5 เติมสารละลายลงไปปริมาณ 300 ไมโครลิตร
3. หลังจากนั้นทำการเติมน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตรของหลอดทดลองแต่ละหลอดให้มีปริมาตรรวมที่เท่ากันและเติมสารย้อมสี
4. เขย่าให้เข้ากันจากนั้นต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 30 นาที

5. ทิ้งไว้ให้เย็น
6. นำผลๆ ไปวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์
7. นำผลการทดลองที่ได้มาพล็อตกราฟโดยให้แกน Y เป็นค่าการดูดกลืนแสง และแกน X เป็นความเข้มข้นของเอทานอลที่เติมลงไป จะได้กราฟเส้นตรงที่ตัดแกน Y จากนั้นลากเส้นกราฟมาตัดแกน X ด้านซ้ายมือของจุดออริจิน สเกลของแกน X ตรงตำแหน่งที่ตัดแกนคือค่าความเข้มข้นของเอทานอลในตัวอย่าง

ภาคผนวก ข

อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีการเตรียม (กาญจนา, ธีรรัตน์ และ ศิริวรรณ, 2547)

1. พีดีเอ (potato dextrose agar : PDA)

วิธีเตรียม : ละลายพีดีเอหนัก 39 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร นำไปกวนบนเครื่องกวนสารให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกันแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ในหม้อนึ่งความดันไอน้ำเป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารเหลวสำหรับผลิตน้ำตาลรีดิวซ์

ส่วนประกอบ

MgSO ₄	1.00 กรัม
CaHPO ₄	0.05 กรัม
(NH ₄) ₂ SO ₄	4.00 กรัม
Corn steep liquor	7.00 มิลลิลิตร
Tween 80	20.00 มิลลิลิตร
Fe SO ₄	5.00 มิลลิกรัม
Zn SO ₄	1.40 มิลลิกรัม
Mn SO ₄	1.60 มิลลิกรัม
CoCl ₂	3.60 มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	1.00 ลิตร

ภาคผนวก ข

การนับจำนวนของเซลล์ (กิตติมา, พิศาล และสุภวินค์, 2546)

วิธีการนับจำนวนเซลล์ทั้งหมดที่อยู่ใน liquid culture / broth นิยมใช้วิธีนับโดยตรงจากกล้องส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ (direct microscopic counting) สำหรับการนับเซลล์ของจุลินทรีย์ต่างชนิดกันจะใช้อุปกรณ์ในการช่วยนับ (counting chamber) ที่ต่างกัน คือ

ถ้าเป็นเซลล์ของยีสต์หรือสปอร์ของเชื้อราจะใช้อุปกรณ์ในการนับคือ Hemocytometer หรือ heamacytometer ที่ใช้สำหรับนับจำนวนของเม็ดเลือด โดยใช้กำลังขยายจากกล้องจุลทรรศน์จาก 100 ถึง 400 เท่า เพื่อสามารถมองเห็น Counting Chamber และเซลล์

ถ้าเป็นเซลล์ของแบคทีเรียจะใช้อุปกรณ์ในการช่วยนับคือ Petroff – Hauser Chamber และใช้กำลังขยาย 1000 เท่า และควรใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิด Phase Contrast

การเลือกที่จะนับเซลล์ในบริเวณใดของ Chamber นั้นขึ้นกับจำนวนของเซลล์ โดยอาจนับจำนวนเซลล์ทั้งหมดที่มองเห็นอยู่ในช่องสี่เหลี่ยมจัตุรัสใหญ่ (Middle Square) หรือนับในช่องขนาดกลาง 5 ช่อง โดยให้กระจายตำแหน่งของช่องขนาดกลางที่จะทำการนับ โดยให้นับเซลล์ที่แต่ละช่องบริเวณขอบได้แต่ไม่นับเซลล์ที่ไปอยู่ระหว่างช่องจัตุรัสขนาดกลางช่องอื่น ในการนับจำนวนเซลล์ให้มีความถูกต้องแม่นยำ ควรทำการเจือจางตัวอย่างของเชื้อจุลินทรีย์ในแต่ละช่องจัตุรัสเล็กของจุลินทรีย์ในแต่ละช่องจัตุรัสเล็กในระหว่าง 10 – 1 เซลล์

วิธีการตรวจนับ

1. ล้าง Counting Chamber ให้สะอาดและเช็ดให้แห้งสนิท
2. ปิดทับบริเวณสี่เหลี่ยมซึ่งมีช่องแบ่งด้วยกระจกปิดสไลด์จำเพาะของ Chamber นั้นๆ
3. ทำการผสมเซลล์ในน้ำเพาะเลี้ยงให้เข้ากันดี โดยใช้เครื่องผสม
4. ใช้ Pasteur Pipette ดูด Cell Suspension แล้วนำมาหยดลงบนผิวหน้าด้านขั้วมันของ Chamber ตรงบริเวณขอบกระจกปิดสไลด์จะเกิด Capillary action ทำให้หยดของเซลล์

ชิมเข้าสู่ Chamber ได้ ตั้งทิ้งไว้ 2-32 นาที เพื่อให้เซลล์กระจายอย่างสม่ำเสมอและ
ตกตะกอนเรียบร้อย

หมายเหตุ ปริมาณของหยดเซลล์มีความสำคัญต้องให้มีปริมาตรพอดี คือ ไม่มีส่วนที่เหลืออกซึม
ออกมา

นำ Chamber มาหาตำแหน่งตารางที่ใช้ นับ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์และใช้เลนส์ขยายวัตถุ
กำลังขยาย 40 เท่า และ Occular x10 จากนั้นจึงปรับความเข้มของแสงและหาโฟกัสจนมองเห็นทั้ง
เส้นแบ่งช่องและตัวเซลล์

5. นับจำนวนจุลินทรีย์ในแต่ละช่องสี่เหลี่ยมจัตุรัสเล็กๆ และควรนับไม่น้อยกว่า 5 ช่อง อาจ
นับถึง 10 ช่อง เป็นอย่างน้อย การนับเซลล์มีเกณฑ์การนับ โดยให้นับเซลล์ใน 5 ช่อง จาก 25 ช่องเล็ก
ของสี่เหลี่ยมจัตุรัสใหญ่ที่อยู่ตรงกลาง

การคำนวณปริมาณจุลินทรีย์

1. สำหรับ Petroff – Hauser Chamber

สมมติว่านับเซลล์ใน 5 ช่อง	= X	Cell
ปริมาตร 5 ช่องที่ใช้ นับ	= $5/1 \times 5/1 \times 1/50 \times 5$	mm^3
	= $1/250$	mm^3
จำนวนเซลล์ในปริมาตร 250/1 ml	= $25X \times 10^4 \times \text{Dilution factor/ml}$	

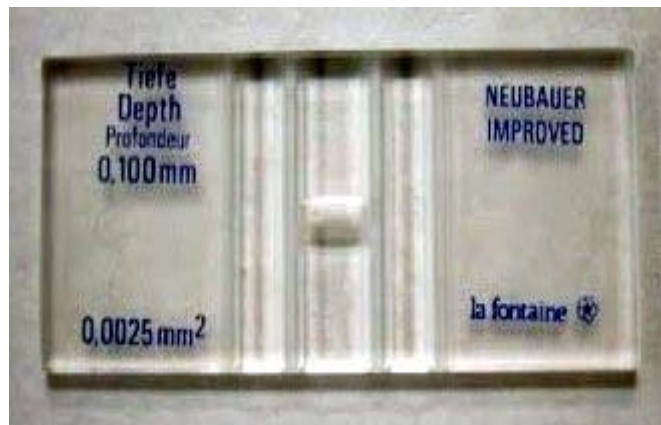
2. สำหรับ Haemocytometer

ปริมาตร 5 ช่องที่ใช้ นับ	= $1/5 \times 1/5 \times 1/10 \times 5$	mm^3
	= $1/50$	mm^3
จำนวนเซลล์ทั้งหมดที่ตั้งต้น	= X	cell
หรือในปริมาตร 1 ml	= 5×10^4	cell
จำนวนเซลล์ทั้งหมดที่ตั้งต้น	= $5X \times 10^4 \times \text{Dilution factor cell/ml}$	

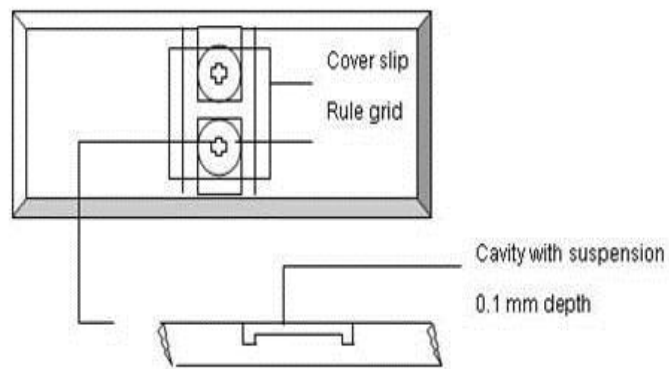
3. ให้รวมจำนวนนับของเซลล์ที่นับได้จากแต่ละช่องเล็ก หาคด้วยจำนวนช่องสี่เหลี่ยมเล็ก
ที่ทำกรนับ จะได้ค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ต่อหนึ่งช่องสี่เหลี่ยมเล็ก เช่น ได้ X เซลล์ต่อช่อง การ
คำนวณเซลล์ ต่อตัวอย่าง 1 ml ทำได้ดังนี้

ตัวอย่าง 0.00025 mm^3 มีเซลล์อยู่ = X cell

$$\begin{aligned}
 1 \text{ mm}^3 &= \frac{X \times 10^3}{0.00025} \\
 &= 4X \times 10^6 \quad \text{cell}
 \end{aligned}$$

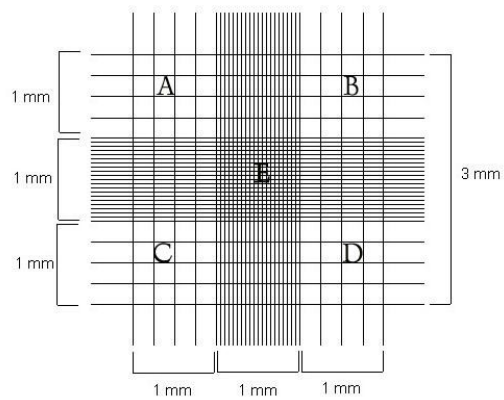


รูปที่ 7 ภาพแสดงลักษณะและขนาด (เท่าจริง) ของ Haemacytometer
ที่มา: วิรุจน์ (2553)



รูปที่ 8 แผนภาพแสดงลักษณะและตำแหน่ง สำหรับการตรวจนับจำนวนตัวอย่าง เช่น สปอร์ของเชื้อรา ด้วย Haemacytometer

ที่มา: วิรุจน์ (2553)



รูปที่ แผนภาพแสดงบริเวณที่ใช้นับจำนวน A, B, C D และ E (Counting areas) ตัวอย่างที่ต้องการ
คำนวณหาความเข้มข้น (เกวลิน, 2553)