# ภาคผนวก ก

## การวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพ

# การวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพ

## 1. การวัดค่าสีระบบ CIE

เปิดเครื่องวัดสีและ ทำการสอบเทียบ (calibration) ค่าสีด้วยแผ่นสีมาตรฐานและนำตัวอย่างใส่ลงในภาชนะให้มีความสูง 1 เซนติเมตร เกลี่ยผิวหน้าให้เรียบแล้วใช้หัววัดสีทาบลงบนตัวอย่างในแนวตั้งฉากและอ่านค่า แสดงผลการวัดในระบบCIRLAB( $L^*$,$a^*$ ,$b^*$)

## 2. ค่าปริมาณผลผลิตที่ได้ (ธนิกานต์, 2549)

นำผลผลิตที่ได้และวัตถุดิบที่ใช้มาชั่งน้ำหนักและคำนวณตามสูตร

$$\text{ปริมาณผลผลิตที่ได้} = \frac{Wp}{Wr} x100 \ \%$$

โดยให้ Wp = น้ำหนักของผลผลิตที่ได้

Wr = น้ำหนักของวัตถุดิบที่ใช้

## 3. ความสามารถในการคืนรูป (Doymaz, 2006)

นำเซลลูโลสแห้งละลายในน้ำที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้ตัวอย่าง 5 กรัม ($W_1$) ละลายในน้ำ 200 มิลลิลิตร คนเป็นเวลา 3 นาที ทิ้งไว้ 24 ช.ม. กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 แล้วชั่งน้ำหนักตะกอน ($W_2$) และคำนวณหาความสามารถในการคืนรูปตามสูตร

$$\text{ความสามารถในการคืนรูป} = \frac{W_2 - W_1}{W_1}$$

โดยให้ $W_1$ = น้ำหนักของตัวอย่างที่ใช้

$W_2$ = น้ำหนักตะกอน

## 4. ความสามารถในการละลาย (Chung, 2006)

นำเซลลูโลสแห้ง 5 กรัม ($W_1$) ละลายในน้ำกลั่น 250 มิลลิกรัมกวนของผสมทั้งหมดด้วย magnetic stirrer ที่ความเร็วระดับ 5 นาน 30นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงแยกที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที รินของเหลวออกไปอบแห้งที่105 °C นาน 24 ชั่วโมง แล้วชั่งน้ำหนักตะกอน ($W_2$) และคำนวณหาความสามารถในการละลายตามสูตร

ความสามารถในการละลาย $= \frac{W_2}{W_1} x100$ %

โดยให้ $W_1$ = น้ำหนักของตัวอย่างที่ใช้

$W_2$ = น้ำหนักของตะกอนแห้ง

### 5. ความสามารถในการกระจายตัว (อรทัย, 2547)

ชั่งเซลลูโลสแห้ง 2 กรัมและเติมน้ำกลั่นจำนวน 100 มิลลิลิตร กวนด้วย magnetic stirrer ที่ความเร็วระดับ 5 นาน 15 วินาที ดึงตัวอย่างออกด้วยกระบอกฉีดยาขนาด 50 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงแยกที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที วัดค่า ความสามารถในการกระจายตัวโดยใช้เครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 690 นาโนเมตร ใช้น้ำกลั่นเป็น blank

### 6. การดูดความชื้นกลับ (อรทัย, 2547)

การเตรียมโถดูดความชื้นโดยการแยกเอาสารดูดความชื้นในโถออกให้หมดและจัดระบบให้มีความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศเท่ากับ78% (โดยเตรียมได้จากการใช้สารละลายอิ่มตัวของโพแทนเซียมคลอไรด์ใส่ลงไปในโถดูดความชื้น) ชั่งตัวอย่าง 10 กรัม จากนั้นใส่ตัวอย่างลงในโถดูดความชื้น และวัดน้ำหนักของตัวอย่าง 10 กรัมที่ชั่งเริ่มต้น เพื่อหาค่า moisture absorption โดยจดน้ำหนักทุก 24 ชั่วโมงเป็นเวลา 7 วัน

### 7. ความสามารถในการอุ้มน้ำ (Fabrizio *et al.*, 2005)

ชั่งเซลลูโลสแห้ง 5 กรัมและเติมน้ำกลั่นจำนวน 25 มิลลิลิตร กวนด้วย magnetic stirrer ที่ความเร็วระดับ 3 นาน 30 นาทีนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงแยกที่ความเร็ว 2500 รอบต่อนาที นาน 10 นาที รินน้ำออกมาชั่งน้ำหนัก ($W_1$) และ นำตะกอนที่เหลือไปชั่งน้ำหนัก ($W_2$) คำนวณหาความสามารถในการอุ้มน้ำตามสูตร

ความสามารถในการอุ้มน้ำ $= \frac{W_2}{W_1}$

โดยให้ $W_1$ = น้ำหนักของน้ำ

$W_2$ = น้ำหนักของตะกอน

## 8. การถ่ายภาพ SEM และการเตรียมตัวอย่าง

กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (SEM) เป็นกล้องจุลทรรศน์ที่สามารถให้กำลังขยาย และแจกแจงรายละเอียด ได้มากกว่ากล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา เนื่องจากความยาวคลื่นของอิเล็กตรอนนั้นสั้นกว่าความยาวคลื่นแสง ทำให้มีประสิทธิภาพในการแจกแจงรายละเอียดสูงกว่า โดยแหล่งกำเนิดแสงอิเล็กตรอน คือ ปืนยิงอิเล็กตรอน (electron fun) ซึ่งเป็นขดลวดทังสเตน มีลักษณะเป็นรูปตัววี เมื่อขดลวดทังสเตนร้อนขึ้นโดยการเพิ่มกระแสไฟฟ้าเข้าไปให้ขดลวดทำให้อิเล็กตรอนถูกปล่อยออกมาจากขดลวดและเนื่องจากอิเล็กตรอนมีขนาดเล็กมาก เพื่อป้องกันการรบกวนของลำแสงอิเล็กตรอน จึงต้องมีการดูดอากาศออกจากตัวกล้องให้เป็นสุญญากาศ เพื่อป้องกันการชนกันของมวลอากาศกับลำแสงอิเล็กตรอน ซึ่งทำให้เกิดการหักเหได้ เลนส์เป็นเลนส์ระบบแม่เหล็กไฟฟ้าประกอบด้วยขดลวดพันรอบแท่งเหล็ก เมื่อกระแสไฟฟ้าผ่านเข้าไปทำให้เกิดสนามแม่เหล็กขึ้น สนามแม่เหล็กไฟฟ้าทำให้ลำแสงอิเล็กตรอนเข้มข้นขึ้น เพื่อไปตกที่ตัวอย่างวัตถุที่จะศึกษาโดยที่ผิวตัวอย่างที่อิเล็กตรอนตกใส่ จะเกิดสัญญาณอิเล็กตรอนขึ้นหลายรูปแบบซึ่งคล้ายกับการที่แสงตกกระทบวัตถุและสะท้อนออกจากผิววัตถุ ถ้าผิวตัวอย่างเรียบก็จะให้สัญญาสะท้อนอิเล็กตรอนได้ดี แต่ถ้าผิวตัวอย่างเป็นหลุมลึกก็จะไม่ให้สัญญาณหรือให้ได้น้อย ซึ่งdetector สามารถรับสัญญาณ สัญญาณที่ได้จะนำมาขยายให้มีความแรงที่เหมาะสมแล้วนำมาสร้างเป็นภาพ ส่วนใหญ่ใช้ศึกษารายละเอียดของพื้นผิวของตัวอย่าง เช่น ลักษณะพื้นผิวด้านนอกของเนื้อเยื่อและเซลล์ หน้าตัดของโลหะและวัสดุ เป็นต้น การสร้างภาพทำโดยการตรวจวัดอิเล็กตรอนที่สะท้อนจากผิวหน้าของตัวอย่าง ซึ่งภาพที่ได้จากกล้องจุลทรรศน์ชนิดนี้จะเป็นภาพสามมิติ (พรรณทิพย์, 2550)

ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างแห้งสำหรับถ่ายภาพด้วยกล้อง SEM ในงานวิจัยในครั้งนี้โดยสถานบริการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. การตัดชิ้นตัวอย่าง (cutting) ตัดตัวอย่างแห้งให้พอดีกับฐานทองเหลือง
2. ติดตัวอย่างด้วยกระดาษกาวลงบนฐานทองเหลืองเพื่อป้องกันการเคลื่อนที่ขณะถ่ายภาพในสภาวะสุญญากาศ
3. การฉาบทอง (coating) เคลือบตัวอย่างด้วยแผ่นทองคำโดยเครื่อง Sputter Coater (SPI-MODULE, U.S.A.) ใช้กระแสไฟฟ้า 18 mA เป็นเวลา 40 วินาที เพื่อให้ตัวอย่างสามารถนำไฟฟ้าและสะท้อนอิเล็กตรอนได้
4. นำตัวอย่างไปศึกษาด้วยกล้อง SEM โดยเลือกใช้โปรแกรม High Vacuum ที่กำลังขยาย 500 เท่าและแรงดันไฟฟ้า 15 กิโลโวลต์

ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเปียกสำหรับถ่ายภาพด้วยกล้อง SEM ในงานวิจัยในครั้งนี้โดยสถานบริการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. การตัดชิ้นตัวอย่าง (cutting) ตัดตัวอย่างเปียกให้พอดีกับฐานทองเหลือง
2. ติดตัวอย่างด้วยกระดาษกาวลงบนฐานทองเหลืองเพื่อป้องกันการเคลื่อนที่ขณะถ่ายภาพในสภาวะสุญญากาศ
3. การแช่แข็ง (freezing) โดยใช้ไนโตรเจนเหลวทำให้ตัวอย่างแข็งตัวเพื่อคงสภาพของตัวอย่าง
4. นำตัวอย่างไปศึกษาด้วยกล้อง SEM โดยเลือกใช้โปรแกรม Low Vacuum ที่กำลังขยาย 500 เท่าและแรงดันไฟฟ้า 15 กิโลโวลต์

ภาพที่ได้มีลักษณะเป็นภาพ 3 มิติและเป็นภาพขาวดำเพราะกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด SEM เป็นกล้องที่ใช้ศึกษาโครงสร้างหรือองค์ประกอบพื้นผิวของเซลล์เนื้อเยื่อ และวัตถุได้โดยทำให้องค์ประกอบต่างๆ ของเซลล์หรือวัตถุให้มีความเข้มของเงาแตกต่างกัน

# ภาคผนวก ข

# การวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมี

# การวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมี

## 1. การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น (AOAC, 2000)

**เครื่องมือและอุปกรณ์**

1. จานอลูมิเนียมมีฝาปิด (moisture can)
2. โถดูดความชื้น (desiccator)
3. เครื่องชั่งไฟฟ้าสำหรับงานวิเคราะห์ ชั่งน้ำหนักได้ละเอียด 0.1 มิลลิกรัม
4. ตู้อบลมร้อนแบบไฟฟ้า

**วิธีวิเคราะห์**

1. อบ moisture can พร้อมฝาปิดในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 100±2 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ทำให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนัก ($W_1$)
2. ชั่งตัวอย่างให้ทราบน้ำหนักแน่นอน 5 กรัม ใส่ใน moisture can ที่ผ่านการอบและทราบน้ำหนักแน่นอน ($W_2$)
3. นำ moisture can ที่ใส่ตัวอย่างแล้วไปอบในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 100±2 องศาเซลเซียส โดยเปิดฝาออก อบเป็นเวลานาน 3 ชั่วโมง
4. นำออกจากตู้อบโดยปิดฝาทันทีและทำให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนักไว้
5. นำไปอบซ้ำหลาย ๆ ครั้งจนได้น้ำหนักคงที่ ($W_3$)
6. คำนวณปริมาณความชื้น จากสูตร

$$\text{ปริมาณความชื้นร้อยละโดยน้ำหนัก} = \frac{W_2 - W_3}{W_2 - W_1} x100$$

โดยให้ $W_1$ = น้ำหนักของ moisture can (กรัม)

$W_2$ = น้ำหนักของ moisture can และตัวอย่างก่อนอบ (กรัม)

$W_3$ = น้ำหนักของ moisture can และตัวอย่างหลังอบ (กรัม)

## 2. การวิเคราะห์ค่าวอเตอร์แอคติวิตี ($a_w$)

### เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ตลับพลาสติก ($a_w$ box)
2. เครื่องวิเคราะห์ค่าวอเตอร์แอคติวิตี

### วิธีวิเคราะห์

1. เปิดเครื่องวิเคราะห์ค่าวอเตอร์แอคติวิตีทิ้งไว้ 30 นาที ก่อนการใช้งาน
2. ใส่ตัวอย่างไม่เกินครึ่งหนึ่งของตลับพลาสติกและต้องครอบคลุมพื้นที่ของก้นตลับพลาสติก
3. ทำความสะอาดขอบริมและด้านนอกของตลับพลาสติกให้สะอาด
4. นำตลับพลาสติกบรรจุตัวอย่างไปวางไว้ใกล้ ๆ กับเครื่องวิเคราะห์ค่าวอเตอร์แอคติวีตี เพื่อให้ตัวอย่างมีอุณหภูมิใกล้เคียงกับอุณหภูมิของช่องวัดตัวอย่าง (chamber)
5. ใส่ตลับพลาสติกลงในลิ้นชักใส่ตัวอย่าง ปิดลิ้นชัก
6. หมุนปุ่มของลิ้นชักจากตำแหน่ง OPEN/LOAD ไปยังตำแหน่ง READ
7. เมื่อเครื่องเริ่มทำการวัดค่าวอเตอร์แอคติวิตีจะมีสัญญาณเตือนหนึ่งครั้ง เมื่อเครื่องทำการวัดค่าวอเตอร์แอคติวิตีเสร็จเรียบร้อยจะมีสัญญาณเตือน หน้าจอ LCD จะแสดงค่าวอเตอร์แอคติวีตีที่อ่านได้พร้อมอุณหภูมิของตัวอย่าง

## 3. การวิเคราะห์ค่าความเป็นกรดด่าง

### เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องมือวัดค่าความเป็นกรดด่าง

### วิธีวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่าง กรณีตัวอย่างสดให้ชั่งตัวอย่าง 5 กรัม ผสมกับน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร กรณีตัวอย่างแห้งให้ชั่งตัวอย่าง 2 กรัม ผสมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร
2. คนให้ผสมเข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง
3. นำไปวัดค่าความเป็นกรดด่างโดยเครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง ซึ่งมีการสอบเทียบกับสารละลายบัฟเฟอร์มาตรฐานแล้ว วัดโดยใช้ glass electrode จุ่มลงในสารตัวอย่าง แช่ไว้ประมาณ 5 วินาที อ่านค่าที่ได้และบันทึกผล

### 4. การวิเคราะห์ปริมาณไขมันโดยวิธีซอล์กเลต (AOAC, 2000)

**เครื่องมือและอุปกรณ์**

1. บีกเกอร์
2. ขวดก้นกลม ขนาด 250 มิลลิลิตร
3. ทิมเบอร์กระดาษ (cellulose thimble)
4. กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1
5. โถดูดความชื้น (desiccator) ที่มีสารดูดความชื้น
6. เครื่องชั่งไฟฟ้าสำหรับงานวิเคราะห์
7. ตู้อบลมร้อนแบบไฟฟ้า
8. ชุดสกัดซอล์กเลต

**สารเคมี**

1. ปิโตรเลียมอีเทอร์

**วิธีวิเคราะห์**

1. อบขวดก้นกลมด้วยตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 100 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ทำให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนัก ($W_1$)
2. ชั่งตัวอย่างที่ผ่านการอบไล่ความชื้นแล้วโดยใช้เครื่องชั่งไฟฟ้าสำหรับงานวิเคราะห์ ปริมาณ 2 กรัม (W) ใส่ในบีกเกอร์ เทผ่านกรวยกรองลงไปทิมเบอร์ที่มีกระดาษกรองรองรับภายใน แล้ววางทิมเบอร์ลงในชุดสกัดซอล์กเลต
3. สกัดโดยใช้ปิโตรเลียมอีเทอร์ตามเวลาที่กำหนด (ขึ้นกับปริมาณไขมันในตัวอย่าง)
4. เมื่อทำการสกัดครบเวลาที่กำหนดแล้วให้ระเหยปิโตรเลียมอีเทอร์ออกจากตัวอย่าง
5. นำขวดก้นกลมที่มีไขมันเหลืออยู่ไปอบด้วยตู้อบไฟฟ้าอุณหภูมิ100–105 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ทำให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนัก
6. อบต่ออีกครั้งประมาณ 30 นาที จนได้น้ำหนักคงที่ ชั่งน้ำหนัก ($W_2$)
7. คำนวณปริมาณไขมัน จากสูตร

$$\text{ปริมาณไขมัน ร้อยละโดยน้ำหนัก} = \frac{W_2 - W_1}{W} x100$$

โดยให้ $W_1$ = น้ำหนักขวดก้นกลม (กรัม)

$W_2$ = น้ำหนักขวดก้นกลมและไขมัน (กรัม)

W = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

## 5. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธีเคลดาห์ล (AOAC, 2000)

### เครื่องมือและอุปกรณ์

1. หลอดเคลดาห์ล
2. บีกเกอร์
3. ขวดรูปชมพู ขนาด 250 มิลลิลิตร
4. กระบอกตวง ขนาด 100 มิลลิลิตร
5. ชุดกลั่นโปรตีน
6. ชุดย่อยโปรตีน
7. เครื่องชั่งไฟฟ้าสำหรับงานวิเคราะห์
8. ตู้ดูดควัน

### สารเคมี

1. กรดซัลฟูริคเข้มข้น ($H_2 SO_4$) ร้อยละ 98 (w/v)
2. ตัวเร่งปฏิกิริยาผสม ประกอบด้วย โซเดียมซัลเฟต ($Na_2 SO_4$) ปราศจากไนโตรเจน ร้อยละ 96 และคอปเปอร์ซัลเฟต ($Cu_2SO_45H_2O$) ปราศจากไนโตรเจน ร้อยละ 4
3. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้นร้อยละ 40 (w/v)
4. สารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริค ($H_2 SO_4$) ความเข้มข้น 1 นอร์มอล มีอายุการเก็บรักษา 1 เดือน หากครบกำหนดเวลาดังกล่าวแล้วยังมีสารละลายมาตรฐานนี้เหลือมากพอสำหรับการใช้งาน ให้นำสารละลายไปหาความเข้มข้นที่แน่นอนใหม่ (re-standardize) หรือนำไปใช้งานอื่นที่ไม่ต้องการความเข้มข้นที่แน่นอน
5. อินดิเคเตอร์ผสม ประกอบด้วยสารละลายเมทิลเรด (methyl red) ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 (w/v) ในแอลกอฮอล์ผสมกับสารละลายโบรโมครีซอลกรีน (bromocresol green) ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 (w/v) ในแอลกอฮอล์ อัตราส่วน 1 : 5
6. สารละลายกรดบอริค ความเข้มข้นร้อยละ 4 (w/v)

### วิธีวิเคราะห์

1. ชั่งน้ำหนักที่แน่นอนโดยใช้บีกเกอร์ ใส่ตัวอย่าง 0.5 – 2.0 กรัม และชั่งน้ำหนัก ($W_1$) ถ่ายตัวอย่างลงในหลอดเคลดาห์ล แล้วชั่งน้ำหนักบีกเกอร์ที่ถ่ายตัวอย่างออกแล้ว ($W_2$) ทำ blank ควบคู่ไปด้วย
2. เติมตัวเร่งปฏิกิริยาผสมจำนวน 8 กรัม

3. เติมสารละลายกรดซัลฟูริคเข้มข้น 25 มิลลิลิตรโดยเอียงขวดและค่อย ๆ รินกรดลงข้างๆ หลอดเพื่อล้างตัวอย่างที่อาจติดอยู่ข้างหลอดให้หมด และค่อย ๆ เขย่าตัวอย่างเบา ๆ
4. นำไปย่อยด้วยความร้อนโดยใช้ชุดย่อยโปรตีน ทำการย่อยตัวอย่างจนได้สารละลายใส จึงปิดชุดย่อย รอจนสารละลายเย็นและไม่มีไอระเหยของกรด
5. นำสารละลายที่ได้ไปต่อกับเครื่องกลั่นโปรตีน นำฟลาสก์ที่มีสารละลายกรดบอริค จำนวน 50 มิลลิลิตร และหยดอินดิเคเตอร์ลงไป 3 – 5 หยด แล้วรองรับที่ปลายส่วนควบแผ่น (condenser) อยู่ต่ำกว่าสารละลาย
6. เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 40 ให้มีปริมาณมากเกินพอ ข้อสังเกตคือ ถ้าปริมาณด่างมากเกินพอ สารละลายจะมีสีดำถ้ายังไม่เกิดสีดำให้เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เพิ่มอีก 5 – 10 มิลลิลิตร
7. เปิดเครื่องเริ่มทำการกลั่น โดยให้ทำ blank ก่อน แล้วจึงทำการกลั่นตัวอย่าง
8. นำสารละลายที่กลั่นได้ไปไตเตรทกับสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริคจนได้จุดยุติ คือสังเกตสีชมพูปรากฏขึ้นและสารละลายมีสีเทาอมม่วง
9. บันทึกปริมาตรสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริคที่ใช้ในการไตเตรท นำไปคำนวณหาปริมาณโปรตีนทั้งหมด
10. คำนวณปริมาณโปรตีน จากสูตร

$$\text{ปริมาณไนโตรเจนร้อยละโดยน้ำหนัก} = \frac{(Va - Vb) \times N \times 1.4007}{(W_1 - W_2)}$$

โดยให้

Va = ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริค ที่ใช้ในการไตเตรทตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

Vb = ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริค ที่ใช้ในการไตเตรท blank (มิลลิลิตร)

N = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริค (นอร์มอล)

$W_1$ = น้ำหนักบีกเกอร์และตัวอย่าง (กรัม)

$W_2$ = น้ำหนักบีกเกอร์ที่ถ่ายตัวอย่างออกเรียบร้อยแล้ว (กรัม)

ปริมาณโปรตีน (ร้อยละของน้ำหนัก) = ปริมาณไนโตรเจนร้อยละของน้ำหนัก x แฟเตอร์ โดยค่าแฟกเตอร์ของตัวอย่าง คือ 6.25

### 6. การวิเคราะห์ปริมาณเส้นใยอาหารที่ไม่ละลายน้ำ (AOAC, 2000 : Method no. 991.42)

**เครื่องมือและอุปกรณ์**

1. fritted crucible porosity no. 2 ( ก่อนใช้ให้นำไปเผาที่อุณหภูมิ 525 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง นำมาล้างด้วยน้ำ ทิ้งให้แห้ง บรรจุซีไลท์ 0.5 กรัม ลงใน fritted crucible และกระจายซีไลท์ให้ทั่วโดยการเขย่าเบา ๆ แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ ทำให้เย็น และเก็บในโถดูดความชื้นจนกระทั่งนำไปใช้)
2. โถดูดความชื้น (desiccator) ที่มีสารดูดความชื้นอยู่ภายใน
3. เตาเผา
4. ตู้อบลมร้อน
5. hot plate stirrer
6. บีกเกอร์
7. เทอร์โมมิเตอร์
8. เครื่องชั่งไฟฟ้าสำหรับงานวิเคราะห์
9. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง

**สารเคมี**

1. สารละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95
2. สารละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 78
3. อะซีโตน
4. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.08 โมลาร์ pH 6.0 (เตรียมโดยละลาย 1,4000 กรัมของโซเดียมฟอสเฟตไดเบสิคแอนไฮดรัส และ 10.94 กรัมของโซเดียมฟอสเฟตโมโนเบสิคไดไฮเดรต ในน้ำกลั่น 700 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาณให้ได้ 1 ลิตร ตรวจวัดพีเอชด้วยค่าวัดค่าความเป็นด่าง)
5. เอนไซม์อัลฟาอะมัยเลส
6. เอนไซม์โปรตีเอส
7. เอนไซม์อะมัยโลกลูโคซิเดส
8. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.275 โมลาร์
9. สารละลายไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.325 โมลาร์
10. ซีไลท์ (acid washed)

**วิธีเตรียมตัวอย่าง**

1. ในกรณีที่ตัวอย่างแห้งสามารถนำไปวิเคราะห์ได้ทันทีส่วนในกรณีที่ตัวอย่างเปียกให้อบตัวอย่างให้แห้งก่อนนำไปวิเคราะห์
2. นำตัวอย่างไปบดให้มีความขนาด 0.3 – 0.5 มิลลิเมตร
3. เก็บตัวอย่างที่แห้งและบดแล้วในโถดูดความชื้นจนกระทั่งนำไปใช้

**วิธีวิเคราะห์**

1. ชั่งตัวอย่าง 1 กรัม ใส่ในบีกเกอร์จำนวน 2 บีกเกอร์ น้ำหนักของตัวอย่างทั้ง 2 บีกเกอร์ควรต่างกันไม่เกิน 20 มิลลิกรัม (ในการวิเคราะห์ให้ทำ Blank ควบคู่กับการวิเคราะห์ตัวอย่างด้วย)
2. เติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 50 มิลลิลิตร ลงในแต่ละบีกเกอร์ (วัดและปรับพีเอชให้ได้ 6.0 ± 0.2 )
3. เติมเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสจำนวน 1 มิลลิลิตร ลงในแต่ละบีกเกอร์ ปิดบีกเกอร์ด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ แล้วนำไปแช่ในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที โดยเขย่าบีกเกอร์เบา ๆ ทุก 5 นาที จากนั้นทำให้สารละลายเย็นจนถึงอุณหภูมิห้อง แล้ววัดและปรับพีเอชให้ได้ 7.5 ± 0.2 โดยการเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ด้วยความเข้มข้นร้อยละ 0.275 โมลาร์ จำนวน 10 มิลลิลิตร
4. เติมเอนไซม์โปรตีเอสจำนวน 5 มิลลิลิตร ลงในแต่ละบีกเกอร์ ปิดบีกเกอร์ด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ แล้วนำไปแช่ในน้ำอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที โดยกวนตลอด ทำสารละลายให้เห็น วัดและปรับพีเอชให้ได้ 4.0 – 6.0 โดยการเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริคความเข้มข้นร้อยละ 0.325 โมลาร์ จำนวน 10 มิลลิลิตร
5. เติมเอนไซม์อะมัยโลกลูโคซิเดสจำนวน 0.3 มิลลิลิตร ลงในแต่ละบีกเกอร์ ปิดบีกเกอร์ด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ แล้วนำไปแช่ในน้ำอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที โดยกวนตลอด
6. ทำ fritted crucible ที่เตรียมไว้ให้เปียก และกระจายซีไลท์ด้วยน้ำกลั่นเล็กน้อยแล้วจึงนำสารละลายในบีกเกอร์มากรอง จากนั้นล้าง residue ด้วยน้ำกลั่นจำนวน 2 รอบ ๆ ละ 10 มิลลิลิตร ล้างด้วยสารละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 จำนวน 2 รอบ ๆ ละ 10 มิลลิลิตร (เก็บของเหลวที่กรองได้ทั้งหมดไว้เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณเส้นใยอาหารที่ละลายน้ำได้ต่อไป)

7. นำ fritted crucible ที่มี residue ไปอบด้วยตู้อบลมร้อนอุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง จากนั้นทำให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วนำไปชั่งน้ำหนักเพื่อหาน้ำหนักของ residue
8. ขูด residue จาก fitted crucible อันแรกเพื่อนำไปหาปริมาณโปรตีน
9. ขูด residue จาก fitted crucuble อันที่สองเพื่อนำไปหาปริมาณเถ้า (โดยนำไปเผาในเตาเผาที่อุณหภูมิ 525 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง)
10. คำนวณปริมาณเส้นใยอาหารที่ไม่ละลายน้ำจากสูตร

$$\text{เส้นใยอาหารที่ไม่ละลายน้ำ (ร้อยละ)} = \frac{(residue - P - A - B)}{sample} x100$$

โดยให้

น้ำหนัก residue = ค่าเฉลี่ยของน้ำหนัก residue ที่ใช้ (มิลลิกรัม)

P = น้ำหนักโปรตีนของ residue จาก fitted crucible อันแรก (มิลลิกรัม)

A = น้ำหนักเถ้าของ residue จาก fitted crucible อันที่สอง (มิลลิลิตร)

B = blank (มิลลิกรัม) คำนวณจาก

Sample = น้ำหนักตัวอย่าง

blank = น้ำหนัก residue ของ blank – ปริมาณโปรตีนของ blank - ปริมาณเถ้าของ blank

น้ำหนักตัวอย่าง = ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักตัวอย่างที่ใช้ (มิลลิกรัม)

### 7. การวิเคราะห์ปริมาณเส้นใยอาหารที่ละลายน้ำ (AOAC, 2000 : Method no. 993.19)

**เครื่องมือและอุปกรณ์**

เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ปริมาณเส้นใยอาหารที่ไม่ละลายน้ำ

**สารเคมี**

เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ปริมาณเส้นใยอาหารที่ไม่ละลายน้ำ

**วิธีวิเคราะห์**

1. นำของเหลวที่กรองได้จากการวิเคราะห์ปริมาณเส้นใยอาหารที่ไม่ละลายน้ำมาปรับน้ำหนักให้ได้ 100 กรัม ด้วยน้ำกลั่น
2. เติมสารละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 ที่มีอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสจำนวน 400 มิลลิลิตรลงไป แล้วทิ้งให้ตกตะกอนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที

3. ทำ fritted crucible ที่เตรียมไว้ให้เปียก และกระจายซีไลท์ด้วยสารละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 78 แล้วจึงนำของเหลวที่กรองได้หลังปรับน้ำหนักมากรอง
4. ล้าง residue ด้วยสารละลายเอทานอลความเข้มข้น ร้อยละ 78 จำนวน 3 รอบๆละ 20 มิลลิลิตร ล้างด้วยสารละลายเอทานอลความเข้มข้น ร้อยละ 95 จำนวน 2 รอบๆละ 10 มิลลิลิตร ล้างด้วยอะซีโตนจำนวน 2 รอบๆ ละ 10 มิลลิลิตร
5. นำ fritted crucible ที่มี residue ไปอบด้วยตู้อบลมร้อนอุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นทำให้เย็นใน โถดูดความชื้น แล้วนำไปชั่งน้ำหนักเพื่อหาน้ำหนักของ residue
6. ขูด residue จาก fritted crucible อันแรกเพื่อนำไปหาปริมาณโปรตีน
7. ขูด residue จาก fritted crucible อันที่สองเพื่อนำไปหาปริมาณเถ้า
8. คำนวณปริมาณเส้นใยอาหารที่ละลายน้ำจากสูตร

$$\text{เส้นใยอาหารที่ละลายน้ำ (ร้อยละ)} = \frac{(residue - P - A - B)}{sample} x100$$

โดยให้

น้ำหนัก residue = ค่าเฉลี่ยของน้ำหนัก residue ที่ใช้ (มิลลิกรัม)

P = น้ำหนักโปรตีนของ residue จาก fritted crucible อันแรก (มิลลิกรัม)

A = น้ำหนักเถ้าของ residue จาก fritted crucible อันที่สอง (มิลลิลิตร)

B = blank (มิลลิกรัม) คำนวณจาก

Sample = น้ำหนักตัวอย่าง

blank = น้ำหนัก residue ของ blank – ปริมาณโปรตีนของ blank - ปริมาณเถ้าของ blank

น้ำหนักตัวอย่าง = ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักตัวอย่างที่ใช้ (มิลลิกรัม)

### 8. การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า (AOAC, 2000)

**เครื่องมือและอุปกรณ์**

1. ถ้วยกระเบื้อง (crucible)
2. โถดูดความชื้น (desiccator)
3. เครื่องชั่งไฟฟ้าสำหรับงานวิเคราะห์ ชั่งน้ำหนักได้ละเอียด 0.1 มิลลิลิตร
4. เตาเผา

**วิธีวิเคราะห์**

1. เผาถ้วยกระเบื้องในเตาเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ทำให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนัก ($W_1$)
2. ชั่งตัวอย่างให้ทราบน้ำหนักแน่นอน 2 กรัม ($W_2$) ใส่ในถ้วยกระเบื้องที่ผ่านการเผาและทราบน้ำหนักแน่นอน
3. นำไปเผาบนตะเกียงบุนเซนจนหมดควัน แล้วนำไปเผาต่อในเตาเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส จนกระทั่งได้เถ้าสีขาว
4. นำออกจากเตาเผาและทำให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนัก ($W_3$)
5. คำนวณปริมาณเถ้า จากสูตร

$$\text{ปริมาณเถ้า ร้อยละโดยน้ำหนัก} = \frac{(W_3 - W_1)}{W_2} \times 100$$

โดยให้ $W_1$ = น้ำหนักของถ้วยกระเบื้อง (กรัม)
$W_2$ = น้ำหนักของตัวอย่างที่ใช้ (กรัม)
$W_3$ = น้ำหนักของถ้วยกระเบื้องและตัวอย่างหลังเผา (กรัม)

**9. การหาปริมาณกรดโดยการไตเตรท (อรทัย, 2547)**

**เครื่องมือและอุปกรณ์**

1. ปิเปต
2. บีกเกอร์ 100 มิลลิลิตร
3. ขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 มิลลิลิตร

**สารเคมี**

1. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ (NaOH0.1 N)
2. ฟีนอฟธาลีน (phenolphathalein indication)

**วิธีวิเคราะห์**

1. ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างมา 20 มิลลิลิตร ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร
2. หยดสารละลายฟีนอฟธาลีน ประมาณ 2 – 3 หยด เป็นอินดิเคเตอร์
3. นำไปไตเตรทกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์จนสังเกตเห็นจุดยุติเป็นสีชมพูอ่อน บันทึกปริมาณของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์กรดทั้งหมดในรูปของกรดอะซีติก ดังนี้

$$\text{ปริมาณกรดอะซีติก (ร้อยละ)} = \frac{\text{ความเข้มข้นของ NaOH} \times \text{ปริมาตรNaOH ที่ใช้} \times 60 \times 100}{\text{ปริมาตรตัวอย่างที่ใช้ (ml)}}$$

### 10. การทดสอบลักษณะบ่งเอกลักษณ์ โซเดียมคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสชั้นคุณภาพอาหาร (มอก.1491-2541)

**เครื่องมือและอุปกรณ์**

1. หลอดทดลอง
2. บีกเกอร์ 100 มิลลิลิตร
3. ขวดรูปชมพู่ ขนาด 150 มิลลิลิตร
4. เครื่องชั่งไฟฟ้าสำหรับงานวิเคราะห์ ชั่งน้ำหนักได้ละเอียด 0.1 มิลลิลิตร
5. กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1

**สารเคมี**

1. สารละลายคอปเปอร์(II) ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต 0.125 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร
2. สารยูเรนิลแอซีติก
3. กรดเกลเซียลแอซีติก
4. สารโคบอลต์แอซีเทต

**การเตรียมสารตัวอย่าง**

1. ชั่งสารตัวอย่าง 1 กรัม เติมน้ำกลั่น 50 ลูกบาศก์เซนติเมตร
2. นำไปอุ่นให้ร้อน 70 องศาเซลเซียสและคนตลอดเวลา
3. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

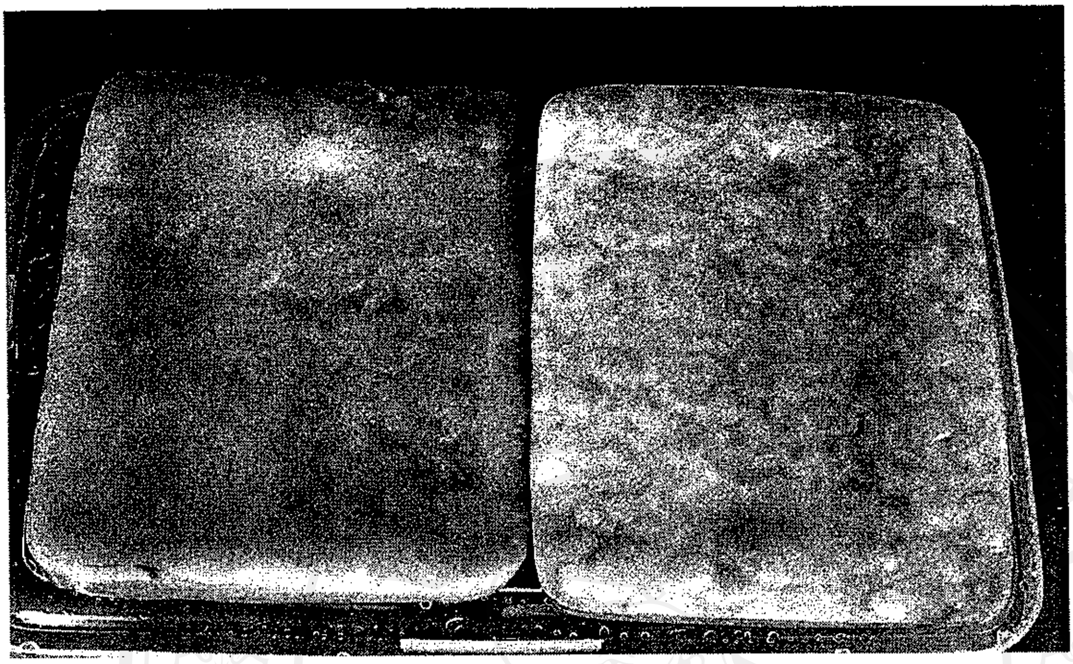
**วิธีวิเคราะห์**

1. ตวงสารละลายตัวอย่าง 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่
2. เติมสารละลายคอปเปอร์(II) ซัลเฟต 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร เขย่าให้เข้ากัน และสังเกตุสีของตะกอน ($W_1$)
3. กรองสารละลายจากข้อ 2. ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ แบ่งสารละลายใส่หลอดทดลอง 2 มิลลิลิตร
4. เติมสารละลายโคบอลต์-ยูเรนิลแอซีเทต 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและสังเกตุสีของตะกอน ($W_2$)

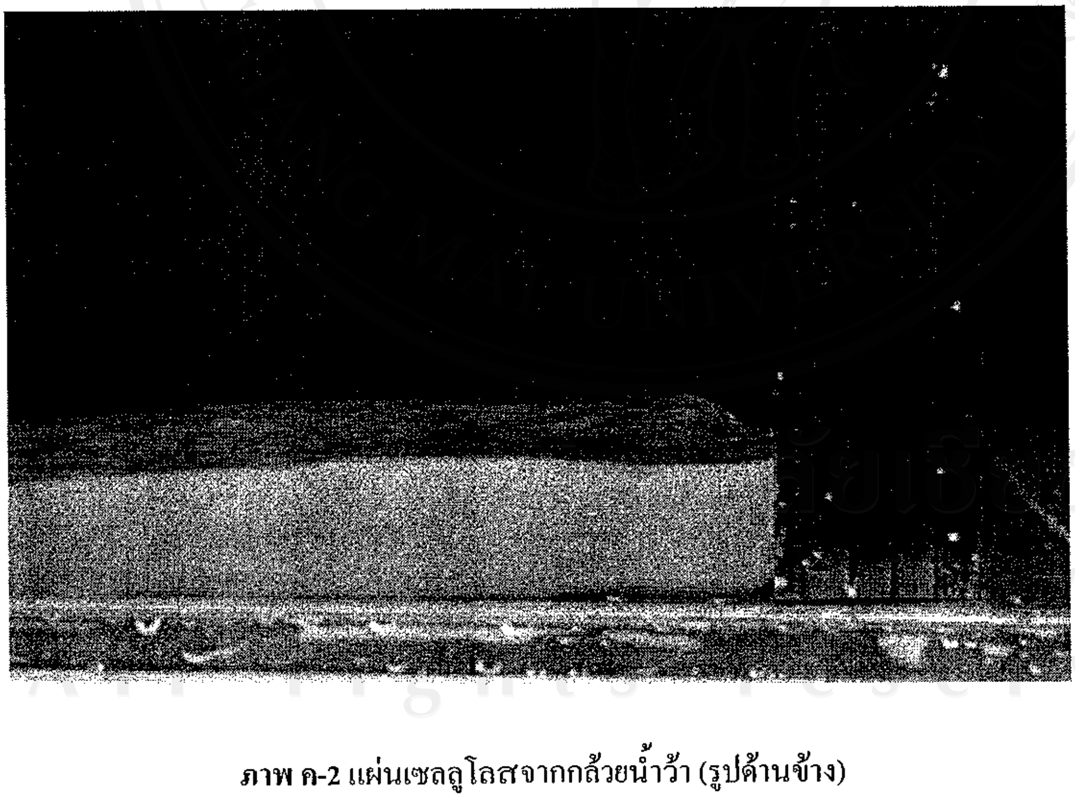
ถ้าสารตัวอย่างเป็นสารโซเดียมคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส สีของตะกอน ($W_1$) ต้องเป็นสีฟ้าและสีของตะกอน ($W_2$) ต้องเป็นสีเหลือง

# ภาคผนวก ค

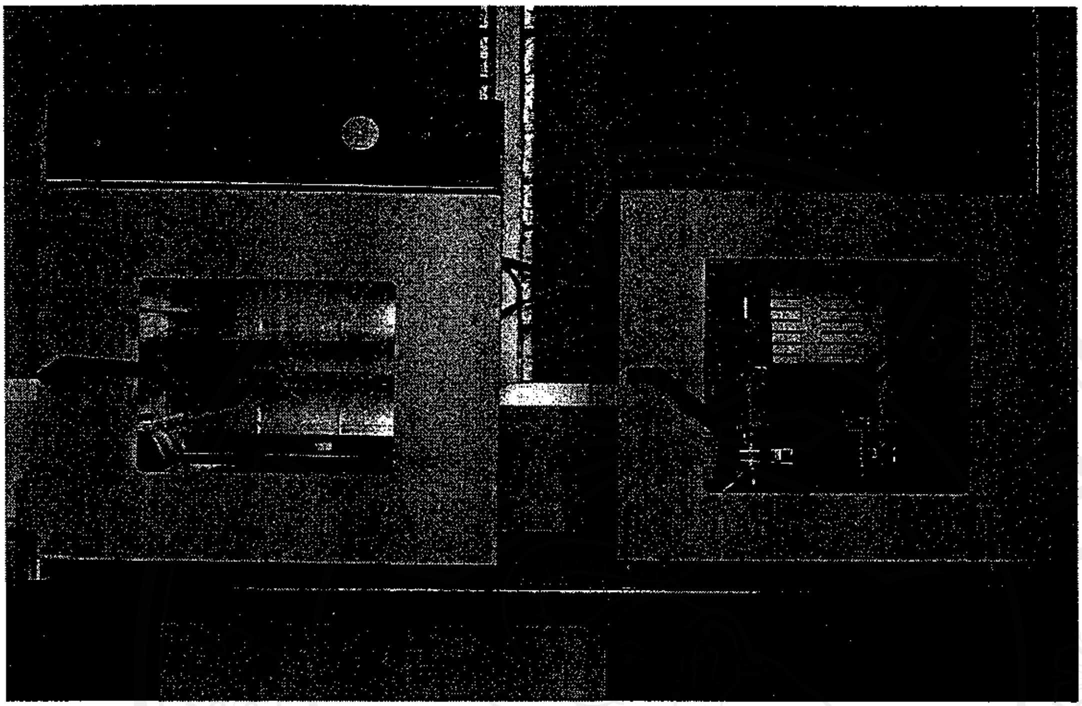
# ภาพประกอบการทดลอง



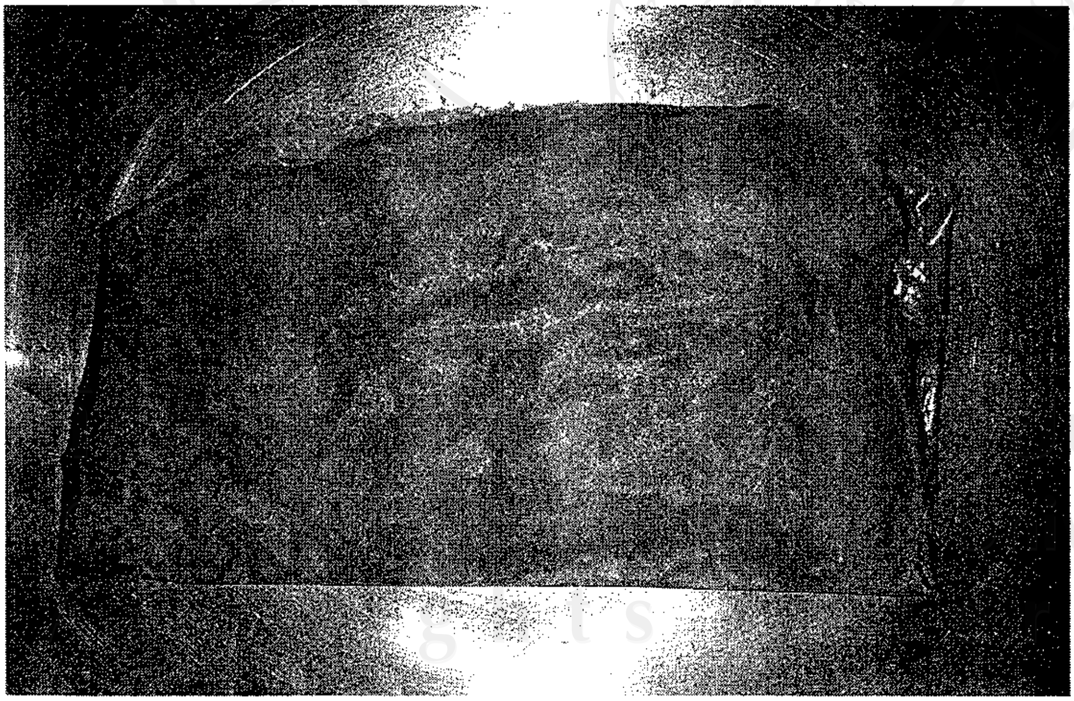
**ภาพ ค-1** แผ่นเซลลูโลสจากกล้วยน้ำว้า (รูปด้านบน)



**ภาพ ค-2** แผ่นเซลลูโลสจากกล้วยน้ำว้า (รูปด้านข้าง)

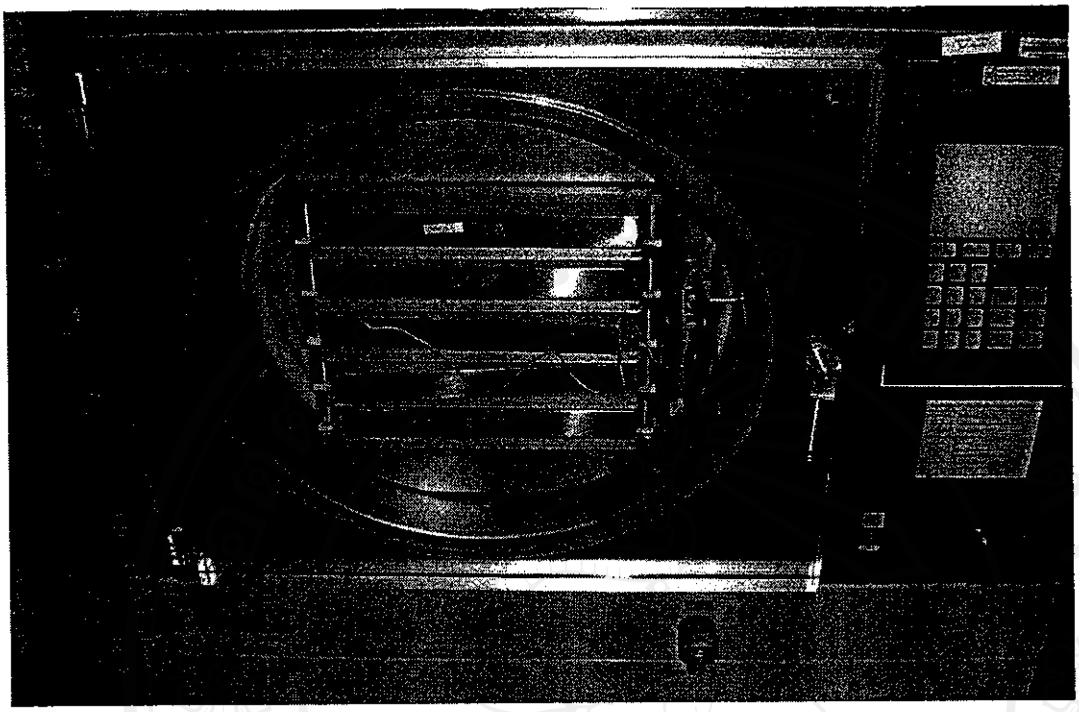


**ภาพ ค-3** เครื่องอบแห้งแบบสุญญากาศ



**ภาพ ค-4** เซลลูโลสแห้งจากเครื่องอบแห้งแบบสุญญากาศ

ใหม่
versity
v e d



**ภาพ ค-5** เครื่องอบแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

**ภาพ ค-6** เซลลูโลสแห้งจากเครื่องอบแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

# ประวัติผู้เขียน

| | |
|---|---|
| ชื่อ | นางสาวศิริเพ็ญ สิริโรจนพุฒิ |
| วัน เดือน ปี เกิด | 4 กันยายน 2523 |
| ประวัติการศึกษา | สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลายโรงเรียนพิจิตรพิทยาคม จ. พิจิตร ปีการศึกษา 2541<br>สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาวิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ ปีการศึกษา 2546 |