

คู่มือปฏิบัติการ

วิชาโภชนศาสตร์สัตว์ประยุกต์ รหัสวิชา AG 174 441

(Applied animal nutrition laboratory)

อาจารย์ผู้สอน

รศ.ดร.กฤตพล	สมมาตย์
ผศ.ดร.วินัย	ใจขาน
ผศ.ดร.สาวิตรี	วงศ์ตั้งถิ่นฐาน
รศ.ดร.อนุสรณ์	เชิดทอง
อ.ดร.แหวววี	บุญเทียม
ดร.วรรณ	แก้วพิลา
นายปฐมพงษ์	หล้าคำ

ประจำภาคต้น ปีการศึกษา 2564

ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สารบัญ

		หน้า
บทปฏิบัติการที่ 1	กฎระเบียบการใช้ห้องปฏิบัติการและอุปกรณ์	1
บทปฏิบัติการที่ 2	การเก็บตัวอย่าง การเตรียมตัวอย่าง และการตรวจสอบคุณภาพ อาหารและวัตถุดิบอาหารสัตว์ขั้นต้น	5
บทปฏิบัติการที่ 3	การวิเคราะห์หาความชื้น และเถ้าทั้งหมด	14
บทปฏิบัติการที่ 4	การวิเคราะห์เถ้าที่ละลายและไม่ละลายในกรด	22
บทปฏิบัติการที่ 5	การวิเคราะห์แคลเซียมและฟอสฟอรัส	24
บทปฏิบัติการที่ 6	การวิเคราะห์หาปริมาณเกลือในอาหารสัตว์	30
บทปฏิบัติการที่ 7	การวิเคราะห์โปรตีนหยาบ	33
บทปฏิบัติการที่ 8	การวิเคราะห์ไขมัน	38
บทปฏิบัติการที่ 9	การวิเคราะห์เยื่อใยหยาบ	42
บทปฏิบัติการที่ 10	การวิเคราะห์พลังงานรวม	44
บทปฏิบัติการที่ 11	การตรวจสอบสารพิษในอาหารสัตว์	49

บทปฏิบัติการที่ 1 กฎระเบียบการใช้ห้องปฏิบัติการและอุปกรณ์

1.1 ข้อควรระวังและการป้องกันรักษาความปลอดภัยในห้องปฏิบัติการ

เจ้าหน้าที่ นักศึกษา หรือผู้ทำงานในห้องปฏิบัติการต้องระมัดระวังอยู่เสมอว่าอาจจะเกิดอุบัติเหตุและอันตรายต่าง ๆ ขึ้นได้ตลอดเวลาขณะทำงานในห้องปฏิบัติการ อันตรายที่อาจพบอยู่เสมอเช่น ไฟไหม้ซึ่งอาจเกิดจากสารอินทรีย์ จากกรด-เบส ตลอดจนการระเหยของสารพิษ อันตรายต่าง ๆ เหล่านี้สามารถป้องกันไม่ให้เกิดขึ้นได้ ถ้าหากผู้ใช้งานในห้องปฏิบัติตามกฎระเบียบของห้องปฏิบัติการ และมีความระมัดระวังเพิ่มมากยิ่งขึ้น

ข้อควรปฏิบัติในห้องปฏิบัติการ

1. รักษาความสะอาดพื้นที่และบริเวณที่ปฏิบัติงานหรือทำการวิเคราะห์ ควรจัดพื้นที่ให้มีความเหมาะสมสะดวกต่อการทำงานและสะอาด เพื่อป้องกันอันตรายจากสารเคมีต่าง ๆ ที่อาจจะเกิดขึ้นได้
2. ไม่เล่นหรือหยอกล้อเล่นกับเพื่อนร่วมงานขณะทำงานในห้องปฏิบัติการเพราะอาจจะเกิดอุบัติเหตุได้
3. การใช้เครื่องแก้ว เครื่องแก้วที่แตกหรือแตกร้าวไม่นำมาใช้งานอีก

บีกเกอร์ (beaker, erlenmeyer หรือ conical flask) และ กระบอกตวง (measuring cylinder) ให้ผลในการวัดปริมาตรไม่แน่นอน แต่ควรใช้อุปกรณ์วัดปริมาตรที่มีความแม่นยำกว่า เช่น ขวดวัดปริมาตร (volumetric flask), บิวเรต (buret) และ ไพเปต (pipet)

การใช้บิวเรต ก่อนใช้งานควรตรวจสอบสภาพก่อนว่าสามารถใช้งานได้สะดวกหรือไม่ สามารถหมุนก๊อกตรงกับ ground joint ได้ดีหรือไม่

การเก็บสารละลายที่มีฤทธิ์เป็นด่างจะต้องเก็บไว้ในขวดพลาสติกเสมอ ห้ามเก็บไว้ในเครื่องแก้ว เพราะด่างมีคุณสมบัติกัดแก้ว ซึ่งมีผลทำให้ จุกปิดแก้วและขวดเชื่อมติดเป็นเนื้อเดียวกันทำให้การเปิดจุกไม่ออกได้

หลอดทดลองควรเก็บไว้ในที่ใส่หลอด (rack) ในระหว่างทำงาน การเผาสารเคมีในหลอดทดลองควรเตรียมให้สามารถยกออกหรือเคลื่อนย้าย ได้สะดวกเพื่อป้องกันอันตราย

4. การแต่งกายในห้องปฏิบัติการ ควรสวมชุดทำงานในห้องปฏิบัติการให้เรียบร้อย รวบหรือมัดผมให้เรียบร้อย(กรณีผมยาว)และใส่แว่นตาเพื่อป้องกันอันตรายจากสารพิษกระเด็นเข้าตา เมื่อเคลื่อนย้ายอุปกรณ์ที่ยังร้อนใส่ถุงมือ (gloves) ใส่รองเท้าให้เรียบร้อย ไม่ใส่

ร้องเท้าแตะเพราะอาจทำให้เกิดอันตรายได้ หากสารเคมีเกิดการรั่วไหล

5. สารเคมีกระเด็นเข้าตา หรือถูกสารเคมีรดบนผิวหนัง เสื้อผ้า ต้องรีบล้างออกด้วยน้ำจำนวนมาก ๆ โดยเร็ว ถ้าสารพวกนี้หกหรือหยดบนพื้นโต๊ะหรือเก้าอี้หรือพื้นห้อง จะต้องรีบเช็ดออกทันที เพราะอาจทำให้เพื่อนร่วมงานได้รับอันตรายภายหลังได้ ถ้าได้รับอันตรายรุนแรงจะต้องรีบไปพบแพทย์หรือนำผู้ป่วยส่งโรงพยาบาล
6. เมื่อทำการรดหรือต่างหกหรือหยดลงพื้น ถ้าเป็นกรดให้ใช้ sodium bicarbonate (ลักษณะเป็นเกร็ดของแข็ง) โรยทับด้านบนและล้างด้วยน้ำ แต่ถ้าเป็นสารที่มีฤทธิ์เป็นด่างหยดลงพื้นให้ล้างด้วยน้ำแล้วตามด้วยสารละลายกรดอะซิติก (acetic acid) เจือจาง
7. การจดบันทึกการระบุน้ำสารเคมีและความเข้มข้นของสารเคมี สารเคมีที่เตรียมขึ้นมา ควรมีการระบุไว้ข้างขวดให้ชัดเจนว่าเป็นสารอะไร มีความเข้มข้นเท่าไร เพื่อให้ทราบได้แน่นอน ไม่ใช้สารเคมีที่ไม่มีการระบุข้างขวดอย่างชัดเจน เพื่อเป็นการป้องกันการปนเปื้อนของสารอื่น ๆ และการเกิดข้อผิดพลาดในการใช้งาน
8. การเคลื่อนย้ายสารเคมีและอุปกรณ์ อุปกรณ์ที่มีลักษณะเป็นแท่งยาว เช่น บิวเรต ควรถือด้วยมือขวาแนบติดกับลำตัว ใส่ถุงมือเมื่อเทสารละลาย ใช้กรวยเมื่อตวงของเหลวและละลาย สารและพยายามป้องกันการเกิดฟองอากาศ ซึ่งอาจก่อให้เกิดอันตรายได้
9. ใช้ตู้ดูดอากาศ Fume Hood ควรมีกระจกมองเห็นด้านในได้สะดวก เมื่อทำงานกับสารเคมีที่เป็นพิษ

สิ่งที่ต้องจดจำไว้ตลอดเวลาในระหว่างการทำงานในห้องปฏิบัติการ

ไม่สูบบุหรี่

ไม่ดื่มหรือกินอาหาร

ไม่วิ่งขณะทำงาน

ทราบทางออกเมื่อเกิดอุบัติเหตุ

รักษาความสะอาดที่ทำงาน ดับไฟให้สนิทก่อนเดินออกจากห้อง

“ช่วยเพื่อนร่วมงานในกรณีฉุกเฉิน”

1.2 การตรวจสอบความเชื่อถือผลการวิเคราะห์

ข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการนั้น มีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีความถูกต้องและการยอมรับในทางวิชาการ สมมติว่าเราวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนจากหญ้าสด โดยอาศัยวิธีการกลั่น คำถามมีอยู่ว่า ค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ครั้งนี้มีค่าใกล้เคียงกับค่าความเป็นจริงมากน้อยเพียงใด ดังนั้นการที่เราสามารถตรวจสอบความเชื่อถือ หรือประเมินผลการวิเคราะห์ก็จะช่วยตอบคำถามนั้นได้ นอกจากนั้นแล้ว ยังอาจทำให้เรามีความมั่นใจในผลการวิเคราะห์ได้มากยิ่งขึ้นอีกด้วย

ความเที่ยงตรง (Accuracy) ความถูกต้องของการวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้ว่ามีค่าถูกต้องใกล้เคียงกับความเป็นจริงมากน้อยเพียงใด เนื่องจากข้อมูลทางด้านวิทยาศาสตร์ชีวภาพ จะมีความผันแปรและมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลา ค่าที่เราวิเคราะห์ได้กับค่าความเป็นจริงมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลาและผลที่เราวิเคราะห์ได้ กับความเป็นจริงมีความเปลี่ยนแปลงโดยอิสระซึ่งกันและกัน สิ่งที่เป็นคำถาม คือ ความเที่ยงตรงของผลการวิเคราะห์ได้อย่างไร

1. การทดสอบกับสารมาตรฐาน (standard) เพื่อเป็นการตรวจสอบความผิดพลาดที่อาจจะเกิดจากวิธีการหรือเทคนิคในการวิเคราะห์ โดยใช้สารมาตรฐานเป็นตัวเปรียบเทียบ เช่น การใช้ยูเรียเพื่อหาปริมาณไนโตรเจน (หาร้อยละของ recovery) ในการวิเคราะห์โปรตีนในตัวอย่างอาหาร

2. เปรียบเทียบผลที่ได้กับผลการวิเคราะห์จากแหล่งข้อมูล เอกสารตีพิมพ์ หรือผลที่ได้จากการวิเคราะห์ที่ผ่านมา โดยปกติแล้วผู้วิเคราะห์ควรใช้เทคนิควิธีการตรวจสอบความเที่ยงตรงทั้งสองวิธีเป็นประจำในห้องปฏิบัติการ

ความแม่นยำ (Precision) เป็นค่าที่นักศึกษามักจะมีความสับสนกับความเที่ยงตรง (accuracy) ดังนั้นเราควรทำความเข้าใจถึงความแตกต่างของทั้งสองคำดังกล่าว ค่าความแม่นยำจากการวิเคราะห์จะหมายถึง ค่าที่มีค่าใกล้เคียงกับข้อมูลที่ได้มาจากการวิเคราะห์หลายครั้ง

ดังนั้นความแม่นยำที่วิเคราะห์ได้ถึงแม้ว่าจะให้ผลใกล้เคียงกันมากเพียงใดแต่ผลนั้นอาจจะไม่ถูกต้องหรือใกล้เคียงกับค่า ความเป็นจริงก็ได้ โดยทั่วไปเราจะใช้ค่าเบี่ยงเบน (deviation) ของการวิเคราะห์แต่ละครั้งในการวัดความแม่นยำ ซึ่งความแม่นยำจะสามารถวัดความถูกต้อง (repeatability) ได้โดยแสดงในรูปของ ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) หรือ coefficient of variation (CV) ดังแสดงวิธีการคำนวณ และ ตารางที่ 1 แสดงช่วงปกติของการวิเคราะห์ทางเคมีและค่า CV

$$\begin{aligned}\text{Standard deviation } = s &= \sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2 / n - 1} \\ &= \sqrt{(\sum x_i^2 - ((\sum x_i)^2 / n)) / n - 1}\end{aligned}$$

ตัวอย่างผลการวิเคราะห์โปรตีนในอาหารสัตว์

Replicate	%CP	x_i^2
1	17.0	289.0
2	17.5	306.25
3	18.0	324.0

$$\sum x_i = 17.0 + 17.5 + 18.0 = 52.5$$

$$\sum x_i / n = 52.5 / 3 = 17.5$$

$$\sum x_i^2 = 289.0 + 306.25 + 324.0 = 919.25$$

$$(\sum x_i)^2 = (52.5)^2 = 2756.25$$

$$(\sum x_i)^2 / n = 2756.25 / 3 = 918.75$$

$$[\sum x_i^2 - ((\sum x_i)^2 / n) / (n-1)] = (919.25 - 918.75) / (3-1) = 0.05 / 2 = 0.025$$

ดังนั้น Standard deviation = $\sqrt{0.025} = 0.05$

$$CV = 0.05 \times 100 / 17.5 = 0.285 \%$$

ตารางที่ 1 ช่วงปกติของการวิเคราะห์ทางเคมีและค่า CV ที่เชื่อถือได้ ใช้ในการเป็นแนวทางประเมินความแม่นยำของการวิเคราะห์

การวิเคราะห์	ช่วงปกติของการวิเคราะห์	ค่า CV ที่ยอมรับได้, %
DM	80-100	0.5
Ash	0-20	2.0
CP	5-50	2.0
CF	5-50	3.0
NDF	10-80	3.0
ADF	5-70	3.0
ADL	0-20	4.0
Ca	0-3	3.0
P	0-2	3.0
EE	1-20	4.0
IVDMD	20-80	4.0

Galyean (1997)

บทปฏิบัติการที่ 2 การเก็บตัวอย่าง การเตรียมตัวอย่าง และการตรวจสอบคุณภาพอาหารและ วัตถุดิบอาหารสัตว์ขั้นต้น

วิธีการเก็บตัวอย่างวัตถุดิบอาหารสัตว์ สำหรับการเก็บตรวจสอบคุณภาพและงานวิเคราะห์

การใช้ตัวอย่างที่เป็นตัวแทนอย่างแท้จริงของอาหารที่ต้องการวิเคราะห์ เป็นสิ่งสำคัญที่ต้องคำนึงในงานวิเคราะห์ เนื่องจากว่าในการวิเคราะห์แต่ละครั้ง เราไม่สามารถที่จะนำอาหารทั้งหมดซึ่งมีจำนวนมากมาทำการวิเคราะห์ได้ เราจึงต้องเก็บตัวอย่างเพียงส่วนหนึ่ง ซึ่งสามารถเป็นตัวแทนที่ดีของอาหารทั้งหมดมาใช้ เพราะหากผู้วิเคราะห์ขาดความสามารถหรือบกพร่องในการเก็บตัวอย่างที่เป็นตัวแทนที่แท้จริง จะทำให้ผลของการวิเคราะห์นั้นใช้ประโยชน์ไม่ได้ ดังนั้นวิธีการเก็บตัวอย่าง (Sampling technique) จึงนับได้ว่าเป็นหัวใจของงานวิเคราะห์ การที่เราจะเก็บอาหารได้ดั่งนั้นจะต้องอาศัยหลักต่อไปนี้

1. ตรวจสอบขั้นตอนแรกก่อนที่จะนำวัตถุดิบลงจากรถ

เมื่อผู้ขายนำวัตถุดิบอาหารมาส่งให้ ก่อนที่จะอนุญาตให้นำลงจากรถ ควรมีการสุ่มเก็บตัวอย่างเพื่อนำมาตรวจสอบว่าวัตถุดิบชนิดนั้นมีคุณภาพดีและตรงตามที่เราต้องการหรือไม่ ถ้าไม่ดีหรือไม่ตรงกับที่ต้องการ จะได้คืนกลับไปโดยไม่ต้องเสียเวลาและแรงงานในการนำขึ้นและนำลง

2. ใช้เครื่องมือในการเก็บตัวอย่าง (Sampling instruments) ให้เหมาะสมกับตัวอย่างที่จะเก็บ เครื่องที่นิยมใช้มีดังนี้

2.1 Thief เป็นเครื่องมือที่ประกอบด้วยหลอดยาว ซึ่งมีรูให้ของเหลวเข้าไปที่ปลายสุด ใช้สำหรับเก็บตัวอย่างที่เป็นของเหลว เช่น น้ำมัน เมื่อต้องการใช้น้ำเครื่องมือใส่ตัวอย่างอาหารที่ต้องการเก็บตัวอย่าง เมื่อของเหลวขึ้นมาในหลอดจนมีระดับเท่ากับภายนอก ก็ปิดปลายหลอดแล้วนำเอาตัวอย่างมาถ่ายใส่ขวด (รูปที่ 1)

2.2 Sampling tube (หลอด) เป็นหลอดทองเหลืองยาว 2-3 ฟุต เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 นิ้ว ที่ปลายด้านหนึ่งจะตีเกลียวเป็นรูปกรวย และมีด้ามจับอีกปลายหนึ่ง แล้วมีช่องยาวจากปลายจนเกือบถึงด้ามจับเพื่อให้ตัวอย่างเข้า เครื่องมือชนิดนี้ใช้กันมากในการเก็บตัวอย่างที่เป็นของแข็งและผง เช่น เมล็ดข้าว และนมผง โดยใช้เครื่องมือนี้เสียบเข้าไปในภาชนะบรรจุ เช่น ถุงหรือกระสอบ เมื่อตัวอย่างไหลเข้าตามช่องไปในหลอดแล้วก็ให้หมุนปิดช่องเสีย แล้วเอาตัวอย่างมาใส่ขวดเก็บตัวอย่าง (รูปที่ 2)

2.3 Trier ใช้สำหรับเก็บตัวอย่างที่ค่อนข้างชื้น เช่น ไซสัต์ เนยเหลว หรือเนยเทียม (รูปที่ 3)

2.4 The drill หรือ auger ใช้สำหรับเก็บตัวอย่างที่ค่อนข้างแข็ง เช่น ตัวอย่างที่แช่เย็นจนแข็ง (รูปที่ 4)

3. วิธีการเก็บตัวอย่าง

การเก็บตัวอย่างควรเก็บจากจุดหลายจุด โดยเฉพาะจุดกลางที่มีความหนาและน้ำหนักกตลงที่สุด โดยใช้หลอด (sampling tube) แทะจากทั้งด้านบนและด้านล่าง รวมทั้งการแทงสลับกับระหว่างปากและท้ายกระสอบ การแทงต้องแทงให้ลึกถึงกลางกระสอบ โดยเฉพาะอย่างยิ่งวัตถุดิบที่มักมีปัญหา เช่น ปลาป่น กากถั่วเหลือง และข้าวโพด เก็บตัวอย่างให้มากเกินพอ หลังจากนั้นนำไปรวมกันเพื่อจะทำการลดขนาดตัวอย่างในขั้นตอนต่อไป

4. วิธีการแบ่ง เพื่อลดขนาดตัวอย่าง (quartering)

เมื่อการเก็บตัวอย่างจากจุดต่างๆ จนได้จำนวนตัวอย่างมากเกินความต้องการ ต้องมีการลดขนาดตัวอย่างลงให้พอสำหรับใช้ในการวิเคราะห์ โดยเทตัวอย่างทั้งหมดลงบนผืนเรียบ หากวัตถุดิบนั้นมีเนื้อหยาบควรบดให้ละเอียดเสียก่อน จากนั้นผสมตัวอย่างที่เก็บมาได้ให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วเกลี่ยตัวอย่างที่ผสมเข้ากันแล้วให้กระจายทั่วภาชนะเป็นวงกลมหรือสี่เหลี่ยม ใช้ไม้บรรทัดปาดผิวหน้าให้เรียบเสมอกันแล้วแบ่งตัวอย่างออกเป็น 4 ส่วนเท่าๆ กัน เลือกเฉพาะสองส่วนที่อยู่ตรงข้ามจากตัวอย่างรูปที่ 5 เก็บในส่วนที่ 1 กับส่วนที่ 4 (ส่วนหมายเลข 2 และ 3 ไม่ใช้ แยกออกไป) แล้วนำกลับมาผสมกัน แล้วแบ่ง 4 ส่วนอีกครั้ง ทำการสุ่มและแบ่งตัวอย่างเช่นเดิมจนกระทั่งได้ตัวอย่างตามปริมาณที่ต้องการตรวจสอบ โดยทั่วไปควรเก็บตัวอย่างไว้ 200-300 กรัม หรือ $\frac{1}{2}$ กก. เป็นอย่างน้อย เก็บใส่ขวดตัวอย่างที่แห้ง สะอาดและมีฝาปิดสนิท



รูปที่ 5 การแบ่งและตำแหน่งในการเก็บตัวอย่างอาหาร

5. การเก็บผสมและเก็บตัวอย่างของเหลว

ตัวอย่างที่เป็นของเหลวจะต้องผสมให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกันโดยการเขย่า หรือกวนให้เข้ากัน หรือผสมกลับๆไปกลับมา โดยใช้ภาชนะอื่นช่วยในการผสมควรใช้ตัวอย่างทันทีหลังจากที่ได้ผสมแล้ว

6. การปิดฉลากบนภาชนะใส่ตัวอย่าง (labeling)

ในการเก็บตัวอย่างเพื่อส่งมาวิเคราะห์ ควรจะได้มีการบันทึกรายละเอียดต่างๆ ของวัตถุดิบชนิดนั้นๆ ทุกครั้ง ซึ่งในการบันทึกนี้อาจเขียนไว้ที่ฉลากหรือขวดตัวอย่างทั้งหมด หรือเขียนเฉพาะรหัสตัวอย่างไว้ที่ฉลาก ส่วนรายละเอียดอื่นๆ ให้บันทึกแยกไว้ในระบบจัดเก็บข้อมูลหรือสมุดบันทึกการรับตัวอย่าง

ข้อมูลต่างๆ ที่ควรบันทึกได้แก่ ชนิดของตัวอย่าง แหล่งของตัวอย่าง วันเดือนปี ที่เก็บตัวอย่าง ความต้องการในการวิเคราะห์ วันเดือนปี ที่ต้องการวิเคราะห์ วิธีการวิเคราะห์ ชื่อผู้ขาย ผู้ส่งตัวอย่าง (ในกรณีที่รับบริการวิเคราะห์ตัวอย่าง) ข้อตกลงหรือการรับประกันจากผู้ขาย เช่น ราคา/เปอร์เซ็นต์โปรตีน ฯลฯ ดังตัวอย่างรูปที่ 6

ตัวอย่าง	: ข้าวโพด
แหล่ง	: โรงอาหารสัตว์ KKU
ว/ด/ป	: 21 กรกฎาคม 2560
รายการวิเคราะห์	: DM, Ash, CP, EE, Urea
วิธีวิเคราะห์	: Proximate analysis, Kit test
ผู้ส่งตัวอย่าง	: ฟาร์มนาคุณ

รูปที่ 6 ตัวอย่างฉลากในการเก็บตัวอย่างอาหาร

การเก็บรักษาตัวอย่าง

การเก็บรักษาตัวอย่างสำหรับการตรวจสอบ มีความสำคัญมาก หากเก็บรักษาไม่ถูกต้องทำให้ตัวอย่างเปลี่ยนสภาพไปจากเดิม อาจทำให้ผลการตรวจสอบคลาดเคลื่อนไปจากความเป็นจริงซึ่งจะมีผลไปถึงการตกลงราคา และการใช้คำนวณสูตรอาหารด้วย

การเก็บตัวอย่างที่ถูกต้องควรเก็บไว้ในที่แห้งและเย็น ดังนั้นการเก็บตัวอย่างในห้องปรับอากาศหรือเก็บไว้ในตู้เย็น (อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส) จึงทำให้สามารถเก็บตัวอย่างไว้ได้นานกว่าในอุณหภูมิห้องปกติ แต่ในกรณีที่ตัวอย่างเป็นวัตถุดิบที่มีความชื้นสูง พืชหมัก พืชสด หรือตัวอย่างที่เป็นของเหลว ต้องเก็บไว้ในช่องแช่แข็งของตู้เย็นโดยเร็วที่สุด หลังจากสุ่มตัวอย่าง เพราะตัวอย่างพวกนี้จะเสื่อมคุณภาพเร็วมากในอุณหภูมิปกติ

ข้อควรระวังในการเก็บตัวอย่าง อย่าให้มีความชื้นหรือการปะปนของวัตถุดิบอื่นมาในตัวอย่าง ในระหว่างการเก็บ และอย่าให้ให้มีการแยกส่วนของตัวอย่างที่สุ่มหรือลดขนาดตัวอย่าง

อายุการเก็บรักษาตัวอย่าง

อายุในการเก็บรักษา ขึ้นอยู่กับชนิดและสภาพของวัตถุดิบโดยเฉพาะอย่างยิ่งคือ ความชื้น ตัวอย่างที่เก็บไว้ในที่แห้งและเย็นอาจเก็บไว้ได้นานถึง 6 เดือน แต่ถ้าจะให้ผลดีควรตรวจสอบตัวอย่างให้เร็วที่สุด หลังจากเก็บส่วนตัวอย่างที่ตรวจสอบแล้ว ไม่ควรรีบนำไปทิ้ง ควรเก็บไว้อีกประมาณ 1-2 เดือน หากมีปัญหาเกิดขึ้นจะได้นำมาตรวจสอบได้อีก

การส่งตัวอย่างไปยังห้องปฏิบัติการเพื่อวิเคราะห์หรือตรวจสอบ

เมื่อเก็บและลดขนาดตัวอย่างเรียบร้อยแล้ว ควรบรรจุใส่ถุงพลาสติกหนาๆ หรือบรรจุ 2 ชั้น ปิดปากถุงให้แน่นให้มีอากาศเหลือน้อยที่สุดและห่อหุ้มด้วยกระดาษอีกครั้ง เขียนชื่อตัวอย่างและรายละเอียดที่จำเป็นไว้ที่ถุง และมีสำเนาข้อมูลนั้นเก็บไว้ที่หน่วยงานของผู้ส่งตัวอย่างด้วยเพื่อใช้ประกอบการพิจารณา เมื่อเตรียมตัวอย่างและแจ้งรายละเอียดสิ่งที่จะส่งตรวจสอบแล้ว ให้นำส่งห้องปฏิบัติการให้เร็วที่สุดเท่าที่จะทำได้ แต่หากส่งตัวอย่างทางไปรษณีย์ ควรบรรจุตัวอย่างให้แน่นหนาหรือห่อหุ้มด้วยวัสดุกันกระแทกเพื่อป้องกันไม่ให้เกิดความเสียหายที่อาจเกิดขึ้นขณะขนส่ง

วิธีการตรวจสอบคุณภาพวัตถุดิบอาหารสัตว์

สำหรับการตรวจสอบคุณภาพวัตถุดิบอาหารสัตว์ชนิดต่างๆ นั้น มีหลายวิธีด้วยกัน ซึ่งอาจจะใช้วิธีใดวิธีหนึ่งหรือหลายๆ วิธีประกอบกันสุดแต่เครื่องมืออุปกรณ์ และสารเคมีที่มีหรือพอจะหามาใช้ได้ วิธีการที่แนะนำให้ใช้สำหรับห้องปฏิบัติการวิเคราะห์และตรวจสอบคุณภาพวัตถุดิบต่างๆ ไปคือ

1. การตรวจสอบโดยใช้ประสาทสัมผัส
2. การตรวจสอบโดยใช้กล้องกำลังขยายต่ำ (7-14 เท่า)
3. การใช้สารเคมีตรวจสอบอย่างง่ายและรวดเร็ว
4. การวิเคราะห์โภชนะโดยประมาณ (proximate analysis)

การวิเคราะห์โดยประมาณ (Proximate analysis) ซึ่งได้แก่ การวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ ความชื้น โปรตีน ไขมัน เถ้า เยื่อใย และคาร์โบไฮเดรตที่ย่อยง่าย รวมทั้งธาตุแคลเซียม และธาตุฟอสฟอรัส เป็นวิธีการที่ยอมรับกันทั่วไป ผลที่ได้จากการวิเคราะห์นำไปใช้ประโยชน์ต่างๆ เช่น การกำหนดมาตรฐานคุณภาพของวัตถุดิบชนิดต่างๆ ใช้เป็นข้อมูลเพื่อใช้คำนวณสูตรอาหารสัตว์ และการตกลงราคาในการซื้อ-ขายวัตถุดิบชนิดนั้นๆ เป็นต้น อย่างไรก็ตามข้อด้อยของวิธีนี้คือจำเป็นต้องอาศัยเครื่องมืออุปกรณ์ สารเคมีหลายชนิด มีค่าใช้จ่ายสูงตามจำนวนตัวอย่าง ดังนั้น การดัดแปลงวิธีการโดยอาศัยหลักการทางเคมีมาใช้เพื่อให้สามารถตรวจสอบได้อย่างง่ายและรวดเร็วขึ้น แม้ว่าจะให้ผลลักษณะคุณภาพ (Qualitative) แต่ก็ช่วยให้สามารถตัดสินใจในการเลือกซื้อหรือใช้วัตถุดิบต่างๆ ได้

รวดเร็วและดีพอสมควร แต่ข้อด้อยคือต้องมีความเชี่ยวชาญมีประสบการณ์และตรวจสอบข้อมูลที่ทันสมัยตลอดเวลา ซึ่งหากต้องการผลการวิเคราะห์เป็นตัวเลขที่แน่นอนในลักษณะปริมาณ (Quantitative) เพื่อประโยชน์อย่างอื่น อาทิ การต่อรองราคา หรือการใช้ในการคำนวณสูตรอาหาร จึงอาศัยการวิเคราะห์โดยประมาณ

ดังนั้นแนวทางการปฏิบัติสำหรับการตรวจสอบคุณภาพของอาหารและวัตถุดิบอาหารสัตว์ หากมีเครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีที่สามารถทำได้ทั้ง 4 วิธีข้างต้นก็ตาม เลือกใช้วิธีตรวจสอบจากง่ายไปหายาก คือจากวิธีที่ 1 ไปจนถึง 4 ตามลำดับ เพราะวัตถุดิบบางชนิดหรือบางตัวอย่างนั้น เพียงแต่ใช้วิธีง่ายๆ ก็สามารถบอกคุณภาพได้อย่างคร่าวๆ เช่น เมื่อตรวจพบว่าการปลอมปนในวัตถุดิบชนิดนั้นๆ เกินมาตรฐานที่กำหนดหรือเป็นอันตรายและคาดว่าจะเกิดความเสียหายหากนำมาใช้ก็ไม่ควรรับวัตถุดิบนั้นไว้แล้ว และไม่จำเป็นต้องตรวจสอบต่อไป เพราะนอกจากจะช่วยประหยัดค่าใช้จ่าย ยังทำให้สามารถทราบผลการตรวจสอบได้อย่างรวดเร็วและทันต่อเหตุการณ์อีกด้วย

บทปฏิบัติการที่ 2.1 การตรวจสอบคุณภาพทางกายภาพ

ในการตรวจสอบคุณภาพวัตถุดิบอาหารสัตว์ สามารถตรวจสอบได้ตั้งแต่เริ่มเก็บตัวอย่างจากกองหรือจากกระสอบวัตถุดิบ โดยต้องสังเกตว่าตัวอย่างที่สุ่มมาลักษณะดังนี้หรือไม่

1. ตัวอย่างวัตถุดิบ ภายในกระสอบเดียวกันหรือในแต่ละกระสอบมีความสม่ำเสมอหรือไม่ ถ้าวัตถุดิบเหมือนกันทั้งหมดก็เก็บตัวอย่างไว้ตรวจได้ แต่ถ้าไม่สม่ำเสมอต้องจัดบันทึกไว้อย่างละเอียด
2. ตัวอย่างวัตถุดิบแต่ละกระสอบมีลักษณะใดผิดปกติจนสังเกตได้ ถ้ามีก็ควรบันทึกไว้ เช่นเดียวกัน อาทิ ลักษณะเปียกชื้น มีเชื้อราขึ้น มีสี/กลิ่นผิดปกติ มีเมล็ดพืชอื่นหรือวัตถุดิบชนิดอื่นปนมา ฯลฯ

การสังเกตลักษณะต่างๆ ใน 2 ข้อนี้ สามารถทำได้โดยไม่ต้องใช้เครื่องมือพิเศษใดๆ นอกจากประสาทสัมผัสของผู้เก็บตัวอย่างซึ่งสามารถเรียนรู้ได้ไม่ยากนัก เพียงแต่ต้องเป็นคนช่างสังเกตและจดจำลักษณะต่างๆ ของวัตถุดิบแต่ละชนิดไว้ ผู้ที่เป็นประจำจนมีความชำนาญจะสามารถบอกผลได้ค่อนข้างถูกต้องและแม่นยำพอสมควร

วิธีการในการตรวจสอบคุณภาพโดยใช้ประสาทสัมผัส ทำได้โดยการนำตัวอย่างมาเทใส่ในฝ่ามือเพื่อ

1. ใช้มือสัมผัสดูความชื้น ลักษณะของเนื้อวัตถุดิบ การจับตัวเป็นก้อน ความหนักเบาของวัตถุดิบเป็นต้น
2. ใช้ตาพิจารณาถึงลักษณะรูปร่าง สี ขนาด เนื้อวัตถุดิบ สิ่งเจือปนอื่นๆ รวมทั้งเมล็ดเสียและเมล็ดที่ถูกทำลาย
3. ใช้จมูกดมกลิ่นว่าสด (ความเก่าใหม่) หรือไม่ มีกลิ่นเหม็นเน่า บุค เปี้ยว ฉุน หืน อับ ซึ่งมักเกิดจากปัจจัยต่างๆ เช่น สิ่งปลอมปนมา การเก็บวัตถุดิบไว้นานจนเกิดกลิ่นหืนของน้ำมันหรือเกิดกลิ่นอับจากเชื้อรา หรือเกิดจากกลิ่นของยาฆ่าแมลง
4. ใช้ลิ้นสัมผัสเพื่อชิมรส ซึ่งสามารถบอกถึงคุณภาพของวัตถุดิบชนิดนั้นได้ เช่น รำ ละเอียดยากกลั้วเหลือ ฯลฯ แต่ควรกระทำอย่างมีวิจารณญาณและมีความเชี่ยวชาญ

วิธีการตรวจสอบโดยใช้ประสาทสัมผัสต่างๆ ดังกล่าวนั้น นับเป็นวิธีที่ค่อนข้างง่าย เพียงแต่ผู้ตรวจสอบมีความรู้ประสบการณ์มาบ้าง ก็สามารถตรวจสอบได้ อย่างไรก็ตามมีนักอาหารสัตว์ และนักเคมีอีกเป็นจำนวนไม่น้อย ที่ไม่สนับสนุนให้ใช้วิธีนี้ โดยให้เหตุผลว่าการตรวจสอบบางอย่าง เช่น การดมกลิ่น หรือชิมรส วัตถุดิบบางชนิดเป็นการเสี่ยงอันตรายมากเกินไป ทั้งนี้เพราะอาจมีสารเคมี ยาฆ่าแมลง ยาเกินเชื้อรา สารพิษจากเชื้อรา ฯลฯ หลงเหลือหรือปะปนมาโดยเจตนาหรือไม่ก็ตาม สิ่งเหล่านี้ล้วนเป็นอันตรายและบั่นทอนสุขภาพของผู้ที่ตรวจสอบ

การใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ

อุปกรณ์

1. กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ หรือกล้องสเตอริโอไมโครสโคป ส่วนใหญ่จะมีกำลังขยายตั้งแต่ประมาณ 7-40 เท่า คือ ประกอบด้วยเลนส์ใกล้ตัว กำลังขยายต่ำ 10 เท่า และเลนส์ใกล้วัตถุ กำลังขยายเป็นแบบต่อเนื่องตั้งแต่ 0.7-4 เท่า
2. หลอดไฟฟ้าสำหรับส่องวัตถุบ อาจเป็นหลอดไฟที่สามารถปรับระดับความเข้มของแสงได้หรืออาจใช้หลอดไฟธรรมดา ซึ่งถ้าใช้หลอดไฟสีน้ำเงิน หรือมีแผ่นกรองแสงสีน้ำเงิน จะเห็นสีของตัวอย่างเป็นธรรมชาติมากขึ้น
3. จานแก้วสำหรับใส่ตัวอย่าง (Petri dish)
4. ตะแกรงสำหรับร่อนแบ่งทั่วไป หรือกระชอนเล็กๆ สำหรับการร่อนกากา
5. ถาดอลูมิเนียมสำหรับรองรับตัวอย่างขณะร่อน
6. เข็มเขี่ยปลายแหลมสำหรับเขี่ยตัวอย่าง
7. คีมคีบปลายแหลมใช้สำหรับคีบชิ้นตัวอย่าง ชิ้นขนาดเล็กสำหรับตัดตัวอย่าง

วิธีการ

1. เริ่มจากการตัดตัวอย่างที่ต้องการดูประมาณ 1 ซ่อนชาใส่ลงบนตะแกรงร่อนเพื่อแยกส่วน โดยจะได้ 2 ส่วนคือส่วนละเอียดที่ลอดผ่านตะแกรงและส่วนหยาบ (ส่วนที่ไม่ผ่านตะแกรง) ในขณะที่ร่อนส่วนละเอียด ให้ร่อนลงบนจานแก้ว โดยพยายามกระจายตัวอย่าง ซึ่งไม่จำเป็นต้องใช้ทั้งหมดเช่นกัน เพราะถ้าตัวอย่างมากเกินไป จะทำให้ดูได้ไม่ชัดเจน

2. นำจานแก้วใส่ตัวอย่างที่ร่อนผ่านตะแกรงและนำจานตัวอย่างที่ร่อนแล้ว วางลงที่ฐานสำหรับวางตัวอย่างของกล้องสังเกตว่าจะมีแผ่นวงกลมให้เลือกใช้ได้ 2 ด้าน ด้านสีขาวใช้เมื่อต้องการดูตัวอย่างวัตถุบที่สีเข้ม ส่วนด้านสีดำใช้เมื่อต้องการดูตัวอย่างที่มีสีอ่อน

3. ปรับเลนส์ใกล้วัตถุไปที่กำลังขยายต่ำสุด ควรเริ่มต้นส่องดูตัวอย่างส่วนหยาบก่อนค่อยดูส่วนละเอียด โดยเริ่มจากมุมหนึ่งแล้วค่อยๆ หมุนจานไปรอบๆ จนสามารถดูวัตถุบได้ทั้งหมด หากส่วนไหนเห็นไม่ชัด อาจใช้เข็มเขี่ยหรือคีมคีบตัวอย่างนั้นแยกออกมาจากกลุ่ม และอาจหมุนเลนส์ใกล้วัตถุบกำลังขยายให้สูงขึ้น พร้อมกับปรับโฟกัสเพื่อให้เห็นชิ้นวัตถุบได้ชัดเจนขึ้น ขณะเดียวกันก็ใช้คีมคีบชิ้นวัตถุบ เพื่อทดสอบความแข็ง/อ่อนหรือลักษณะอื่นๆ ของวัตถุบได้ เมื่อดูตัวอย่างเสร็จไป 1 ครั้ง แล้วควรทำซ้ำอีก 2 ครั้ง เป็นอย่างน้อยเพื่อความแน่ใจ

หมายเหตุ: เทคนิคในการใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำสำหรับผู้เริ่มต้นการใช้กล้องจุลทรรศน์แบบ 2 ตา ควรฝึกมองด้วยตาทั้ง 2 ข้างโดยค่อยๆ ปรับระยะห่างของเลนส์ตา (จากที่เห็นเป็น 2 ภาพ) เคลื่อนเข้าหากันจนกระทั่งสามารถมองเห็นเป็นภาพเดียวควรเว้นระยะห่างระหว่างดวงตาและเลนส์

สำหรับมองวัตถุบ้างเล็กน้อยการกดกระบอกตาแบบแนบชิดกับเลนส์วัตถุหรือหลับตามองกล้องแค่ข้างเดียวจะทำให้ปวดศีรษะ

บทปฏิบัติการที่ 2.2 การวัดหาความหนาแน่นของอาหาร (Bulk density)

หลักการ

ความหนาแน่นของสาร สามารถนำมาใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของวัตถุดิบ ขนาดของอาหารและสิ่งปลอมปนได้ หากผู้วิเคราะห์มีความชำนาญและรู้ส่วนประกอบทางโภชนาการของอาหารแต่ละชนิด เช่น รูปร่าง สี ขนาด ความนุ่ม ความแข็ง เนื้อ กลิ่นและอื่นๆ หากวัตถุดิบอาหารสัตว์หรืออาหารมีการปลอมปน ความหนาแน่นจะเปลี่ยนไปโดยอาจจะสูงขึ้นหรือต่ำลงก็ได้

อุปกรณ์

1. กระบอกลอย (Cylinder) ขนาด 1,000 มิลลิลิตร
2. เครื่องชั่งตวงวัด 1 ตำแหน่ง
3. ช้อนตักอาหาร
4. ไม้บรรทัด
5. ถังพลาสติก
6. ถาดอะลูมิเนียม

วิธีวิเคราะห์

1. เทอาหารลงบนถาด คลุกเคล้าอาหารให้เข้ากันได้ดี
2. ใช้ช้อนตักอาหารใส่ในกระบอกลอยที่สะอาดและแห้งจนกระทั่งถึงขีดบอกถึงปริมาตร 1000 มล. เกลี่ยอาหารให้เสมอกัน ห้ามใช้ช้อนกดอาหาร หรือเอียง Cylinder หรือเขย่าอาหารโดยเด็ดขาด จากนั้นเทอาหารออกจากกระบอกลอยใส่ถังพลาสติกที่ทราบน้ำหนักแล้ว
3. ชั่งน้ำหนักของอาหารที่หักน้ำหนักถังพลาสติกและบันทึกข้อมูล
4. ทำ 3 ซ้ำ ไม่ควรใช้ตัวอย่างอาหารชุดเดิมยกเว้นในกรณีที่ตัวอย่างมีจำกัดแล้วนำไปคำนวณตามสูตร

การคำนวณ

$$\text{ความหนาแน่น (Bulk density)} = \frac{B}{A}$$

$$B = \text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}$$

$$A = \text{ปริมาตรกระบอกลอยที่ใช้วัด (เช่น 1 ลิตร, 0.5 ลิตร)}$$

บทปฏิบัติการที่ 3 การวิเคราะห์หาความชื้นและเถ้าในอาหารสัตว์ (Moisture and Ash)

3.1 การวิเคราะห์หาความชื้น

หลักการ

การวิเคราะห์หาความชื้นในอาหารสัตว์ มีวิธีการวิเคราะห์ได้หลายวิธี แต่ละวิธีมีความยากง่าย และมีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกันไป บางวิธีทำการวิเคราะห์ได้รวดเร็ว แต่ขาดความแม่นยำ บางวิธีแม่นยำแต่วิธีการยุ่งยาก และบางวิธีใช้อุปกรณ์มีราคาแพง การวิเคราะห์หาความชื้นสามารถแบ่งออกกว้างๆ ได้ 4 วิธีด้วยกัน ดังนี้

1. การอบแห้ง (Indirect Distillation or Drying Methods)

วิธีการนี้เป็นการหาน้ำหนักของน้ำที่หายไป โดยใช้ความร้อนในการระเหยน้ำออกไป ดังนั้น ความชื้นที่ได้โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้ไม่ใช่ค่าความชื้นที่แท้จริงของอาหาร แต่เป็นค่าโดยประมาณเท่านั้น ทั้งนี้เนื่องจากสาเหตุหลายประการที่ทำให้การวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้มีค่าความคลาดเคลื่อน ดังนี้

ก. อาหารที่มีไขมันน้อยๆ เช่น ไขมันที่ระเหยได้ (volatile oils) จะถูกระเหยออกไปจากอาหาร ดังนั้น หากอาหารมีไขมันประเภทนี้เป็นส่วนประกอบอยู่มาก ก็จะทำให้การวิเคราะห์หาความชื้นโดยวิธีนี้ได้ค่าออกมาสูงกว่าที่ควรจะเป็น จึงทำให้ผลที่ได้ออกมาคลาดเคลื่อน

ข. ลักษณะของน้ำที่ประกอบอยู่ในอาหาร โดยเฉพาะอาหารพวกเมล็ดธัญพืชจะอยู่ในรูปของน้ำอิสระ (free water) และน้ำไม่อิสระ โดยเกาะกันอยู่กับสารประกอบอื่นๆ (bound water) เช่น โปรตีน โดยปกติที่น้ำอยู่ในรูปอิสระนั้นมักจะโดนความร้อนทำให้ระเหยออกจากอาหารได้ง่าย เนื่องจากอัตราการระเหยของน้ำชนิดนี้จะสูงขึ้นตามอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น ดังนั้น ในการวิเคราะห์หาความชื้น โดยวิธีนี้จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องใช้อุณหภูมิให้คงที่ตลอดในการวิเคราะห์ ส่วนน้ำที่ไม่อิสระนั้น ทำให้ระเหยออกด้วยความร้อนกระทำได้ยาก

ค. อาหารที่มีน้ำตาลประกอบอยู่สูง ถ้าให้ความร้อนเกิน 70°C ก็จะทำให้น้ำตาลไหม้หรือสูญสลายได้ ดังนั้น อาหารเหล่านี้จึงไม่สามารถใช้วิธีการแบบ Direct heating method ในการวิเคราะห์หาความชื้นได้ จะต้องใช้วิธีการแบบ vacuum heating method คือ ใช้ความดันเข้ามาช่วยในการลดอุณหภูมิลงให้เหลือประมาณ 70°C

ง. อาหารที่มีผงฟู (Baking powder) ประกอบอยู่ ถ้าใช้ความร้อนวิเคราะห์หาความชื้นก็จะทำให้ผลที่ได้ออกมาสูงกว่าความเป็นจริง เนื่องจากความร้อนจะทำให้ผงฟูสูญสลายหายไปเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ดังนั้นการวิเคราะห์หาความชื้นของอาหารประเภทนี้จำเป็นจะต้องใช้การลดความดันเข้ามาช่วย โดยใช้อุณหภูมิห้องและใช้เวลาในการวิเคราะห์มากขึ้น

2. การกลั่นลำดับส่วน (Direct distillation methods)

เป็นการวิเคราะห์หาความชื้นโดยใช้สารเคมีที่มีจุดเดือดสูงกว่า แต่มีความถ่วงจำเพาะต่ำกว่าน้ำ เช่น โทลูอีน (Toluene) เฮปเทน (heptane) และไซเลน (xylene) เป็นต้น วิธีนี้ได้ผลแม่นยำ ทั้งนี้เนื่องจากไขมันที่ระเหยได้ (volatile oils) จะรวมอยู่ในชั้นของสารเคมีที่ใช้ ซึ่งจะแยกออกจากชั้นของน้ำอย่างชัดเจน แต่มีข้อเสียคือ ราคาอุปกรณ์และสารเคมีแพง

3. การใช้เครื่องวัดความชื้นไฟฟ้า (Electric moisture meter)

เป็นการวิเคราะห์หาความชื้นแบบวัดความต้านทาน (resistance) ความถี่ (frequency) และ di-electrics properties ของน้ำที่มีอยู่ในอาหาร เครื่องมือชนิดนี้สามารถวัดความชื้นของตัวอย่างได้รวดเร็วมาก มีความคลาดเคลื่อนเพียง $\pm 1\%$ เท่านั้น จึงเหมาะที่จะนำมาใช้วัดความชื้นของเมล็ดธัญพืชในโรงงาน โรงสี และยุ้งฉางใหญ่ๆ เพราะสะดวกไม่ยุ่งยาก

4. วิธีการทางเคมี (Chemical method)

เป็นการวิเคราะห์หาความชื้นโดยใช้สารเคมีต่างๆ เข้ามาทำปฏิกิริยากับน้ำ เช่น วิธีของ Karl Fischer โดยใช้หลักการของ nonstoichiometric reaction ของน้ำกับไอโอดีน และ sulphur dioxide ในสารละลาย pyridinemethanol การวิเคราะห์วิธีนี้เหมาะสำหรับใช้หาความชื้นในตัวอย่างอาหารที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบในปริมาณต่ำๆ

หมายเหตุ : สำหรับในห้องปฏิบัติการอาหารสัตว์นี้ใช้วิธีวิเคราะห์แบบ Drying method

วิธีวิเคราะห์หาความชื้น โดยวิธี Drying method

หลักการ

การวิเคราะห์หาความชื้นแบบ Drying methods นั้น เป็นที่นิยมกันมาก เพราะเป็นวิธีการง่าย สะดวก ค่าใช้จ่ายถูกและไม่เสียเวลามาก ในการวิเคราะห์แต่ละตัวอย่างควรทำอย่างน้อย 2-3 ซ้ำ เพื่อเปรียบเทียบผลดู ถ้าผลออกมาไม่ถูกต้องใกล้เคียงกัน ควรทำการทดลองใหม่

อุปกรณ์

1. เตาอบแห้ง (Drying oven)
2. จานอลูมิเนียม (Aluminium dishes)
3. โถอบแห้ง (Desiccator)
4. คีมสำหรับจับจานอลูมิเนียม (Tong)

วิธีวิเคราะห์

1. เตรียมจานอลูมิเนียมที่ล้างสะอาดแล้ว นำมาอบที่อุณหภูมิ 100°C นาน 2 ชั่วโมง นำออกมาจากเตาอบ ทิ้งให้เย็นก่อนจะนำไปเก็บไว้ในโถอบแห้งจนกระทั่งต้องการใช้ จึงนำออกมา ทำเครื่องหมาย ชั่งน้ำหนักจานเปล่า และบันทึกข้อมูล (ค่า C)
2. บดตัวอย่างอาหารที่ใช้ในการวิเคราะห์ให้มีขนาดเล็ก เท่าที่จะทำได้
3. ชั่งน้ำหนักอาหารประมาณ 2-3 กรัม ใส่ในจานอลูมิเนียมที่ทราบน้ำหนักแน่นอนแล้ว บันทึกข้อมูล (ค่า A)
4. นำจานอลูมิเนียมไปอบในเตาอบที่อุณหภูมิ $100^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ นาน 24 ชั่วโมง
5. นำจานอลูมิเนียมออกจากเตาอบ แล้วทิ้งให้เย็นในโถอบแห้ง
6. เมื่อเย็นแล้วนำมาชั่งน้ำหนัก บันทึกข้อมูล (ค่า B)

การคำนวณ

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

$$A = \text{น้ำหนักจานอลูมิเนียม + ตัวอย่างก่อนการอบ}$$

$$B = \text{น้ำหนักจานอลูมิเนียม + ตัวอย่างหลังการอบ}$$

$$C = \text{น้ำหนักจานอะลูมิเนียมเปล่า}$$

$$W = \text{น้ำหนักของ ตัวอย่างที่ใช้เริ่มต้นวิเคราะห์ (A-C)}$$

$$\% \text{ สิ่งแห้ง (dry matter)} = 100 - \% \text{ ความชื้น}$$

หมายเหตุ

1. การชั่งตัวอย่างอาหารเพื่อนำไปวิเคราะห์หาความชื้น และเพื่อการวิเคราะห์อื่นๆ จะต้องชั่งพร้อมๆ กัน และเมื่ออุณหภูมิเปลี่ยนไป ความชื้นของอากาศในห้องชั่งก็เปลี่ยนไป เป็นเหตุให้

ปริมาณอาหารที่จะหาความเปลี่ยนแปลงไปด้วย การวิเคราะห์หาความขึ้นควรทำทีเดียว 3 ซ้ำ เพื่อกันความผิดพลาด เพราะถ้าทำ 2 ซ้ำ เช่น การวิเคราะห์อื่นๆ เมื่อค่าที่ได้ระหว่าง 2 ซ้ำนี้แตกต่างกันมากจนไม่สามารถยอมรับได้ ก็ไม่สามารถนำไปใช้ในการคำนวณค่าการวิเคราะห์อื่นๆ ได้ เป็นเหตุให้ต้องทำการวิเคราะห์อื่นๆ ใหม่หมดด้วย

2. การอบที่อุณหภูมิใดก็ตาม นับระยะเวลาการอบจากจุดที่ความร้อนของตู้อบขึ้นถึงอุณหภูมิดังกล่าว

3. ไม่ควรใส่ตัวอย่างที่มีความชื้นสูงกว่า เข้าไปในตู้อบที่มีตัวอย่างความชื้นต่ำ ซึ่งอบได้ที่แล้ววางอยู่

4. เครื่องชั่งสมัยใหม่สามารถปรับค่าของน้ำหนักภาชนะเช่นจานอะลูมิเนียมหรือปิกเกอร์เป็น 0 ได้ ดังนั้นค่า W จึงไม่จำเป็นต้องคำนวณจาก $(A-C)$

การใช้โอบแห้ง

โอบแห้ง (Desiccator) คือ ภาชนะที่มีฝาปิด ทำจากแก้ว, พลาสติก หรือโพลีเมอร์ อื่นๆ โดยใช้สารเคมีที่เหมาะสมสำหรับการดูดความชื้นวางอยู่ด้านล่างของแผ่นตะแกรงเรียบที่มีช่องถ่ายเทอากาศ เพื่อทำอากาศที่อยู่ภายในแห้งอยู่เสมอ เมื่อนำตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์ออกจากเตาเผาหรือตู้อบแล้วมาใส่ไว้ในโอบแห้ง ปล่อยให้เย็นให้เย็น อากาศภายในโอบที่แห้งอยู่แล้วจะป้องกันไม่ให้ตัวอย่างที่ทิ้งให้เย็นดูดความชื้นเข้าไป ทำให้เราหาน้ำหนักตัวอย่างได้ถูกต้องแม่นยำ ซึ่งถ้าหากเราทิ้งเอาไว้ภายนอกโอบแห้ง ตัวอย่างก็จะดูดความชื้นเข้าไปทำให้ค่าน้ำหนักเปลี่ยนแปลงไป

สารดูดความชื้น (Desiccant) คือ สารเคมีที่สามารถดูดความชื้นจากอากาศรอบๆ ได้ดี และรวดเร็ว โดยมักจะใส่ไว้ข้างล่างของโอบแห้ง สารเคมีที่ใช้เป็นสารดูดความชื้น มีดังนี้

1. ซิลิกาเจล (Silica gel) เป็นสารดูดความชื้นที่นิยมใช้ โดยอาศัยคุณสมบัติการเปลี่ยนสีเป็นตัวบ่งบอกสภาพการใช้งาน กล่าวคือ ในขณะแห้ง silica gel จะมีสีน้ำเงินเข้ม และเมื่อมีความชื้นสีน้ำเงินจะจางลง จนกระทั่งดูดความชื้นจนอิ่มตัวเป็นสีชมพูอมม่วง ทั้งนี้สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ โดยอบไล่ความชื้นออกที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ซึ่งเมื่อแห้งแล้วจะเปลี่ยนสีกลับเป็นสีน้ำเงินเช่นเดิม

2. Drierite คือ anhydrous calcium sulphate ชนิดพิเศษที่มีโครงสร้างเป็นรูพรุนจำนวนมาก และมีความสามารถในการรวมตัวกับน้ำสูง สีเป็นกลาง (neutral) สามารถทำให้แห้งใหม่โดยใช้ความร้อน $235^{\circ}\text{C} - 250^{\circ}\text{C}$

3. Fused calcium chloride ปกติใช้ขนาด 4-8 mesh มีคุณสมบัติเป็นสารดูดความชื้นค่อนข้างต่ำจึงไม่นิยมใช้

4. Magnesium perchlorate และ phosphorous pentoxide สารดูดความชื้นทั้ง 2 ชนิดนี้ มีประสิทธิภาพในการดูดความชื้นดีมาก แต่มีราคาแพง และ phosphorous pentoxide ไม่สะดวกในการใช้จึงไม่นิยมใช้

วิธีใช้โอบแห้ง

ก่อนใช้โอบแห้งควรทาสารที่ช่วยในการหล่อลื่น และช่วยให้ฝาปิดสนิท เช่น ซีลิ่ง silicone หรือ lubriseal (ซีลิ่งที่ใช้สำหรับหล่อลื่นโดยเฉพาะ) ที่ขอบของฝา และตัวโอบเพื่อสะดวกในการเปิดปิด และเมื่อเปิดฝาแล้ว ไม่ควรวางฝาด้านที่ขึงด้วยสารหล่อลื่นคว่ำลงบนโต๊ะ เพราะจะทำให้ติดเศษฝุ่นและสกปรกได้ง่าย

เมื่อนำตัวอย่างที่ร้อนเข้าโอบแห้งแล้ว ควรจะหมุนวาล์วเปิดที่ด้านบนของฝาเพื่อระบายอากาศที่ร้อนของโอบแห้ง ไม่ให้อากาศที่ร้อนขยายตัว และมีแรงดัน ให้ฝาเปิดและตัวอย่างปลิวออกจากภาชนะบรรจุได้

โถอบแห้งที่ใช้ในห้องทดลอง ชนิดที่ทำจากพลาสติก หรือโพลิเมอร์ใช้ได้ผลดีเช่นกัน โถอบแห้งบางชนิดสามารถทำให้เป็นสุญญากาศได้โดยใช้ปั๊มแรงดัน (vacuum pump) โถพลาสติกปกติจะมีน้ำหนักเบาและสะดวกในการใช้ แต่มีข้อพึงระวังคือ ไม่ควรใส่ถ้วยกระเบื้อง (crucible) ที่ร้อนกว่า 140°C ในโถอบแห้งชนิดนี้ และไม่ควรร้างฝาของโถอบชนิดนี้ด้วยตัวอย่างแรง เช่น soda หรือ potash

สำหรับโถอบแห้งที่ใช้สุญญากาศ เวลาต้องการเอาตัวอย่างออกมาต้องใช้ความระมัดระวังโดยค่อยๆ หมุนปุ่ม stopcock เพื่อลดสุญญากาศอย่างช้าๆ เพราะถ้าหากให้อากาศเข้ามาโถอบแห้งอย่างรวดเร็ว จะทำให้ตัวอย่างหรือภาชนะที่มีน้ำหนักเบาหกกระเด็นจากภาชนะที่บรรจุได้

3.2 การวิเคราะห์เถ้าทั้งหมด (Total Ash)

หลักการ

ปริมาณเถ้าทั้งหมด (total ash) ในอาหารหรือวัตถุดิบอาหารสัตว์ คือ ส่วนที่เป็นสารอนินทรีย์ที่คงเหลือภายหลังจากสารอินทรีย์ถูกเผาไหม้หมดโดยทั่วไปได้แก่แร่ธาตุชนิดต่างๆ เช่นแคลเซียม ฟอสฟอรัส ฯลฯ เถ้าที่เหลืออยู่นี้ไม่จำเป็นที่จะอยู่ในลักษณะเดิมเสมอไปหรือในปริมาณเดิมที่พบในอาหาร เพราะบางส่วนอาจจะหายไป และบางส่วนอาจแปรสภาพ โดยการทำปฏิกิริยากับส่วนประกอบอื่นขณะเผาด้วยความร้อนสูง (550-600°C) โดยทั่วไป ปริมาณเถ้าที่พบในอาหารจะค่อนข้างคงที่สำหรับอาหารชนิดนั้น หากพบว่าปริมาณสูงกว่าปกติก็แสดงว่ามีการปลอมแปลงหรือเจือปน

อุปกรณ์

1. เบ้ากระเบื้อง (Porcelain or silica crucible)
2. โถอบแห้ง (Desicator)
3. เตาเผา (Muffle furnace)
4. ขวดวัดปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร (Volumetric flask)
5. กระบอกแก้วขนาด 250 มิลลิลิตร (Beaker)
6. กรวยกรอง (Filter funnel)
7. กระดาษกรองชนิดไม่มีเถ้า (Ashless filter paper – Whatman No. 40, 41, 42 or 44)

สารเคมี

1. กรดเกลือเข้มข้น (HCl Cone.)
2. กรดเกลือเจือจาง (HCl 10%)

1. วิธีวิเคราะห์ปริมาณเถ้าทั้งหมด

1. เเผาเบ้ากระเบื้องที่สะอาดและแห้งในเตาเผาที่อุณหภูมิ 550-600°C นาน 2 ชม. ปล่อยให้เย็นในโถอบแห้ง แล้วชั่งน้ำหนักและบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน (ค่า C)
2. ตักตัวอย่างอาหารประมาณ 2 กรัม ลงในเบ้ากระเบื้อง (ปกติจะเป็นตัวอย่างแห้งที่ได้จากการวิเคราะห์หาความชื้น) ชั่งน้ำหนักและบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน (ค่า A)
3. นำเบ้ากระเบื้องพร้อมด้วยตัวอย่างอาหารเข้าไปเผาในเตาเผาที่อุณหภูมิ 550-600°C ใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมง จนเถ้าเป็นสีขาว หรือสีเทาอ่อน

หมายเหตุ : ในกรณีที่เถ้าไม่เป็นสีขาว ซึ่งแสดงว่ายังมีสารคาร์บอนคงเหลืออยู่บ้างให้ร่อนตัวอย่างและเบ้ากระเบื้องเย็นลงแล้ว ให้หยดน้ำยาแอมโมเนียมคาร์บอเนต (10%) (หรือน้ำกลั่น) 2-3 หยด ลงบนเถ้า ปล่อยให้แห้งโดยเก็บในโถดูดความชื้น แล้วนำเข้าไปเผาต่อไปในเตาเผาจนได้เถ้าสีขาว

4. ใช้คีมคีบเข้ากระเบื้องจากเตาเผาไปทิ้งให้เย็นในโถอบแห้ง แล้วชั่งน้ำหนักโดยใช้เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง แล้วบันทึก (ค่า B)
5. นำตัวอย่างที่เสร็จแล้วไปวิเคราะห์หาธาตุที่ละลายในกรดและไม่ละลายในกรดตามขั้นตอนต่อไป

การคำนวณปริมาณเถ้าทั้งหมด

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

เมื่อ	A	=	น้ำหนักเข้ากระเบื้องที่เย็น + น้ำหนักตัวอย่างอาหาร
	B	=	น้ำหนักเข้ากระเบื้องที่เย็น + น้ำหนักเถ้าหลังเผา
	C	=	น้ำหนักเข้ากระเบื้องเปล่า
	W	=	น้ำหนักตัวอย่างแห้งที่ใช้ในการวิเคราะห์

$$\% \text{ เถ้าทั้งหมดในตัวอย่าง (Total ash)} = \% \text{ เถ้าทั้งหมดในตัวอย่างแห้ง} \times \% \text{ สิ่งแห้ง}$$

บทปฏิบัติการที่ 4 การวิเคราะห์เถ้าที่ละลายและไม่ละลายในกรด (Soluble ash; Acid insoluble ash)

วิธีวิเคราะห์

1. หยดน้ำกลั่น 2-3 หยด ลงในเบ้ากระเบื้องที่มีเถ้าที่ได้จากการวิเคราะห์ข้างต้นหาเถ้าทั้งหมด เพื่อให้เถ้าชื้น ไม่ปลิว
2. ถ่ายเถ้าจากเบ้ากระเบื้องลงในปิកเกอร์ขนาด 250 มล. ด้วยกรดเกลื่อเจือจาง 15 ml. แล้วใช้น้ำกลั่นร้อนล้างเถ้าที่ตกค้างจากเบ้ากระเบื้อง 2 ครั้ง โดยการล้างทุกครั้งให้เทน้ำลงในปิกเกอร์
3. เติมน้ำกลั่นลงในปิกเกอร์ ประมาณ 2/3 ของปิกเกอร์เติมกรดเกลื่อเข้มข้นลงไป 5 มล. โดยใช้กระบอกตวง (graduate or measuring cylinder)
4. นำสารละลายไปต้มให้เดือดช้าๆ โดยใช้ไฟอ่อน ระเหยน้ำให้เหลือประมาณ 50 มล. ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 2-3 ชม.
5. กรองใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 250 มล. โดยใช้กระดาษกรองที่ไม่มีเถ้า ใช้น้ำกลั่นร้อนล้างตะกอนจากปิกเกอร์ลงบนกระดาษกรอง โดยใช้แท่งแก้วคนที่มียางหุ้มช่วยในการเขี่ยตะกอนที่ติดข้างปิกเกอร์

หมายเหตุ: เก็บกระดาษกรองพัลลงในเบ้ากระเบื้องใบเดิมเพื่อนำไปหาเถ้าที่ไม่ละลายในกรดตามขั้นตอนต่อไป

6. เติมน้ำกลั่นลงในขวดวัดปริมาตรจนได้ปริมาตร 250 มล. เก็บตัวอย่างสารละลายในขวดที่ปิดฝาสนิทไว้ในตู้เย็น หรือในที่มืดและเย็นสำหรับที่จะนำไปวิเคราะห์หาแคลเซียมและฟอสฟอรัสในบทปฏิบัติการต่อไป

วิธีวิเคราะห์หาเถ้าที่ไม่ละลายในกรด (Acid insoluble ash)

1. นำตะกอนและกระดาษกรองไปใส่ในเบ้ากระเบื้องอันเดิมแล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 100°C นาน 12 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักและบันทึก (ค่า D)
2. นำเบ้ากระเบื้องไปเผาที่อุณหภูมิ 550-600°C นาน 2 ชั่วโมง ดำเนินการเช่นเดียวกับข้อ 3 ถึง 4 ในปฏิบัติการวิเคราะห์เถ้าทั้งหมด

การคำนวณ

$$\% \text{ เถ้าที่ไม่ละลายในกรด} = \frac{(D - E) \times 100}{W}$$

เมื่อ D = น้ำหนักเบ้ากระเบื้องที่เย็น + น้ำหนักตะกอนก่อนเผา

$$\begin{aligned}
 E &= \text{น้ำหนักเข้ากระเบื้องที่เย็น} + \text{น้ำหนักตะกอนหลังเผา} \\
 W &= \text{น้ำหนักตัวอย่าง (กระดาษกรอง+ตะกอน) ที่ใช้ในการวิเคราะห์} \\
 \% \text{ เถ้าที่ละลายในกรด} &= \% \text{ เถ้าทั้งหมดในตัวอย่างแห้ง} - \% \text{ เถ้าที่ไม่ละลายในกรด}
 \end{aligned}$$

บทปฏิบัติการที่ 5 การวิเคราะห์แคลเซียมและฟอสฟอรัส

5.1 การวิเคราะห์แคลเซียมโดยวิธีไทเทรต (Titration method)

หลักการ

การวิเคราะห์หาแคลเซียมหาได้โดยทำให้แคลเซียมตกตะกอนในรูปของเกลือออกซาเลต (Oxalate) ด้วยการเติมแอมโมเนียมออกซาเลต (Ammonium oxalate) ลงในตัวอย่างที่ละลายในกรดเกลือที่เจือจาง แล้วทำให้เป็นกลางโดยการเติมแอมโมเนีย (NH_4OH) ที่เจือจาง จากนั้นนำตะกอนที่ได้หลังการล้างแล้วมาละลายในกรดกำมะถันที่เจือจาง นำกรดออกซาเลตที่เกิดขึ้นไป (titrate) ด้วยน้ำยาด่างทับทิมมาตรฐาน (Standard permanganate solution) ดังสมการ



สารเคมี

1. กรดเจือจาง, HCl (1:3) : นำกรดเกลือ (36.5 – 38%) 50 ml. ผสมกับน้ำกลั่น 150 ml.
2. สารละลายแอมโมเนีย NH_4OH (1:1) : นำ NH_4OH (28 – 30%) 100 ml. ผสมกับน้ำกลั่น 100 ml.
3. แอมโมเนียเจือจาง NH_4OH (1:50) : นำ NH_4OH (28 – 30%) 10 ml. ผสมกับน้ำกลั่น 500 ml.
4. กรดกำมะถันเจือจาง (1:3) : H_2SO_4 20 ml. ผสมกับน้ำกลั่น 60 ml.
5. สารละลายอินดิเคเตอร์ Methyl red indicator : ละลาย Methyl red 0.5 g ใน ethanol 100 ml.
6. สารละลายด่างทับทิมมาตรฐาน (0.01N KMnO_4) ต้องเก็บไว้ในขวดสีน้ำตาลในที่มืด
7. สารละลายแอมโมเนียมออกซาเลตที่อิ่มตัว (Saturated $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ solution 4.2%)

อุปกรณ์

1. ปิเปต (Pipet) ขนาด 25 มล.
2. บีกเกอร์ (Beaker) ขนาด 250 มล.
3. บิวเรต (Burette) ขนาด 50 มล. หรือ ไมโครบิวเรต (Micro Burette) (เป็นสีขา เพื่อป้องกันแสงไม่ให้ทำปฏิกิริยาออกซิเดชัน)
4. กระดาษกรอง Whatman No. 40 หรือ 540
5. แ่งแก้วสำหรับคน
6. กระดาษอินดิเคเตอร์ ช่วง pH 5-6 และ 2-4

7. เตาไฟฟ้า

วิธีวิเคราะห์

1. นำตัวอย่างสารละลายที่ได้จากการเตรียมในบทปฏิบัติการเรื่องเถ้าที่ละลายในกรด
2. เขย่าสารละลายตัวอย่างอยู่ใน Volumetric flask หรือขวดพลาสติกเก็บตัวอย่างขนาด 250 ml. ให้เข้ากันแล้วไปเปิดตัวอย่าง มา 25 ml. ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 250 ml.
3. เติมน้ำกลั่น เพื่อทำให้เจือจางจนได้ปริมาตร 100 ml. แล้วหยด Methyl red 2 หยด (เตรียม blank ไปพร้อมกันด้วย)
4. หยด NH_4OH (1+1) ทีละหยด จนกระทั่ง pH 5.6 (สามารถสังเกตได้จากสี จะมีสีส้มปนน้ำตาล (brownish-orange colour) หรือใช้กระดาษอินดิเคเตอร์วัด pH) ถ้า pH สูงเกินไป ให้หยด HCl (1+3) ลงไป จนกระทั่งเปลี่ยนเป็นสีส้มปนน้ำตาล
5. หยด HCl (1+3) 2 หยด สีส้มจะเปลี่ยนเป็นสีชมพู (pH 2.5-3.0)
6. เติมน้ำกลั่นลงในบีกเกอร์จนได้ปริมาตร 150 ml. นำไปต้มให้ร้อน แล้วค่อยๆ เติมสารละลายที่อิมตัวของแอมโมเนียมออกซาเลต (Ammonium oxalate) 4.2% ที่ร้อน 10 ml. คนให้ทั่วอยู่เสมอ ขณะที่กำลังเติมอยู่
7. ถ้าสีชมพูเปลี่ยนเป็นสีส้มหรือสีเหลือง หยด HCl (1+3) ทีละหยด จนกระทั่งเปลี่ยนเป็นสีชมพูอีกครั้งหนึ่ง
8. ตั้งทิ้งไว้ 1 คืน เพื่อให้ตกตะกอน แล้วปิดฝาด้วยจานแก้ว (Watch glass)
9. นำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 40 แล้วล้างตะกอนด้วย NH_4OH (1:50)
10. แสงกระดาษกรองให้เป็นรูด้วยแท่งแก้ว จากนั้นละลายด้วยน้ำกลั่นที่ร้อนให้ตะกอนทั้งหมดผ่านกรวยลงในบีกเกอร์ใบเดิม
11. ล้างกระดาษกรองด้วย H_2SO_4 ที่เจือจาง ให้ผ่านลงในบีกเกอร์ จากนั้นใช้น้ำกลั่นที่ร้อนล้างกระดาษกรองอีกครั้งหนึ่ง
12. เติมน้ำกลั่นลงในบีกเกอร์ให้ได้ปริมาตร 120 ml. แล้วเติมกรด H_2SO_4 เข้มข้น 5 ml.
13. นำไปต้มให้ร้อนที่อุณหภูมิ 70°C แล้วนำมาไตเตรตกับสารละลายต่างทาบิมาตรฐาน (Std. 0.01N KMnO_4) ทีละหยด จนถึง end point ซึ่งจะมีสีชมพูอ่อน

การคำนวณ

$$\begin{aligned}
 1 \text{ ml. ของ } 1\text{N } \text{KMnO}_4 &= 0.02004 \text{ กรัม Ca} \\
 \% \text{Ca ในตัวอย่างแห้ง} &= \frac{(S - B) \times N \times 0.02004 \times \text{DF} \times 100}{W}
 \end{aligned}$$

เมื่อ S = ปริมาณของสารละลายต่างทาบิมาตรฐานที่ใช้ไตเตรตตัวอย่าง (มล.)

B	=	ปริมาณของสารละลายต่างทึบที่มาตรฐานที่ใช้ไตรเตรท blank (มล.)
N	=	ความเข้มข้นเป็นนอร์มอล (Normality) ของสารละลายต่างทึบที่มาตรฐาน (KMnO ₄)
DF	=	ค่าเจือจาง (dilution factor) (ในบทปฏิบัติการนี้เท่ากับ 10)
W	=	น้ำหนักตัวอย่าง (น้ำหนักของตัวอย่างแห้งที่ใช้สำหรับหาเถ้า Ash)

5.2 การวิเคราะห์ฟอสฟอรัส โดยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometry method)

หลักการ

จากการเผา ฟอสฟอรัสจะถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของสารออร์โธฟอสเฟตหรือเรียกว่าฟอสเฟตละลายน้ำ (orthophosphate) ซึ่งจะจับกับวานาโดมอลิบเดต (vanado molybdate) เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน (complex form) สีเหลือง สามารถวัดปริมาณได้ โดยอาศัยความเข้มข้นของสี

อุปกรณ์

1. Graduated test tube ขนาด 15 ml. พร้อมฝาปิด จำนวน 6 หลอด หรือขวดวัดปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 15 ml.
2. ขวดวัดปริมาตร ขนาด 1 ลิตร และขนาด 100 ml.
3. ปิเปต ขนาด 25 ml.
4. Graduated Pipette ขนาด 10 ml.
5. เครื่อง Spectrophotometer

สารเคมี

1. การเตรียมสารละลายโมลิบโดวานาเดต (Molybdovanadate reagents) เตรียมโดย
 - ก. นำแอมโมเนียมโมลิบเดต ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 20 กรัม ละลายในน้ำกลั่นร้อน 200 ml. (solution A)
 - ข. นำแอมโมเนียมเมท้าวานาเดต (NH_3VO_3) 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นร้อน 125 ml. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเติมกรดเปอร์คลอริก (HClO_4) 70% 225 ml. (solution B)
 - ค. ค่อยๆ เท solution A ลงใน solution B อย่างช้าๆ พร้อมกับคนให้เข้ากัน แล้วปรับให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น
2. การเตรียมสารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัส (Phosphorus standard stock solution) ทำเช่นเดียวกับการเตรียมสารละลายมาตรฐานของโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Standard solution potassium dihydrogen phosphate) เตรียมโดย
 - ก. ละลายโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ที่บริสุทธิ์ และแห้ง หนัก 0.4394 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วทำให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร
 - ข. จากนั้น pipet มา 25 ml. ของสารละลายในข้อ ก. มาทำให้เจือจางลงอีก โดยเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร ฉะนั้น

1 ml. ของ KH_2PO_4 จะมี P	=	0.0025 มิลลิกรัม
2 ml. ของ KH_2PO_4 จะมี P	=	0.0050 มิลลิกรัม
3 ml. ของ KH_2PO_4 จะมี P	=	0.0075 มิลลิกรัม

4 ml. ของ KH_2PO_4 จะมี P = 0.0100 มิลลิกรัม

วิธีวิเคราะห์

เตรียมกราฟมาตรฐานของฟอสฟอรัส (Standard curve for phosphorus) โดยมีขั้นตอนดังตารางต่อไปนี้

No. Test tube	Std. Solution (ml.)	Molybdo. (ml.)	น้ำกลั่น	รวม
1, 1	1	2	7	10
2, 2	2	2	6	10
3, 3	3	2	5	10
4, 4	4	2	4	10
5, 5	5	2	3	10
6, 6	6	2	2	10
7, 7	7	2	1	10
8, 8	8	2	-	10
blank	-	2	8	10

การเตรียมตัวอย่าง (สารละลายตัวอย่างเถ้าที่ละลายในกรดจากบทปฏิบัติการที่ 4)

1. pipet soluble ash จาก Volumetric flask ที่ได้จากการเผา และใช้ละลายเถ้า (ปริมาณแล้วแต่ชนิดของตัวอย่าง) ใส่ลงใน test tube ขนาด 15 ml.
2. pipet ammonium molybdovanadate ใส่ใน test tube 2 ml.
3. pipet น้ำกลั่น ใส่ใน test tube เมื่อรวมกับ standard solution และ ammonium molybdovanadate แล้วจะได้ปริมาตร 10 ml.
4. เขย่า test tube ให้ตัวอย่างเข้ากันดี ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที เพื่อให้เกิดสีเหลือง แล้วนำไปอ่านค่า การดูดกลืนแสงจากเครื่อง spectrophotometer ที่ $400 \mu\text{m}$ โดยใช้ blank เป็นตัวเปรียบเทียบมาตรฐาน บันทึกค่าการดูดกลืนแสง (Abs)
5. ถ้าตัวอย่างมีฟอสฟอรัสอยู่สูงหรือต่ำเกินไป (จะต้องให้อยู่ในช่วงของ standard curve) เราสามารถปรับความเข้มข้นของฟอสฟอรัสให้เหมาะสมได้ โดยการทำให้เจือจางหรือเข้มข้นขึ้นก็ได้ ซึ่งสามารถประเมินค่าอย่างง่ายและรวดเร็วโดยการเปรียบเทียบสีของตัวอย่างที่ต้องการกับสีของสารละลายมาตรฐานหมายเลข 1- 8 หากมีสีที่จางกว่าหมายเลข 1 หรือเข้มกว่าหมายเลข 8 ควรเตรียมใหม่

การคำนวณ

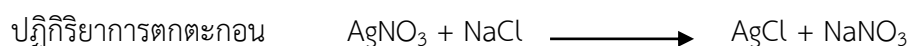
$$\text{mg. P} = b(\text{Abs.sample}) - b(\text{Abs.std.}) + \text{mg.P std.}$$

$$\% \text{ P in sample} = \frac{\text{mg. P} \times 10^{-3} \times 250 \times 100}{W \times \text{dilution factor}}$$

บทปฏิบัติการที่ 6 การวิเคราะห์หาปริมาณเกลือในอาหารสัตว์

หลักการ

การวิเคราะห์เกลือหรือโซเดียมคลอไรด์นี้ได้ดัดแปลงมาจากวิธี Mohr Method ซึ่งมีหลักการดังนี้ คือ ใช้ซิลเวอร์ไนเตรท (AgNO_3) ทำปฏิกิริยากับโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) โดยใช้โปตัสเซียมไดโครเมท (K_2CrO_4) เป็นอินดิเคเตอร์



อุปกรณ์

1. Erlenmeyer flask ขนาด 250 ml.
2. Beaker ขนาด 250 ml.
3. Burette และขาตั้ง
4. Pipette 2 ml., 10 ml., 20 ml.
5. กรวยกรองและกระดาษกรอง Whatman No.4

สารเคมี

1. สารละลายโปตัสเซียมไดโครเมท 10% (indicator) : ชั่งโปตัสเซียมไดโครเมท 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 ml.
2. สารละลายมาตรฐานซิลเวอร์ไนเตรท (AgNO_3) 0.1 N
 - 2.1 ชั่งซิลเวอร์ไนเตรท 1.7 กรัม (หลังอบแห้งแล้ว 2 ชม.) ละลายในน้ำกลั่น 100 ml. ใน Volumetric flask แล้วเก็บในขวดสีชาเพื่อทำการ standardize
 - 2.2 ชั่งเกลือ (AR grade) 0.15 กรัม ลงใน flask ขนาด 125 ml. เติมน้ำกลั่น 100 ml. เขย่าให้ละลายเติม 10% โปตัสเซียมไดโครเมท ประมาณ 2 ml. แล้วนำไปไตเตรทกับซิลเวอร์ไนเตรทที่เตรียมไว้ใน 2.2.1 ทำการไตเตรทจนกระทั่งสีของอินดิเคเตอร์เปลี่ยนสีจากสีเหลืองเป็นสีแดง แสดงว่าเป็นจุด End point (ทำการวิเคราะห์อย่างน้อย 3 ครั้ง)

การคำนวณ

$$\text{Normality ของ } \text{AgNO}_3 = \frac{(\text{g) NaCl} \times (\% \text{ ความบริสุทธิ์ของเกลือ}) \times 10}{58.44 \times (\text{ml.}) \text{AgNO}_3}$$

หมายเหตุ : 1 ml. 0.1 N AgNO_3 ประมาณ 0.05844 กรัม

การตรวจสอบความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์เกลือทำดังนี้

1. ทำ standard เกลือ 2 ชุด
ชุดที่ 1 มีเกลือ 2.3 และ 4% สำหรับตรวจปลาล์น
ชุดที่ 2 มีเกลือ 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5% สำหรับตรวจอาหารทั่วไป
2. ดูดสารละลาย 4.1 มาอย่างละ 1 ml. สารละลายอินดิเคเตอร์ K_2CrO_4 10% 2 ml. เติมน้ำกลั่นให้ได้ประมาณ 100 ml. แล้วนำไปไทเทรต ทำ blank ด้วย โดยไม่ต้องใส่สารละลายมาตรฐานเกลือโดยใช้น้ำกลั่นแทน
3. ผลการวิเคราะห์

Std. เกลือ %	ml. ที่ใช้วิเคราะห์	ml. standard $AgNO_3$ ที่ใช้	% เกลือที่วิเคราะห์ได้	% Recovery
Blank	-	0.15	-	-
2	1	3.50	2.00	100
3	1	5.10	2.96	98.566
4	1	6.80	3.99	99.31
0.2	1	0.40	0.149	74.50
0.3	1	0.60	0.269	89.60
0.4	1	0.75	0.358	89.60
0.5	1	0.90	0.448	89.60

$AgNO_3$ standard = 0.1022 N

หมายเหตุ จากผลการตรวจสอบครั้งนี้พบว่าค่าวิเคราะห์ที่แม่นยำมีเกลืออยู่ประมาณ 0.001-0.005 กรัม ซึ่งจะทำให้การวิเคราะห์ได้ผลดี

การวิเคราะห์เกลือในอาหาร

1. ชั่งปลาล์น 0.5 กรัม อาหาร 2-3 กรัม แล้วถ่ายลงในปิเคอร์ขนาด 250 ml. (ให้ทำ Blank ด้วย โดยไม่มีตัวอย่าง)
2. เติมน้ำร้อน 50 ml. คนให้เกลือละลาย 1 นาที แล้วนำไปกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 4
หมายเหตุ : ตัวอย่างที่เป็นแป้งควรหลีกเลี่ยงการใช้น้ำร้อนให้ใช้น้ำอุณหภูมิห้องแทน
3. ล้างปิเคอร์และตะกอนด้วยน้ำร้อนครั้งละ 20 ml. (10-15 ml.) อย่างน้อย 3 ครั้ง แล้วปรับให้ได้ปริมาตร 100 ml.

4. นำน้ำกรองไปไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐาน AgNO_3 โดยเติมอินดิเคเตอร์ K_2CrO_4 2 ml. (โดยใช้ปิเปต) แล้วสังเกตสารละลายเปลี่ยนสี จากสีเหลืองเป็นสีแดง

การคำนวณ

$$\% \text{เกลือ} = \frac{(A-B) \times N \times 5.845}{W}$$

- A = ml. ของ AgNO_3 ที่ใช้ไตเตรทตัวอย่าง
 B = ml. ของ AgNO_3 ที่ใช้ไตเตรท blank
 N = Normality ของ AgNO_3
 W = น้ำหนักของตัวอย่างที่วิเคราะห์

บทปฏิบัติการที่ 7 การวิเคราะห์โปรตีนหยาบ (โดยวิธี Kjeldahl Method)

โดย ดร. แววรี บุญเทียม และ ดร.วรุณ แก้วพิลา

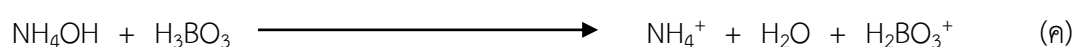
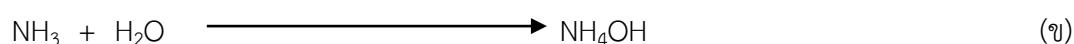
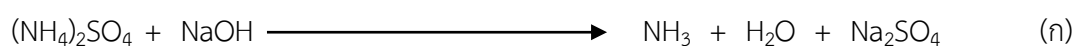
1. หลักการ (Principle)

การวิเคราะห์โปรตีนในห้องปฏิบัติการถูกค้นพบโดย Dane Johan Kjeldahl ชาวเดนมาร์ก ในช่วงปี ค.ศ. 1880 จึงเรียกวิธีการวิเคราะห์ดังกล่าวว่า Kjeldahl Method ซึ่งเป็นการหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่มีอยู่ในตัวอย่างที่ต้องการทดสอบทั้งส่วนที่เป็นไนโตรเจนที่มาจากกรดอะมิโน รวมกับส่วนของไนโตรเจนที่ไม่ได้มาจากกรดอะมิโน (non protein nitrogen) ดังนั้น ค่าที่ได้จากการวิเคราะห์จึงต้องนำไปคำนวณกลับเป็นปริมาณโปรตีน โดยการนำไปคูณกับค่าแฟคเตอร์ของโปรตีน ซึ่งในอาหารสัตว์จะมีค่าแฟคเตอร์ของโปรตีนเท่ากับ 6.25 โดยทั่วไปการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธีการดังกล่าวต้องทำการย่อยโปรตีนในตัวอย่างด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (H_2SO_4) เพื่อเปลี่ยนไนโตรเจนที่มีในอาหารให้กลายเป็นเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ก่อนนำไปทำปฏิกิริยากับด่างด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เพื่อกลั่นก๊าซแอมโมเนีย (NH_3) ออกมา ซึ่งก๊าซดังกล่าวจะเข้าทำปฏิกิริยากับกรด บอริก (H_3BO_3) ที่มีจำนวนมากเกินพอเพื่อให้เกิดเป็นแอมโมเนียมบอเรต จากนั้นจึงไทเทรตด้วยกรดไฮโดรคลอริก และคำนวณหาปริมาณโปรตีน ซึ่งเมื่อคูณกับค่าแฟคเตอร์ของโปรตีนแล้ว จะทำให้ทราบค่าโปรตีนโดยประมาณในตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ วิธีนี้สามารถแบ่งขั้นตอนการวิเคราะห์ได้ 3 ขั้นตอน คือ การย่อย (digestion) การกลั่น (distillation) และการไทเทรต (titration) โดยมีรายละเอียดดังนี้

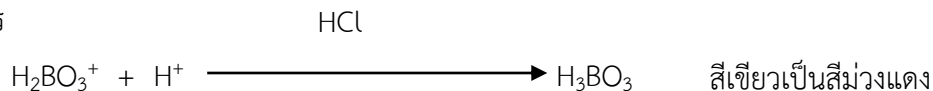
1.1 การย่อย (digestion) เป็นการนำตัวอย่างที่ต้องการทดสอบมาทำการย่อยด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (Conc. H_2SO_4) ภายใต้สภาวะที่มีอุณหภูมิสูงที่อุณหภูมิ 350 องศาเซลเซียส และเติมสารเร่งปฏิกิริยา (catalyst) เช่น คอปเปอร์ซัลเฟต (CuSO_4) โซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_4) และเฟอร์รัสซัลเฟต (FeSO_4) เป็นต้น เพื่อเร่งการเปลี่ยนไนโตรเจนที่มีอยู่ในอาหารทั้งหมดให้เป็นเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต (NH_4) $_2\text{SO}_4$ ดังสมการ



1.2 การกลั่น (distillation) เป็นการไล่ก๊าซแอมโมเนียออกจากแอมโมเนียมซัลเฟตโดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ที่มีฤทธิ์เป็นด่าง โดยก๊าซแอมโมเนียที่กลั่นออกมาจะทำปฏิกิริยากับกรดมาตรฐานที่มีจำนวนมากเกินพอ (บทปฏิบัติการนี้ใช้กรดบอริก) ดังสมการ



1.3 การไทเทรต (titration) เป็นการนำสารละลายบอริก ซึ่งจับกับก๊าซแอมโมเนียไว้มาทำการไทเทรตกับสารละลายมาตรฐาน (บทปฏิบัติการนี้ใช้กรดไฮโดรคลอริก) เพื่อนำไปคำนวณหาค่าไนโตรเจนทั้งหมดในอาหาร



จากนั้นนำปริมาณสารละลายมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการไทเทรต ไปคำนวณหาปริมาณไนโตรเจน แล้วนำไปคูณกับค่าแฟกเตอร์ของโปรตีนซึ่งมีค่าเท่ากับ 6.25 จะทำให้ทราบปริมาณโปรตีนรวม (crude protein) ในตัวอย่างที่ทำการทดสอบ

2. วัตถุประสงค์ (Objective)

1. เพื่อให้นักศึกษาทราบวิธีการและฝึกปฏิบัติวิเคราะห์โปรตีนในตัวอย่างอาหารสัตว์หรือวัตถุดิบอาหารสัตว์ได้
2. นักศึกษาทราบปริมาณโปรตีนในตัวอย่างอาหาร และนำข้อมูลไปพิจารณาคุณภาพของตัวอย่างอาหารได้

3. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

- 3.1 เครื่องชั่ง (analytical balance) ที่มีความละเอียด 0.0001 กรัม
- 3.2 Kjeldahl digestion flasks ขนาด 800 มิลลิลิตร
- 3.3 เครื่องย่อย (digestion apparatus)
- 3.4 เครื่องกลั่น (distillation apparatus)
- 3.5 ขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร
- 3.6 ปิเปตต์ (pipette) ขนาด 25 มิลลิลิตร
- 3.7 บิวเรตต์ (burette) พร้อมขาตั้ง (retort stand) สำหรับไทเทรตสารละลาย
- 3.8 ขวดฉีดน้ำกลั่น (wash bottle) ซึ่งภายในบรรจุน้ำกลั่น

4. สารเคมี (Reagent)

- 4.1 สารเร่งปฏิกิริยาผสม (catalyst mixture) ที่มีส่วนประกอบของ anhydrous sodium sulfate 20 ส่วน และ anhydrous copper sulfate 1 ส่วน
- 4.2 กรดซัลฟูริกเข้มข้น (ร้อยละ 95-98 สกัดส่วนโดยมวล)
- 4.3 สารละลายอินดิเคเตอร์ผสม โดยนำ methyl red 0.2 กรัม และ methylene blue 0.1 กรัม ละลายใน 95% เอทานอล ปรับปริมาตรด้วย 95% เอทานอล จนครบ 100 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน
- 4.4 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (ร้อยละ 45 โดยน้ำหนัก) โดยเตรียมสารละลาย NaOH 450 กรัม ด้วยน้ำกลั่นในบีกเกอร์ขนาดใหญ่ (ควรแช่น้ำเย็นเพื่อลดความร้อนที่เกิดขึ้นจากการ

ละลาย NaOH) โดยใช้แท่งแก้วคนเพื่อให้การละลายเกิดเร็วขึ้น เมื่อละลายหมดแล้วให้ทำการเจือจางจนได้ปริมาตร 1 ลิตร ใน flask ที่มีขีดบอกปริมาตรและนำสารละลายบรรจุในภาชนะที่มีฝาปิดมิดชิด

4.5 สารละลาย 4% Boric acid เตรียมโดยการตมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ให้ร้อน แล้วใส่กรดบอริก 4 กรัม ต้มต่อจนละลายหมด จากนั้นจึงทิ้งไว้จนสารละลายเย็นลงก่อนเติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

4.6 Standard 0.1 N HCl

4.7 ลูกแก้ว (glass beads)

5. ขั้นตอนการวิเคราะห์ (Procedure)

5.1 ชั่งน้ำหนักตัวอย่างอาหารที่บดละเอียดแล้ว หากเป็นวัตถุดิบจากปลาปนและกากถั่วชนิดต่างๆ ให้ใช้ปริมาณ 1-2 กรัม หากเป็นธัญพืชอื่นให้ใช้ปริมาณ 2-4 กรัม ลงบนกระดาษกรองที่ปราศจากไนโตรเจน (อาจใช้กระดาษกรอง Whatman 541™) พับกระดาษปิดตัวอย่างให้มิดชิด ก่อนนำไปใส่ใน Kjeldahl digestion flasks

5.2 เติมน้ำเร่งปฏิกิริยาผสม 2 กรัม และใส่ลูกแก้ว 2-3 เม็ด เพื่อป้องกันการกระเด็นอย่างแรง (bumping)

5.3 ค่อยๆ เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 25 มิลลิลิตร ลงใน Kjeldahl digestion flasks เขย่าขวดด้วยความระมัดระวังจนกระทั่งผสมเข้ากันดี

5.4 นำ Kjeldahl digestion flasks วางในลักษณะเอียงบนเครื่องมือย่อย โดยในช่วงแรกให้ใช้ความร้อนต่ำก่อนประมาณ 200 องศาเซลเซียส จนกระทั่งเดือด เมื่อหยุดกระเด็นจึงเพิ่มความร้อน 350 องศาเซลเซียส ทำการย่อยสารละลายต่อไปจนกระทั่งสารละลายในหลอดย่อยโปรตีนมีลักษณะใส ให้ความร้อนต่อไปอีก 1 ชั่วโมง เพื่อให้กระบวนการออกซิเดชันสมบูรณ์ รวมทั้งช่วยทำลายกรดซัลฟิวริกที่เกิดขึ้นด้วย

5.5 หยุดให้ความร้อน ทิ้งให้เย็นในเครื่องมือย่อย นำ Kjeldahl digestion flasks ออกจากเครื่องมือย่อย ในกรณีที่คอของหลอดย่อยมีจุดสีดำให้ล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วให้ความร้อนต่อจนหมดควัน ก่อนหยุดให้ความร้อน

5.6 เติมน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร ลงใน Kjeldahl digestion flasks

5.7 เติมน้ำละลาย 4% Boric acid 75 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร และเติมน้ำละลายอินดิเคเตอร์ผสม 4 หยด นำไปวางที่ตำแหน่งรองรับของเครื่องกลั่น โดยให้ส่วนปลายของอุปกรณ์ควบแน่นจุ่มอยู่ในกรดบอริก จากนั้นจึงเปิดน้ำให้ไหลผ่านอุปกรณ์ควบแน่น

5.8 ตวงสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (ร้อยละ 45 โดยน้ำหนัก) 80 มิลลิลิตร ค่อยๆ เทลงใน Kjeldahl digestion flasks ซึ่งตั้งอยู่ในลักษณะเอียงให้ไหลตามข้าง flask แล้วรีบนำไปต่อเข้ากับ

อุปกรณ์ควบแน่นของเครื่องกลั่น จากนั้นจึงหมุน Kjeldahl digestion flasks เพื่อให้สารผสมเข้ากันได้ดีขึ้น

5.9 ให้ความร้อนจนแอมโมเนียถูกกลั่นออกมาอย่างน้อย 150 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่เมื่อสังเกตเห็นสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเขียว ให้หยุดให้ความร้อน

5.10 นำขวดรูปชมพู่ออกในขณะที่ท่อกลั่นยังอยู่ใน flask เหนือของเหลว แล้วใช้น้ำกลั่นล้างปลายท่อน้ำกลั่นให้ไหลลงใน flask

5.11 นำขวดรูปชมพู่ซึ่งมีกรดบอริกมากเกินไปมาไทเทรตกับสารละลายละลายมาตรฐาน 0.10 N HCl จนกระทั่งสีของสารละลายเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีม่วงแดงหรือสีม่วงอมชมพู (ทำตัวอย่างละ 3 ข้าง) บันทึกปริมาณของสารละลาย 0.1 N HCl ที่ใช้ในการไทเทรต

5.12 ทำ sample blank เช่นเดียวกับวิธีการข้างต้น โดยไม่ต้องใส่ตัวอย่างทดสอบ โดยหลังการกลั่น sample blank ต้องไม่เปลี่ยนสี หาก sample blank เปลี่ยนสี ให้ทำการไทเทรตเช่นเดียวกับตัวอย่างที่ทดสอบ

หมายเหตุ

1. ในการวิเคราะห์โปรตีนแต่ละครั้ง ควรทำตัวอย่างที่ใช้ตรวจสอบ (sample blank) ด้วย โดยมีขั้นตอนปฏิบัติเช่นเดียวกัน แต่ไม่ใส่ตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ
2. ขั้นตอนที่ 5.2-5.6, 5.7-5.10 และ 5.11 คือ ขั้นตอนการย่อยโปรตีน การกลั่น และการไทเทรต ตามลำดับ

6. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and Expression of results)

$$\text{ปริมาณไนโตรเจน (ร้อยละ)} = \frac{(A - B) \times 0.014 \times N \times 100}{W}$$

เมื่อ A คือ ปริมาณสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการไทเทรตตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

B คือ ปริมาณสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการไทเทรต blank (มิลลิลิตร)

N คือ ความเข้มข้นของสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (นอร์มอล)

W คือ น้ำหนักของตัวอย่างแห้งบดละเอียด (กรัม)

0.014 คือ 1 มิลลิลิตร ของความเข้มข้นสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 1 นอร์มอล

$$\text{ปริมาณโปรตีนรวม (ร้อยละ)} = \text{ร้อยละของไนโตรเจนทั้งหมดในอาหาร} \times 6.25$$

7. ข้อเสนอแนะ และข้อควรระวัง

1. การเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นให้เต็มในตู้ดูดควัน โดยการนำหลอดย่อยใส่ใน insert rack

2. การใช้อินดิเคเตอร์ผสมในการไทเทรท จะสังเกตเห็นจุดยุติ (end point) ของการเปลี่ยนสีได้ชัดเจน
3. หลังกลั่นตัวอย่างเสร็จ ให้ล้างส่วนปลายของอุปกรณ์ควบแน่นด้วยน้ำกลั่น และกลั่นล้างระบบโดยการใส่น้ำกลั่นในหลอดย่อยแล้วทำการกลั่นโดยไม่ต้องเติมต่าง นานประมาณ 5-10 นาที

8. เอกสารอ้างอิง (Reference)

พิชรัตน์ แสนไชยสุริยา วิโรจน์ ภัทรจินดา ฉลอง วชิราภากร วินัย ใจขาน กฤตพล สมมาตรย์
 สาวิตรี วงตั้งถิ่นฐาน และวรุณ โคตะ. 2560. คู่มือบทปฏิบัติการ 137441 ปฏิบัติการโภชน
 ศาสตร์สัตว์ประยุกต์. ภาควิชาสัตวศาสตร์, คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

บทปฏิบัติการที่ 8 การวิเคราะห์ไขมัน

(Ether extract)

โดย ดร. แววรี บุญเทียม และ ดร.วรุณ แก้วพิลา

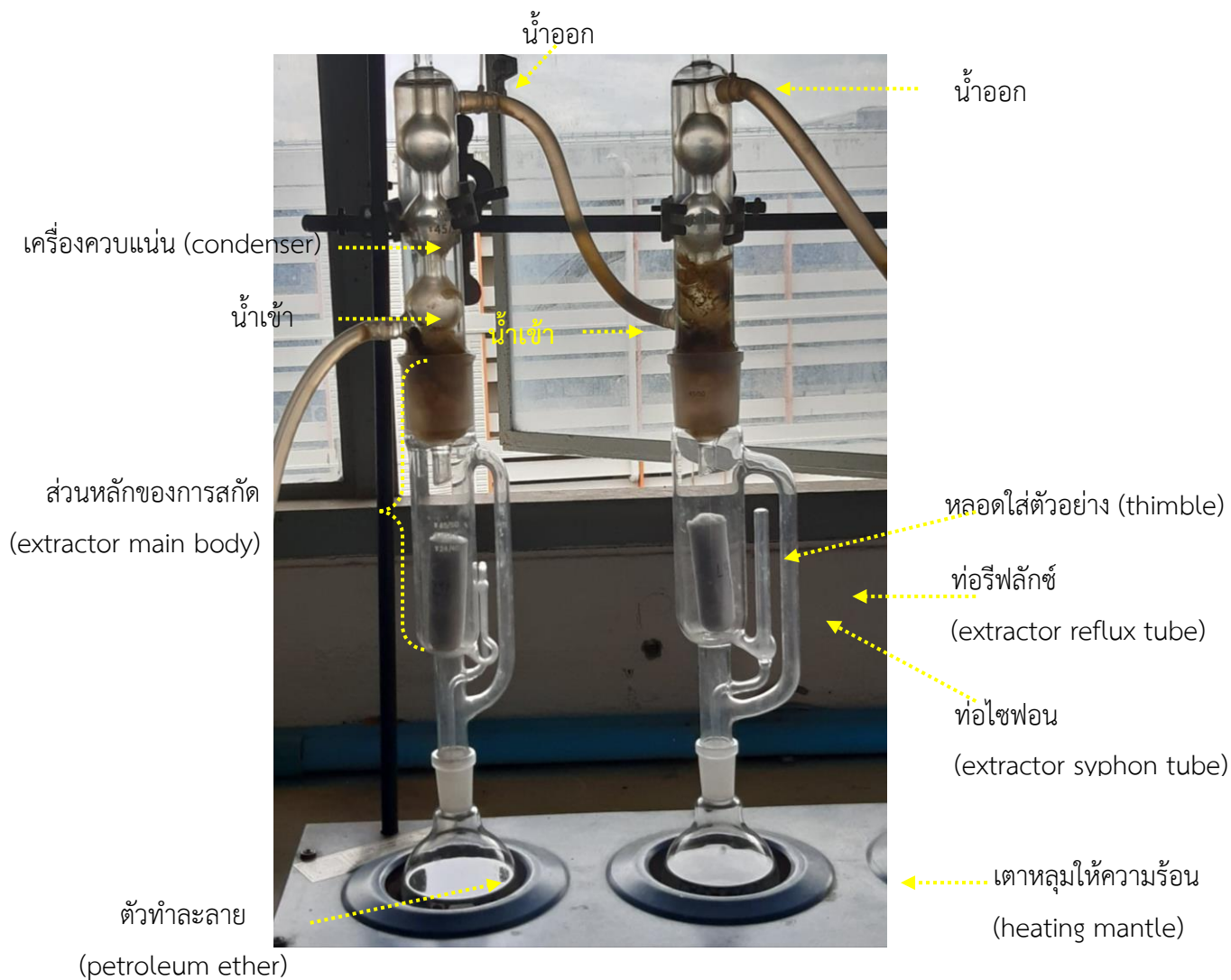
1. หลักการ (Principle)

ไขมันเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่เป็นส่วนประกอบของพืชและสัตว์ โดยทั่วไปสารประกอบไขมันเมื่ออยู่ในสภาพของเหลวที่อุณหภูมิห้องมักเรียกว่า “น้ำมัน (oil)” กึ่งแข็งกึ่งเหลวที่อุณหภูมิห้องว่า “ไขมัน (fat)” และของแข็งที่อุณหภูมิห้องว่า “ไข (wax)” โดยมีคุณสมบัติไม่ละลายในน้ำแต่ละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvents) ดังนั้น จึงนิยมใช้ petroleum ether, ethyl ether, diethyl ether, benzene, acetone, dichloromethane, hexane และ chloroform เป็นตัวสกัด โดยตัวทำละลายเหล่านี้มีความสามารถในการละลายไขมันแต่มีความสามารถต่ำในการละลายโปรตีน กรดอะมิโนและคาร์โบไฮเดรต เป็นสารที่ระเหยง่าย ไม่มีสารพิษตกค้าง มีจุดเดือดต่ำ ไม่มีควัน ไม่เป็นพิษทั้งในรูปของเหลวและไอระเหย รวมทั้งมีราคาไม่สูงเกินไป

ไขมันที่อยู่ในอาหารสัตว์เมื่อผ่านขั้นตอนการสกัดและการระเหยสารเคมีออกหมดจะเรียกว่า ether extract หรือ crude fat ซึ่งมีทั้งส่วนที่เป็นไขมัน (กลีเซอไรด์ของกรดไขมัน กรดไขมันอิสระ สเตอรอล เลซิติน) และสารคล้ายไขมันซึ่งตัวทำละลายสามารถสกัดออกมาได้ (รงควัตถุ ไขมัน สารประกอบอัลคาไลน์ และวิตามินที่ละลายในไขมัน) ซึ่งส่วนที่คล้ายไขมันนั้นมีจำนวนน้อยมากเมื่อเทียบกับส่วนไขมัน จึงไม่มีผลต่อการวิเคราะห์หาปริมาณไขมัน ในการวิเคราะห์หาปริมาณไขมันในอาหารสัตว์โดยการวิเคราะห์แบบประมาณ (proximate analysis) นิยมใช้การสกัดร้อนโดยเครื่องมือ Soxhlet apparatus (ภาพที่ 1) และเครื่อง Goldfish apparatus ซึ่งในบทปฏิบัติการจะฝึกปฏิบัติวิเคราะห์ไขมันในตัวอย่างวัตถุดิบอาหารสัตว์และอาหารสัตว์ โดยเครื่องมือ Soxhlet เท่านั้น

2. หลักการทำงานของเครื่อง Soxhlet apparatus

การสกัดร้อนโดยใช้เครื่อง Soxhlet นิยมใช้วิเคราะห์ไขมันในตัวอย่างที่เป็นของแข็ง ซึ่งต้องใช้ในการสกัดแบบต่อเนื่อง (continuous extractor) โดยเมื่อตัวทำละลายที่มีจุดเดือดต่ำคือ petroleum ether ได้รับความร้อนจากเตาหลุมให้ความร้อนหรือหม้ออังไอน้ำแล้ว จะทำให้ petroleum ether เกิดการระเหยแล้วกลั่นตัวลงมาผ่านหลอดใส่ตัวอย่าง (thimble) ที่บรรจุตัวอย่างวัตถุดิบอาหารหรืออาหารสัตว์ไว้ และเมื่อตัวทำละลายมีระดับสูงเกินความดันจะทำให้ตัวทำละลายนั้นไหลกลับลงสู่ขวดบริเวณด้านล่าง กล่าวคือ ตัวทำละลายจะสามารถผ่านตัวอย่างที่ต้องการทดสอบหมุนเวียนต่อเนื่องไปเรื่อยๆ จนกระทั่งการสกัดเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ ซึ่งวิธีการสกัดแบบนี้จะช่วยประหยัดตัวทำละลาย ได้สารที่มีความเข้มข้นสูง และตัวอย่างที่ต้องการทดสอบไม่สัมผัสความร้อนโดยตรง



ภาพที่ 1 ส่วนประกอบของเครื่อง Soxhlet apparatus

3. วัตถุประสงค์ (Objective)

1. เพื่อให้ นักศึกษาทราบวิธีการและฝึกปฏิบัติวิเคราะห์ไขมันในตัวอย่างอาหารสัตว์หรือวัตถุดิบอาหารสัตว์ได้
2. นักศึกษาสามารถนำข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ เพื่อพิจารณาคุณภาพของตัวอย่างอาหารสัตว์

4. วิธีการวิเคราะห์ไขมันโดยใช้เครื่อง Soxhlet apparatus

4.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

- 1.1 ชุดสกัดแบบ Soxhlet ซึ่งประกอบด้วยเตาหลุมให้ความร้อน เครื่องควบแน่น และเครื่องทำความเย็น
- 1.2 เครื่องชั่ง (analytical balance) ที่มีความละเอียด 0.0001 กรัม
- 1.3 ตู้อบร้อน (hot air oven) ที่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ 100 ± 2 องศาเซลเซียส

1.4 ขวดแก้วก้นแบน (flat bottom flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร

1.5 หลอดใส่ตัวอย่าง (thimble) หรือถุงผ้า ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 28 - 30 มิลลิเมตร

1.6 ลำลี

1.7 โถดูดความชื้น (desicator)

1.8 คีมคีบ (tong)

4.2 สารเคมี (Reagent)

Petroleum ether ที่มีจุดเดือดระหว่าง 40 - 60 องศาเซลเซียส

5. ขั้นตอนการวิเคราะห์ (Procedure)

1. นำขวดก้นแบนที่สะอาดไปอบในตู้อบความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วทิ้งให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้องในโถดูดความชื้น ประมาณ 1 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำมาชั่งน้ำหนัก (A)

2. ชั่งตัวอย่างอาหารหรือวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่แห้ง (จากการวิเคราะห์หาความชื้น) ประมาณ 3-5 กรัม ลงบนกระดาษกรอง จากนั้นจึงนำตัวอย่างใส่ลงใน thimble บันทึกน้ำหนัก (W) แล้วปิดด้วยลำลี สะอาด

3. เติม petroleum ether 180 มิลลิลิตร ลงในขวดก้นแบน จากนั้นให้นำ thimble ที่บรรจุตัวอย่างถ่ายลงใน Soxhlet extractor เพื่อต่อกับเข้ากับเครื่องสกัดแบบ Soxhlet

4. ให้ความร้อน 40 - 60 องศาเซลเซียส และเปิดน้ำให้ไหลผ่าน condensor ตลอดเวลาทำการ สกัด 6 ชั่วโมง หากพบว่ายังมี petroleum ether เหลืออยู่ ทำการให้ความร้อนต่อไปจนกระทั่งเหลือ ether เพียงเล็กน้อย

5. นำขวดก้นแบนออกจากเครื่อง แล้วนำไปอบในตู้อบความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง

6. ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น ประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วนำไปชั่งน้ำหนัก (B) ก่อนนำไปคำนวณหา ปริมาณไขมันในวัตถุดิบอาหารสัตว์หรือตัวอย่างอาหารสัตว์

6. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and Expression of results)

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

เมื่อ	A	คือ	น้ำหนัก flat bottom flask ที่แห้งและสะอาด
	B	คือ	น้ำหนัก flat bottom flask รวมไขมันหลังอบ
	W	คือ	น้ำหนักของตัวอย่างแห้งที่ใส่ใน thimble

7. ข้อเสนอแนะ และข้อควรระวัง

1. ควรใช้คีมคีบในการคีบอุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์ไขมันทุกครั้ง
2. Petroleum ether เป็นของเหลวที่ไวไฟของสารติดไฟง่าย ดังนั้น จึงควรเก็บให้ห่างจากความร้อน ประกายไฟ พื้นผิวที่ร้อน และห้ามสูบบุหรี่ขณะทำการวิเคราะห์ตัวอย่าง
3. หากกลืนกิน petroleum ether ให้บ้วนปาก และห้ามทำให้อาเจียน
4. สารเคมีที่ใช้เสร็จแล้ว ให้เก็บในขวดเก็บสารเคมี ติดป้ายแสดงชื่อสารเคมี ก่อนนำไปเก็บที่ห้องเก็บสารเคมี เพื่อกำจัดต่อไป
5. การทำความสะอาด thimber หลังจากที่มีการระเหย petroleum ether ออกหมด จะได้ thimber ที่มีลักษณะแห้ง ให้ทำความสะอาดโดยใช้แปรงปัดแทนการใช้น้ำ

8. เอกสารอ้างอิง (Reference)

พิชรัตน์ แสนไชยสุริยา วิโรจน์ ภัทรจินดา ฉลอง วชิราภากร วินัย ใจขาน กฤตพล สมมาตย์
 สาวิตรี วงตั้งถิ่นฐาน และวรุณ โคตะ. 2560. คู่มือบทปฏิบัติการ 137441 ปฏิบัติการโภชน
 ศาสตร์สัตว์ประยุกต์. ภาควิชาสัตวศาสตร์, คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

บทปฏิบัติการที่ 9 การวิเคราะห์เยื่อใยหยาบ (Crude fiber)

หลักการ

Crude fiber ในอาหารสัตว์ วิเคราะห์ได้โดยนำอาหารมาต้มกับกรดและด่างอย่างอ่อน พวกอินทรีย์สารต่างๆ เช่น โปรตีน แป้ง น้ำตาล และคาร์โบไฮเดรตบางอย่าง ก็จะละลายในกรดและด่าง ส่วนสารอินทรีย์ที่เหลือจากการสกัด เรียกว่า Crude fiber ซึ่งส่วนใหญ่ประกอบด้วย Cellulose นอกจากนี้ยังมี hemicellulose และ lignin รวมอยู่ด้วยเล็กน้อย

อุปกรณ์

1. เครื่องย่อยหาเยื่อใย หรือ Hot plate
2. Berzelius beaker
3. Round bottom flask
4. Crucible
5. Oklahoma State Filtering Screen หรือ ผ้าลินินที่มีเส้นด้าย 45 เส้นต่อนิ้ว
6. Spatula

สารเคมี

1. Sodium hydroxide 1.25%
2. Sulfuric acid 1.25%
3. Acetone
4. Amylase

วิธีวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่างอาหารประมาณ 1-2 กรัม ใส่ใน Berzelius beaker
5. เติม H_2SO_4 1.25% ลงใน Berzelius beaker 200 ml. (ถ้าอาหารมี %แป้งสูง ให้ใส่ Amylase 1 กรัม ก่อนเติมกรด)
2. นำ Berzelius beaker ตั้งบน hot plate โดยมี condenser เพื่อควบคุมความเข้มข้นของสารละลายให้คงที่ เป็นเวลา 30 นาที

3. รีบน้ำสารละลายออกจากเครื่องแล้วกรองตะกอนด้วยเครื่องบนผ้าลินินบน Buchner funnel ที่ต่อกับ filtering flask โดยอาศัย suction pump ช่วย แล้วล้างตะกอนด้วย น้ำกลั่นร้อน
4. ขูดตะกอนออกจากผ้าลินินให้หมด ใส่ลงใน Berzelius beaker ใบเดิม
5. เติมน้ำ NaOH 1.25% 200 ml. ลงใน Berzelius beaker นำไปทำเช่นเดียวกับข้อ 4
6. ล้างตะกอนด้วยน้ำร้อน จนกระทั่งหมดต่าง และล้างด้วย acetone ประมาณ 20-25 ml.
7. ขูดตะกอนออกจากผ้าลินินให้หมดด้วย spatula แล้วใส่ใน Crucible ที่เผาไว้เรียบร้อยแล้ว (ระวังอย่าให้ตกหล่น)
8. นำ Crucible พร้อมตะกอนไปอบที่เตาอบอุณหภูมิ 100°C ทิ้งไว้ 1 คืน
9. นำ Crucible ออกมาทิ้งให้เย็นใน desiccator แล้วชั่งน้ำหนัก
10. นำ Crucible พร้อมตะกอนไปเผาที่อุณหภูมิ 550 -600°C ประมาณ 2-3 ชั่วโมง จน ตะกอนถูกเผาไปจนเป็นเถ้า
11. นำ Crucible ออกมาทิ้งให้เย็นใน desiccator แล้วชั่งน้ำหนัก

การคำนวณ

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

A	=	น้ำหนัก crucible + น้ำหนักกากที่ย่อยแล้วหลังอบ
B	=	น้ำหนัก crucible + น้ำหนักเถ้าหลังจากเผา
W	=	น้ำหนักของอาหารเริ่มต้น

บทปฏิบัติการที่ 10 การวิเคราะห์พลังงานรวมในอาหารสัตว์ โดย Bomb Calorimeter

คำนำ

การวิเคราะห์หาพลังงาน (gross energy) ของอาหารสัตว์โดยวิธี Bomb Calorimeter นั้น เป็นการวัดความร้อนของอาหารที่เกิดขึ้นจากการเผาไหม้อาหารใน bomb ซึ่งมีออกซิเจนบรรจุอยู่ประมาณ 25-30 atmospheres ความร้อนที่เกิดขึ้นจากการเผาไหม้อาหารนั้นสามารถที่จะวัดได้จาก bomb calorimeter 2 แบบด้วยกัน คือ

- 1 **Adiabatic bomb calorimeter bomb** ชนิดนี้มีระบบการวัดความร้อนที่เกิดขึ้นจากการเผาไหม้อาหารโดยการเพิ่มอุณหภูมิของน้ำแบบ adiabatic condition ดังนั้นในการวิเคราะห์วิธีนี้จะต้องชั่งน้ำหนักของน้ำที่ใช้ (2,000 กรัม) ทุกครั้ง และวัดอุณหภูมิของ bomb บวกน้ำก่อนการเผา และเผาแล้วทุกครั้งเป็นระยะๆ ทุกนาที เพื่อบันทึกอุณหภูมิเริ่มต้นก่อนทดลอง และอุณหภูมิสูงสุดหลังเผาไหม้แล้ว นอกจากนั้นแล้วยังต้องคำนวณกรดที่เกิดขึ้นและ incidental oxidation ของสารพวก nitrogen และ sulfur compounds เพื่อที่จะคำนวณหาพลังงานของอาหารได้ถูกต้องและแม่นยำ
- 2 **Ballistic bomb calorimeter bomb** ชนิดนี้มีระบบการวัดความร้อนที่เกิดขึ้นจากการเผาไหม้อาหาร โดย galvanometer ดังนั้น การวิเคราะห์หาพลังงานโดยวิธีนี้จึงทำได้รวดเร็ว และไม่ยุ่งยากมากนัก แต่ผลที่ได้ออกมาไม่แม่นยำ (less accurate) เท่ากับ Adiabatic bomb calorimeter แต่ถ้าทำการวิเคราะห์หลายๆ ซ้ำ แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ยผลที่ได้ออกมาก็ได้ผลดีพอๆ กับ Adiabatic bomb calorimeter เช่นกัน

1. การวิเคราะห์หา Gross energy โดยวิธี Adiabatic bomb calorimeter

สารเคมี

- 1 สารละลาย Sodium Carbonate มาตรฐาน ซึ่ง Sodium Carbonate ที่อบไล่ความชื้นออกแล้วหนัก 3.658 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้มีปริมาตรทั้งหมด 1 ลิตร สารละลายชนิดนี้ 1 ml. จะให้ค่าเท่ากับ 1 แคลอรี
- 2 Methyl orange indicator
- 3 Benzoic acid ชนิด Primary grade สำหรับใช้เป็น sample standard

วิธีวิเคราะห์

- 1 บดตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ให้ละเอียดผ่านตะแกรงขนาด 2.0 mesh
- 2 ชั่งตัวอย่างที่จะทำการวิเคราะห์อย่างคร่าวๆ 1.1 กรัม แล้วนำเข้าเครื่องอัดเม็ดเม็ดอัดเม็ดเสร็จแล้วนำไปชั่งอีกครั้งหนึ่งเพื่อบันทึกน้ำหนักของตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์

- 3 วางตัวอย่างอาหารที่ชั่งแล้วลงใน crucible หรือ cup ที่วางไว้ใน bomb แล้วตัด fuse wire ยาวประมาณ 10 ซม.สำหรับเกี่ยวเป็นสะพานระหว่าง electrode ของ bomb มาสัมผัสกับเม็ดตัวอย่างอาหาร
- 4 ถ้า bomb แห้งควรเติมน้ำใน bomb ประมาณ 1 ml. แล้วหมุน bomb ไปรอบๆ เพื่อให้ตัว bomb เปียก (ทำเฉพาะกับ bomb ครั้งแรก ถ้าเป็น bomb ที่วิเคราะห์มาแล้วและยังเปียกอยู่ก็ไม่ต้องทำ)
- 5 หมุน bomb เข้ากับเครื่องให้แน่นและปิด pressure release valve
- 6 ปลดออกซิเจนเข้าไปใน bomb โดยดู gauge pressure ให้ได้ประมาณ 25 atmospheres
- 7 นำ bomb ไปต่อกับ bucket ชั่งน้ำกลั่น 2,000 กรัม แล้วค่อยๆ ถ่วงลงใน bucket
- 8 ปิดฝาครอบ bucket ให้แน่น แล้วจัดระดับของ thermometer ให้ต่ำลงเปิด switch circulating motor เพื่อให้ใบพัดใน bucket หมุน
- 9 เปิดฝาครอบออกจาก calorimeter jacket cover แล้วเติมน้ำจนกระทั่งน้ำไหลออกทาง drain hose
- 10 ปรับอุณหภูมิของน้ำที่อยู่ทั้งหมด และข้างใน jacket ให้เท่ากัน (equilibrium) โดยใช้ น้ำร้อนหรือน้ำเย็น อ่านอุณหภูมิทุกๆ นาที เป็นเวลา 3 นาที แล้วบันทึก initial temperature ค่าที่อ่านได้แต่ละครั้งควรไม่คลาดเคลื่อนไปจากเดิม เกิน 0.002°C
- 11 กดปุ่ม ignite แล้วอ่าน thermometer ทุกๆ 1 นาที จนกระทั่งอุณหภูมิขึ้นสูงสุดแล้ว บันทึกผลไว้เป็นค่า Final temperature
- 12 ดึงระดับของ thermometer ขึ้น แล้วเปิดฝาครอบ bomb เอา bomb ออกมาจาก bucket จากนั้นค่อยๆ ปลดออกซิเจนออกจากตัว bomb แล้วจึงเปิด bomb ออก
- 13 คลาย fuse wire ออกจาก electrode ดึงให้เป็นเส้นตรง แล้ววัดส่วนที่เหลือจากการเผาไหม้
- 14 ล้างภายใน bomb ด้วย stream of neutral distilled water ครั้งละ 10 ml. 3 ครั้ง แล้วรวบรวมน้ำกลั่นที่ล้าง bomb ทั้งหมดไปไตเตรทกับสารละลาย sodium carbonate มาตรฐาน โดยใช้ methyl orange เป็นอินดิเคเตอร์

การคำนวณ

$$\text{GE (cal/g.), as fed basis} = (A-B) C - (D-F)$$

GE	=	Gross energy
A	=	final temperature เป็นอุณหภูมิที่อ่านค่าได้สูงสุดเมื่ออาหารเผาไหม้หมด
B	=	initial temperature เป็นอุณหภูมิที่อ่านได้ก่อนการเผาอาหารทดลองเมื่ออยู่ใน equilibrium condition
C	=	Hydrothermol equivalent ของ bomb
D	=	ความยาวของ fuse wire ที่เผาไหม้ด้วย 2.3 (ความยาว Fuse wire 1 ซม. จะให้พลังงานเท่ากับ 2.3 แคลอรี)
F	=	ml. ของสารละลาย sodium carbonate มาตรฐานที่ใช้ในการไตเตรตน้ำที่ล้างภายใน bomb

15 การวิเคราะห์หาค่า Hydrothermol equivalent ของ bomb

- 1) ใช้สารเคมีทุกอย่างเช่นเดียวกับการวิเคราะห์อาหาร
- 2) นำ benzoic acid ไปอบที่ 105 °C ประมาณ 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถอบแก้ว แล้วนำออกมาอัดเม็ด และชั่งน้ำหนักที่แน่นอน
- 3) ทำการทดลองต่อตามข้อ 2.2.3 – 2.2.13 เหมือนการวิเคราะห์ห้อย่างอาหารทุกประการ แต่การวิเคราะห์ Hydrothermol equivalent นี้ต้องทำซ้ำอย่างน้อยที่สุด 4 ซ้ำ เพื่อนำผลที่ได้ออกมาแต่ละครั้งมาหาค่าเฉลี่ย
- 4) การคำนวณหาค่า Hydrothermol equivalent

$$\text{Hydrothermol equivalent per degree (cal)} = \frac{(M \times H) + (D - F)}{(A - B)}$$

M	=	น้ำหนักของ benzoic acid ที่ใช้ในการวิเคราะห์
H	=	heat of combustion of benzoic acid = 6,319 cal/กรัม
A	=	Final temperature
B	=	Initial temperature
D	=	ความยาวของ fuse wire ที่เผาไหม้ด้วย 2.3
F	=	ml. ของสารละลาย sodium carbonate มาตรฐานที่ใช้ในการไตเตรตน้ำที่ล้างภายใน bomb

2. การวิเคราะห์หา Gross energy โดยใช้ Ballistic bomb calorimeter

หลักการ

การวิเคราะห์หาพลังงานของอาหารด้วยเครื่องมือนี้ โดยชั่งน้ำหนักตัวอย่างที่วิเคราะห์ให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน นำไปเผาใน bomb ที่มีออกซิเจนอยู่ประมาณ 25 atmosphere แล้ววัดความร้อนที่เกิดขึ้นด้วย Thermocouple และ galvanometer system แล้วเปรียบเทียบความร้อนที่อ่านได้จากการเผาตัวอย่างมาตรฐาน เช่น benzoic acid ที่ทราบค่าของพลังงานที่เกิดจากการเผาไหม้ด้วยเครื่องชนิดนี้

สารเคมี

- 1 Benzoic acid (Thermochemical grade) ; 1 g. ให้พลังงาน 6.32 kcal.
- 2 Firing cotton

วิธีวิเคราะห์

- 1 บดตัวอย่างอาหารที่จะทำการวิเคราะห์ให้ละเอียดผ่านตะแกรง 20 mesh
- 2 ชั่งตัวอย่างอาหารที่บดแล้วอย่างคร่าวๆ ประมาณ 0.7 – 1 กรัม แล้วนำไปอัดเม็ด ถ้าเป็นตัวอย่างของอาหารหยาบ เช่น พวกลูกแห้งซึ่งอัดเม็ดไม่ได้ ต้องใช้เครื่องอัดตัวอย่างเข้าไป crucible อัดให้อาหารเกาะติด crucible ให้แน่น เพื่อลด surface area และ springiness ของตัวอย่างที่วิเคราะห์ ชั่งน้ำหนักอาหารที่อัดเม็ดแล้ว เพื่อให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน
- 3 นำตัวอย่างอาหารไปวางบน support pillar ของฐาน bomb
- 4 ใช้ firing cotton ยาว 5 ซม. ผูกเกี่ยวระหว่าง coil ของ firing wire และสัมผัสตรงกลางของเม็ดอาหาร
- 5 ตรวจสอบ sealing ring ให้อยู่ในสภาพเรียบร้อย แล้วจึงนำ bomb body เข้าสวม และหมุนให้เข้ากันสนิท
- 6 เสียบ Thermocouple wire ตรงรูส่วนบนตัว bomb
- 7 ปิด pressure release valve แล้วจึงเปิดออกซิเจนเข้าเครื่อง bomb โดยหมุนปุ่ม control box ประมาณ 1/4 ของปุ่ม จนกระทั่งความดันสูงถึง 25 atmosphere ภายใน 20 วินาที จึงปิดปุ่มแก๊สเข้าเครื่อง
- 8 ปรับเครื่อง galvanometer ให้อยู่ที่ศูนย์ แล้วทิ้งให้อยู่ที่ศูนย์ประมาณ 30 วินาที เพื่อปรับให้อุณหภูมิคงที่ และ galvanometer อยู่ที่ศูนย์
- 9 ถอยออกจากเครื่อง bomb แล้วจึงกดปุ่ม firing button
- 10 อ่านค่าของ galvanometer ที่ขึ้นบอกค่าสูงสุด (ใช้เวลาประมาณ 10-15 วินาที)

- 11 ปล่อยออกซิเจนที่เหลือออกจาก bomb แล้วจึงถอด bomb body ออกจากเครื่องจุ่ม bomb body ในน้ำเย็น แล้วล้างด้วยน้ำเย็น 2-3 ครั้ง เช็ดให้แห้ง โดยเฉพาะตรงรูสำหรับเสียบ Thermocouple wire จะต้องแห้งเสมอ

วิธี standardise เครื่องมือ

การ Standardise เครื่องมือนี้ ทำเพื่อแก้ความผิดพลาดของความร้อนที่เกิดขึ้นจาก firing current และ firing cotton วิธีการทำนั้น ทุกอย่างคล้ายการวิเคราะห์ตัวอย่าง เพียงแต่ไม่ใส่ตัวอย่างเท่านั้น แล้วอ่านค่าของ galvanometer ที่ขึ้นสูงสุด ซึ่งใช้เวลาประมาณ 40 วินาที หลังจากกดปุ่ม firing button แล้ว

วิธีวิเคราะห์ standard sample

การวิเคราะห์ standard sample นั้น ทำทุกอย่างเหมือนกับการวิเคราะห์อาหาร เพียงแต่ใช้ benzoic acid ใส่แทนตัวอย่างที่วิเคราะห์เท่านั้น และใช้ benzoic acid ในการวิเคราะห์แต่ละครั้ง ประมาณ 0.7 กรัม ทำการวิเคราะห์อย่างน้อยที่สุด 5 ซ้ำ เพื่อนำมาหาค่าเฉลี่ย

การคำนวณค่าพลังงาน

น.น. ของ benzoic acid ที่ใช้ในการวิเคราะห์	=	W_1	กรัม
Calorific value of benzoic acid	=	6.32	kcal/g.
ค่าของ galvanometer ที่อ่านสูงสุดของถ้วยเปล่า	=	θ_1	divs
ค่าของ galvanometer ที่อ่านสูงสุดเนื่องจากถ้วยเปล่า	=	θ_2	divs
ค่าของ galvanometer ที่อ่านสูงสุดเนื่องจาก benzoic acid	=	$\theta_2 - \theta_1$	divs
Calibration constant	=	$\frac{6.32 W_1 \text{ kcal/div}}{\theta_2 - \theta_1}$	
	=	Y_1	

เฉลี่ยค่าจากการวิเคราะห์ standard sample 5 ซ้ำ ดังนั้น ค่าเฉลี่ยของการ standardising sample คือ

$$Y = \frac{y_1 + y_2 + y_3 + y_4 + y_5}{5} \quad \text{kcal/div}$$

น.น.ของตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์	=	Z	กรัม
ค่าของ galvanometer ที่อ่านสูงสุดเมื่อมีตัวอย่าง	=	θ_3	divs
ค่าของ galvanometer ที่อ่านสูงสุดเนื่องจากตัวอย่าง	=	$\theta_3 - \theta_1$	divs
ความร้อนที่ได้มาจากตัวอย่าง	=	$(\theta_3 - \theta_1)Y$	kcal
ค่าพลังงานของตัวอย่าง	=	$(\theta_3 - \theta_1)YZ$	kcal/g.

บทปฏิบัติการที่ 11 การวิเคราะห์หาสารพิษในอาหารสัตว์

11.1 การตรวจสอบสารพิษอะฟลาทอกซินในอาหารสัตว์

สารพิษอะฟลาทอกซินเป็นกลุ่มของสารพิษของสารอินทรีย์เคมีพวกไดฟรานโคมาริน (Difranocoumarin) ที่มีโครงสร้างคล้ายกัน มีหลายชนิด ที่พบในอาหารคนและอาหารสัตว์ทั่วไป คือ อะฟลาทอกซิน B1, B2, G1, G2 นอกจากนี้ยังพบสารพวก M หรือ Milk toxin ซึ่งได้แก่ M1, M2 ซึ่งพบในน้ำนม และปัสสาวะของสัตว์ ซึ่งกินอาหารที่มีการปนเปื้อนสารอะฟลาทอกซิน B1 และ B2 เข้าไปในขณะที่ B2a และ G2a พบได้ในอาหารทั่วไป

อะฟลาทอกซิน B1 จัดว่ามีความสำคัญมากที่สุด เนื่องจาก พบในธรรมชาติในปริมาณสูง จัดเป็นสารพิษที่มีความรุนแรงมากที่สุด รองลงมา คือ G1, B2 และ G2 ตามลำดับ

คุณสมบัติของสารอะฟลาทอกซิน

สารอะฟลาทอกซินสามารถเรืองแสงได้ภายใต้อัลตราไวโอเลต ขนาดความยาวคลื่น 365-366 nm อะฟลาทอกซินกลุ่ม B สามารถให้แสงเรืองน้ำเงิน (Blue fluorescence) อะฟลาทอกซินกลุ่ม G ให้แสงเรืองสีเขียวปนเหลือง (Yellowish Green fluorescence)

สารอะฟลาทอกซินสามารถละลายได้ในสารละลายอินทรีย์เคมีหลายชนิด ได้แก่ Methanol, Ethanol, Chloroform, Acetone Acetonitrile, N-Hexane, Benzene เป็นต้น

จุดหลอมตัวของอะฟลาทอกซินอยู่ที่ 250 °C ดังนั้น การใช้ความร้อนโดยการหุง ต้ม อบ นึ่ง คั่ว ทั่วไป ไม่สามารถทำลายสารพิษได้ แต่การใช้ความร้อนร่วมกับการให้ความร้อนรูปแบบต่างๆ จะช่วยทำลายได้บ้าง หรือการใช้แสง Ultraviolet ร่วมกับความร้อนจะช่วยทำลายได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับระยะเวลา และอุณหภูมิ หรือการใช้รังสีไอออนไนซ์ (Ionizing radiation) เช่น รังสีเอกซ์ รังสีแกมมา ซึ่งกำลังอยู่ระหว่างการศึกษากัน เพราะให้ทั้งผลบวกและผลลบ สารเคมีที่สามารถทำลายอะฟลาทอกซินได้ ได้แก่ โซเดียมไฮโปคลอไรต์ (Sodiumhypochlorite) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogenperoxide) จากคุณสมบัติดังกล่าวทำให้เราสามารถตรวจสอบ และสกัดสารอะฟลาทอกซินจากอาหารได้

การวิเคราะห์อะฟลาทอกซินในอาหารสัตว์ สามารถทำได้ 2 วิธี คือ

1. วิธี Biological assay เป็นการทดลองกับสัตว์โดยตรง ซึ่งนักวิเคราะห์ส่วนใหญ่ไม่นิยม เนื่องจากต้องใช้สัตว์เป็นตัวทดลอง
2. วิธี Chemical assay เป็นวิธีที่นิยมกันมาก

การตรวจสอบปริมาณสารอะฟลาทอกซิน

การตรวจสอบสารอะฟลาทอกซินมีหลายวิธี และสามารถจำแนกตรวจสอบได้ 3 ระดับ คือ

1. **การสันนิษฐานในขั้นต้น (Presumptive test)** นิยมใช้กับวัตถุดิบ เช่น ข้าวโพด สามารถบอกได้อีกว่า ข้าวโพดนั้นมีสารอะฟลาทอกซินหรือไม่ และมีมากหรือน้อย โดยอาศัยการนับจุดเรืองแสง ที่เรียกว่า บีจีวายเอฟ (BGYF test หรือ Black light test) เป็นวิธีการที่ปฏิบัติได้ง่าย รวดเร็ว เสียค่าใช้จ่ายต่ำ ใช้ได้ตั้งแต่ระดับไร่ ผู้ค้าท้องถิ่น และโรงงานอุตสาหกรรมต่างๆ

BGYF ใช้หลักการตรวจจุดสีเหลืองปนเขียวใสสะท้อนแสง (Bright Greenish Yellow Fluorescence) ภายใต้ UV ความยาวคลื่น 365-366 nm. ซึ่งการเกิดจุดเรืองแสงนี้จะมีความสัมพันธ์กับการมีเชื้อรา สาเหตุ และปริมาณที่พบก็อาจจะสัมพันธ์กับสารอะฟลาทอกซิน

2. **วิธีตรวจสอบขั้นตอนอย่างรวดเร็ว (rapid screening method)** เป็นวิธีที่ตรวจสอบว่าตัวอย่างมีสารอะฟลาทอกซินหรือไม่ และมีในปริมาณเท่าใด โดยประมาณ วิธีทดสอบแบบนี้อาจแบ่งได้เป็นการทดสอบทางเคมี (chemical method) และวิธี Immunological method วิธีทดสอบทางเคมีแบบนี้มีหลายวิธี แต่ที่นิยมใช้กันแพร่หลายและได้ผลดีคือ วิธีมินิคอลัมน์ (minicolumn) ซึ่งในวิธีมินิคอลัมน์เองมีรายละเอียดย่อยแตกต่างกันออกไป จนเกิดเป็นวิธีมินิคอลัมน์หลายวิธี แต่อาศัยหลักปฏิบัติเหมือนกัน คือ การสกัดสารอะฟลาทอกซินจากตัวอย่าง แล้วมาทำให้บริสุทธิ์ จากนั้นนำไปผ่านในหลอดมินิคอลัมน์ เพื่อรวบรวมปริมาณสารก่อนนำไปอ่านค่าภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 365-366 nm. โดยอ่านเทียบกับมินิคอลัมน์มาตรฐาน (standard มินิคอลัมน์) ที่เรารู้ความเข้มข้นระดับต่างๆ ซึ่งค่าที่อ่านได้เมื่อเทียบกับ standard แล้ว สามารถประมาณค่าได้ว่าอยู่ในระดับใด

ซึ่งวิธีการตรวจสอบโดยใช้มินิคอลัมน์ เป็นวิธีที่ไม่ยุ่งยากนัก อุปกรณ์เครื่องมือไม่ซับซ้อน ค่าใช้จ่ายต่ำเมื่อเทียบกับวิธีตรวจสอบปริมาณโดยวิธีอื่นๆ และผู้ทดสอบไม่จำเป็นต้องมีความรู้ ความเชี่ยวชาญสูง หากได้รับการฝึกฝน และตาไม่บอดสีก็สามารถปฏิบัติได้

วิธี Immunological Method เป็นวิธีการที่อาศัยหลักการปฏิกิริยาเฉพาะเจาะจง ระหว่างสารพิษจากเชื้อรา (antigen) และ antibody ที่เจาะจงกับสารพิษนั้น ที่นิยมกันขณะนี้ ได้แก่ วิธี ELISA (Enzyme Immunosorbent Assay) เพราะเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก และรวดเร็ว สามารถตรวจสอบได้พร้อมกันหลายๆ ตัวอย่าง การเตรียมตัวอย่างก็ไม่ยุ่งยาก แต่จะมีข้อจำกัดในเรื่องของอายุ antigen

3. **วิธีตรวจสอบปริมาณโดยละเอียด (Quantitative Method)**

วิธีการนี้สามารถบอกชนิดและปริมาณของอะฟลาทอกซินได้อย่างละเอียดและถูกต้อง ผลการวิเคราะห์เป็นที่ยอมรับโดยทั่วไป

เทคนิคที่ใช้ในการตรวจสอบปริมาณที่นิยมและยอมรับกันทั่วไป ได้แก่ TLC (Thin Layer Chromatography), HPLC (High Performance Liquid Chromatography), HPTLC (High Performance Thin Layer Chromatography), MA (Mass spectrometry)

ซึ่งวิธีการนี้สามารถอ่านค่าได้แม้ในปริมาณที่ต่ำมากๆ การที่จะเลือกใช้วิธีการวิเคราะห์ หรือ เทคนิคการวิเคราะห์อะพลาทอกซินแบบใดนั้น ขึ้นอยู่กับความพร้อมทั้งด้านอุปกรณ์ เครื่องมือ และ บุคลากรของหน่วยงานนั้นๆ อย่างไรก็ตาม ควรที่จะคำนึงถึงความถูกต้อง หรือผลของการวิเคราะห์ ด้วย

1. การวิเคราะห์หะอะพลาทอกซิน โดยวิธีการกรอง (Filter Method)

สารเคมี :

1. สารทำละลาย (Organic solvent) : ที่สามารถใช้ได้ดี ได้แก่ Methanol, Acetone, Chloroform, Benzene, Isopropanol ชนิด AR เกรด หรือเกรดเพื่อการวิเคราะห์
2. สารละลายสำหรับการสกัด (Extracting solvent) : ใช้สารละลายผสมระหว่าง Methanol : 4% KCl หรือ 1% NaCl ในอัตราส่วน 60 : 40 โดยปริมาตร (สารละลาย A)
3. สารละลายที่ใช้ในการตกตะกอน (Precipitation solution) ได้แก่
 - 1) สารละลาย Zinc Acetate Solution : ชั่ง 125 g. Zn (OAC)₂ และ 62.5 g. (NH₄)₂SO₄ ละลายด้วยน้ำกลั่นเล็กน้อย เติม 1 CC. glacial acetic acid จน สารละลายดีแล้ว เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 CC. (สารละลาย B)
 - 2) สารละลาย 0.1 M H₃PO₄ : เตรียมโดยไปเปต 5.6 CC. H₃PO₄ ลงใน volumetric flask ที่มีน้ำอยู่ในปริมาณมากพอสมควร จากนั้นปรับปริมาตร โดยการเติมน้ำจนครบ 1,000 CC. (สารละลาย C)
4. สารที่ช่วยในการกรอง Diatomaceous earth : Clite 545 หรือ Highly-Super cell
- 5.

วิธีวิเคราะห์

1. เติมตัวอย่างที่บดละเอียด 5 กรัม ลงใน สารละลาย A 20 ml. และเขย่าด้วยมือ 5 นาที
2. กรองสารละลายด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 ใส่ใน flask ขนาด 125 ml. และเติม สารละลาย B จำนวน 2 ml. และสารละลาย C จำนวน 4 ml. เขย่าให้เข้ากัน และเติม 0.5 กรัม celite เขย่าให้เข้ากันอีกครั้งแล้วกรอง
3. เก็บส่วนที่กรองได้ 4 ml. ใส่ในกรวยแยกชั้น (separate funnel flask) และเติม benzene จำนวน 2 ml. เขย่าให้เข้ากันอย่างเร็ว และแรง นาน 1 นาที หลังจากนั้นรอ ให้แยกชั้น

หมายเหตุ : 1 ml. ของตัวอย่างที่เก็บ = 0.5 g. ตัวอย่าง

4. เทหรือปล่อยสารชั้นล่างทิ้ง และเก็บสารชั้นบนเพื่อนำไปทดสอบ

5. เตรียมกระดาษกรองวัดค่ามาตรฐาน : เตรียมสารมาตรฐาน aflatoxin (Blue = B หรือ Green = G) มีความเข้มข้น 1 $\mu\text{g.}/\text{ml.}$ และหยดบนกระดาษกรอง ดังนี้

	Aflatoxin level (ppb)		
	20	30	100
Stock std. 1 $\mu\text{g. B}/\text{ml.}$	10 μl	25 μl	50 μl
Sample	10 μl	10 μl	10 μl
Stock std. 1 $\mu\text{g. G}/\text{ml.}$	10 μl	25 μl	50 μl

2. การตรวจสอบปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินในอาหารสัตว์ โดยใช้มินิคอลัมน์ สารเคมี

1. สารพวก Organic solvent : ที่สามารถใช้ได้ดี ได้แก่ Methanol, Acetone, Chloroform, Benzene, Acetonitrile, Isopropanol ชนิด AR เกรด หรือเกรดเพื่อการวิเคราะห์
2. สารละลายสำหรับการสกัด (Extracting solvent) : ใช้สารละลายผสมระหว่าง Methanol : 4% KCl หรือ 1% NaCl ในอัตราส่วน 60 : 40 โดยปริมาตร (สารละลาย A)
3. สารละลายที่ใช้ในการตกตะกอน (Precipitation solution) ได้แก่
 - 1) สารละลาย Zinc Acetate Solution : ชั่ง 125 g. Zn (OAc)₂ และ 62.5 g. (NH₄)₂SO₄ ละลายด้วยน้ำกลั่นเล็กน้อย เติม 1 CC. glacial acetic acid จนสารละลายดีแล้ว เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 CC. (สารละลาย B)
 - 2) สารละลาย 0.1 M H₃PO₄ : เตรียมโดยไปเปิด 5.6 CC. H₃PO₄ ลงใน volumetric flask ที่มีน้ำอยู่ในปริมาณมากพอสมควร จากนั้นปรับปริมาตรโดยการเติมน้ำจนครบ 1,000 CC. (สารละลาย C)
4. สารที่ช่วยในการกรอง Diatomaceous earth : Clite 545 หรือ Highly-Super cell
5. สารละลายที่ใช้ในการสร้าง Eluting solution : Chloroform : Acetone : 90 : 10 (สารละลาย E)
6. สารเคมีที่ใช้ในการบรรจุในหลอดมินิคอลัมน์ Packing material : ได้แก่ Alumina Neutral, Brockman activity I (80-200 mesh), Calcium Sulfate anhydrous หรือ Drierite nonindicating (20-40 mesh), Florisil ของ Fisher Scientific Co.

No. F-101 (60-100 mesh), Silica gel 60-E Merck No. 7734 (100-200 mesh)

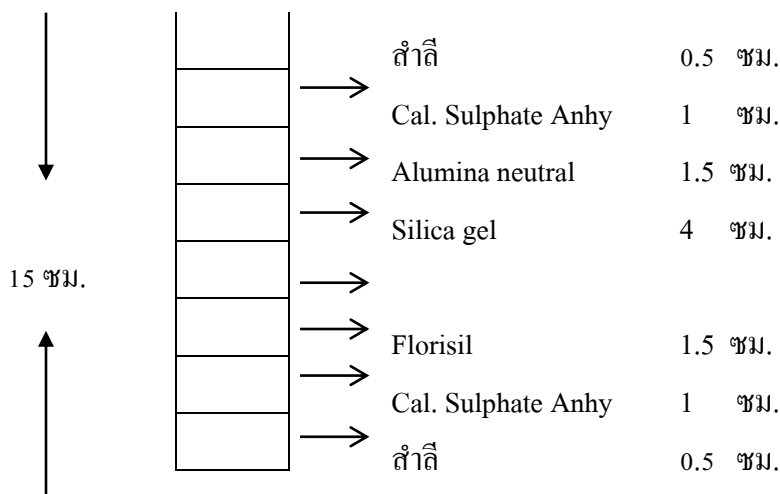
Sodium Sulfate anhydrous

7. สำลีสชนิดปราศจากไขมันและไม่เรืองแสง

การเตรียมมินิคอลัมน์

ใช้แท่งแก้วใส เส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มม. ยาว 15 ซม. ไม่เรืองแสงภายใต้ UV. บรรจุสำลีสชนิดไม่เรืองแสง และปราศจากไขมันไว้ส่วนล่างของหลอด จากนั้นบรรจุสารเคมีตามลำดับ ดังรูป

1. บรรจุสำลีส ที่ปลายหลอดด้านล่าง ให้สูงจากส่วนปลายสุดประมาณ 0.5 ซม. โดยอัดให้สำลีสสูง 0.5 ซม.
2. Calcium sulfate anhydrous สูง 1 ซม.
3. Florisil สูง 1.5 ซม.
4. Silica gel สูง 4 ซม.
5. Alumina nertral สูง 1.5 ซม.
6. Calcium sulfate anhydrous 1 ซม.
7. สำลีส สูง 0.5 ซม.
8. ปิดปลายหลอดทั้ง 2 ด้านกันความชื้นโดยใช้เทปใสปิด



มินิคอลัมน์ที่บรรจุแล้ว ถ้ายังไม่ได้ใช้ทันทีให้นำเข้าตู้อบ 2 ชั่วโมง ก่อนนำมาเก็บในโถอบแห้ง สารเคมีในรายการที่ 2, 4, 5 ต้องนำเข้าอบในตู้อบเพื่อไล่ความชื้น และเป็นการ activate สาร ในการบรรจุสารแต่ละชั้นใช้หลอดดูดนมเปรี้ยวเป็นตัวดูดสารและบรรจุ และทำการเคาะข้างหลอดมินิ

คอลัมน์เบาๆ เพื่อให้สารอัดตัวกัน และปรับให้ผิวหน้าแต่ละชั้นเรียบ และหลังจากบรรจุสารแล้ว ควรเหลือความยาวสำหรับใส่สารละลายได้ 1 ml. พอดี

การสกัดสารพิษอะฟลาทอกซินออกจากตัวอย่าง

1. ชั่งตัวอย่างหนัก 50 กรัม ใส่ใน erlenmeyer flask ขนาด 500 ml. เติมน้ำยาสารละลาย A (Extracting solvent) 200 ml. ปิดปากฟลาสด้วยจุกดำที่ห่อด้วยฟลอยเยาฟลาสด้วยมืออย่างแรง และต่อเนื่องเป็นเวลา 30 นาที หรือใส่ตัวอย่างในเครื่องปั่นด้วยความเร็วสูงเป็นเวลา 3 นาที
2. กรองสารละลายด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 ใส่ในฟลาสขนาด 250 ml. เก็บน้ำยาที่สกัดได้จำนวน 40 ml. ใส่ปิ๊กเกอร์ขนาด 250 ml. เติมน้ำยา B (Zinc acetate solution) 20 ml. คนให้เข้ากัน 1 นาที
3. เติมน้ำยา C (H_3PO_4 solution) 40 ml. คนให้เข้ากัน ตั้งทิ้ง 5 นาที ระหว่างนั้นให้คนเป็นครั้งคราว จนครบกำหนด ถ้าตะกอนขุ่นขาว เติมน้ำยา celite 5 กรัม คนให้เข้ากันแล้วนำไปกรอง โดยใช้กระดาษกรองเบอร์ 1 หรือ เบอร์ 4
4. เก็บน้ำยาที่กรองได้ 50 ml. ใส่กรวยแยกชั้น เติมน้ำยา Benzene 4 ml. ปิดจุกเยาอย่างแรง และต่อเนื่องเป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้เบนซีนไปทำละลายสารอะฟลาทอกซินในสารละลายตัวอย่าง ทิ้งไว้ให้แยกชั้น โดยสารละลายชั้นบนจะเป็น Benzene ในชั้นตอนนี้ อะฟลาทอกซินจะถูกเก็บไว้ในชั้นของสารละลายเบนซีน
5. ใส่น้ำยาชั้นล่างทิ้ง เก็บน้ำยาชั้นบน สำหรับตรวจสอบใน minicolumn ในชั้นตอนนี้ ถ้า น้ำยา Benzene ขุ่น หรือเป็น Emulsion ให้เติม sodium sulfate anhydrous จำนวน 2-5 กรัม เขย่าเบาๆ ทิ้งให้ Benzene ไสก่อน เก็บน้ำยาใส่ในขวดเก็บ (vial) ชนิดทำด้วยแก้ว Borosilicate ปิดฝาให้สนิท ปิดทับด้วยแผ่นพาราฟิล์มเพื่อป้องกันการระเหย และห่อด้วยกระดาษฟอยล์ ก่อนนำไปเก็บในตู้เย็น รอการวิเคราะห์ หรือถ่ายลงในหลอด minicolumn ดำเนินการวิเคราะห์เลย

การตรวจ Chromatogram

1. เปิดปลายปิดทั้ง 2 ด้าน ของหลอด minicolumn
2. บีบให้น้ำยา Benzene ที่เตรียมได้ ในขั้นตอนการสกัดจำนวน 1 ml. ไส้ในหลอดคอลัมน์ ปล่อยให้ น้ำยาไหลออกมาด้วยแรงดึงดูดของโลก
3. เติมน้ำยา E (eluting) ครั้งละ 1 ml. 4 ครั้ง ปล่อยให้ น้ำยาไหลออกมาจนหมด หากน้ำยาไหลช้า ใช้ลูกยางบีบช่วยไล่ จะทำให้น้ำยาไหลเร็วขึ้น

หมายเหตุ

1. การใส่น้ำยาในหลอดมินิคอลัมน์แต่ละครั้ง อย่าปล่อยให้ให้น้ำยาแห้งสนิท เพราะสารอะฟลาทอกซินจะจับติดกับหลอด จะทำให้การชะล้างออกได้ไม่หมด และจะทำให้การอ่านค่าผิดได้
2. น้ำยาสกัด Benzene 1 ml. ได้มาจากตัวอย่าง = 1.25 g. = **1 g.** (อีก 0.25 g. ให้เผื่อสำหรับความผิดพลาดที่จะเกิดในการทดลอง หรือ 25% นั้นเอง)

ซึ่งมีหลักการคิด ดังนี้

การคิด dilution factor หรือ การคิดคำนวณตัวแทนของตัวอย่าง มีขั้นตอนการคิดดังนี้

- 1) ขั้นตอนสกัดครั้งแรก ตัวอย่าง 50 กรัม + สารละลายสกัด 200 ml.

$$\begin{array}{lcl} \text{ในสารผสม 200 ml. มีตัวอย่างอาหาร} & 50 & \text{กรัม} \\ \text{ในสารผสม 1 ml. มีตัวอย่างอาหาร} & \frac{50}{200} & \text{กรัม} = 0.25 \text{ กรัม} \end{array}$$

- 2) ขั้นตอนตกตะกอนแยกสารเคมีอื่น โดยใช้น้ำกรองในข้อ 1 จำนวน 40 ml. ซึ่งเป็นตัวแทนของอาหาร = 40 ml. X 0.25 กรัม = 10 กรัม

น้ำกรอง 40 ml. (10 กรัมต่อตัวอย่าง) + 20 ml. สารละลาย B + 40 ml.

สารละลาย C รวมสารละลายทั้งหมด 100 ml.

$$\begin{array}{lcl} \text{นั่นคือ สารละลายทั้งหมด 100 ml. เป็นตัวแทนตัวอย่าง} & 10 & \text{กรัม} \\ \text{ถ้าสารละลายทั้งหมด 1 ml. เป็นตัวแทนตัวอย่าง} & \frac{10}{100} & \text{กรัม} = 0.1 \text{ กรัม} \end{array}$$

- 3) การแยกสารอะฟลาทอกซินด้วย Benzene

นำน้ำกรองในข้อ 2 จำนวน 50 ml. มาใส่ในกรวยแยกชั้น

$$\begin{array}{lcl} \text{นำน้ำกรอง 1 ml. เป็นตัวแทนของอาหาร} & 0.1 & \text{กรัม} \\ \text{น้ำกรอง 50 ml. เป็นตัวแทนของอาหาร} & 0.1 \times 50 & = 5 \text{ กรัม} \\ \text{สารอะฟลาทอกซินทั้งหมดของตัวอย่าง} & 5 \text{ กรัม} & \text{ถูกรวมเข้าไปเก็บใน Benzene 4 ml.} \end{array}$$

$$\begin{array}{lcl} \text{Benzene 4 ml. เป็นตัวแทนอาหาร} & 5 & \text{กรัม} \\ \text{Benzene 1 ml. เป็นตัวแทนอาหาร} & \frac{5}{4} & \text{กรัม} = 1.25 \text{ กรัม} \end{array}$$

นั่นคือ ถ้าเราใช้ Benzene 1 ml. จึงเป็นตัวแทนของตัวอย่างอาหาร 1.25 กรัม ซึ่งเทียบเท่ากับ ตัวอย่าง 1 กรัม ดังกล่าว

การอ่านผล

นำหลอด minicolumn ที่เสร็จแล้ว ไปอ่าน Chromatogram ที่ได้ ไปเทียบกับความเข้มของการเรืองแสงสีน้ำเงิน-ม่วง ของหลอดมาตรฐาน ภายใต้แสง UV light ที่ความยาวคลื่น 365-366 nm. ค่าที่อ่านได้ เมื่อเทียบกับหลอดมาตรฐานหลอดใดแล้ว สามารถอ่านค่าออกมาเป็นค่าอื่นๆ ได้เลย หรืออาจจะอ่านค่าออกมาเป็นช่วงๆ ในกรณีที่ความเข้มของแสงอยู่ก้ำกึ่งระหว่าง std. 2 หลอด เช่น อยู่ระหว่างหลอดมาตรฐานที่มีความเข้ม 20 ppb และ 40 ppb จะรายงานผลการอ่านออกมาเป็นช่วง คือ มีอะฟลาทอกซินในช่วง 20-40 ppb

การยืนยันผล

1. ควรมีการกำหนดหลอดมินิคอลัมน์ control คือ ไม่ใส่ตัวอย่าง ใส่เฉพาะสาร Benzene เพียงอย่างเดียว
2. โดยการใช้ยาเบนซินของตัวอย่างใส่ในมินิคอลัมน์ และใส่สาร std. AFB, ที่เราทราบความเข้มข้นที่แน่นอนแล้ว ลงไปในหลอดดังกล่าว แล้วดำเนินการเหมือนเดิม
3. นำทั้ง 2 หลอดนี้ไปอ่านผล ซึ่งร่วมกับหลอดตัวอย่าง และเปรียบเทียบกับหลอดมาตรฐานอีกครั้ง

11.2 การวิเคราะห์กรดไฮโดรไซยานิก (Hydrocyanic acid, HCN)

Hydrocyanic acid ในพืชต่างๆ เกิดอยู่ในรูปของสารพวก Cyanogenetic glycosides สารพวกนี้ โดยมากมักจะพบในถั่ว ข้าวฟ่าง มันสำปะหลัง และพืชอื่น glycosides พวกนี้ เมื่อทำปฏิกิริยากับเอ็นไซม์ หรือสภาพเป็นกรด ก็จะปล่อย hydrocyanic acid ออกมา การวิเคราะห์สารพิษพวกนี้วิเคราะห์ได้หลายวิธี ขึ้นอยู่กับชนิดของอาหาร ว่าเป็นประเภทอาหารแห้งหรืออาหารสด อย่างไรก็ตาม แต่ละวิธีมีทั้งข้อดีและข้อเสียแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับผู้วิเคราะห์จะนิยมใช้วิธีไหนที่เหมาะสมกับอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการของตนเอง เพื่อความสะดวก รวดเร็ว ทุนค่าใช้จ่าย และได้ผลออกมาเชื่อถือได้ จากการทดลองใช้วิธีวิเคราะห์จากห้องปฏิบัติการอาหารสัตว์ พบว่าการวิเคราะห์หา hydrocyanic acid นั้น สามารถที่จะวิเคราะห์ 4 วิธีด้วยกัน คือ

1 การวิเคราะห์หากรดไฮโดรไซยานิก โดยวิธี Acid Titration Method

สารเคมี

- 1 สารละลาย silver nitrate มาตรฐาน 0.02 N
- 2 สารละลาย potassium thiocyanate มาตรฐาน 0.02 N
- 3 Iron alum indicator : ละลาย $\text{FeNH}_4(\text{SO})_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (Ferrous ammonium sulfate hydrate) ในน้ำกลั่น 100 ml. จนกระทั่งมีผลึกของ $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4) \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ เหลือในสารละลาย
- 4 กรดดินประสิว (A.R.)

อุปกรณ์

- 1 Kjeldahl flask ขนาด 800 ml.
- 2 เครื่องกลั่นสำหรับหาไนโตรเจนชนิด Macro Kjeldahl
- 3 Flask ขนาด 250 ml.
- 4 Filtering crucible หรือ gooch crucible

วิธีวิเคราะห์

- 1 บดตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ให้ผ่านตะแกรงขนาด 20 mesh แล้วชั่งตัวอย่างประมาณ 10-20 กรัม ใส่ลงใน Kjeldahl flask
- 2 เติมน้ำกลั่นประมาณ 100 ml. พร้อมกับปิดจุกอย่างที่ปลาย flask แล้วตั้งทิ้งไว้ ประมาณ 2 ชั่วโมง พร้อมกับเขย่า flask เป็นครั้งคราว ขณะที่ตั้งทิ้งไว้
- 3 เติมน้ำกลั่น 100 ml. แล้วรีบนำไปเข้าเครื่องกลั่นไอน้ำ (Steam distil) โดยใช้สารละลาย AgNO_3 มาตรฐาน 0.02 N. ปริมาณ 20 ml. และกรดดินประสิว 1 ml. เป็นตัวจับไฮโดรไซยานิกที่ปลายของเครื่องกลั่น ต้องระวังให้ปลายของเครื่องกลั่นอยู่ใต้ระดับ

สารละลายมาตรฐาน AgNO_3 ทำการกลั่นจนได้สารละลายประมาณ 150 ml. (ใช้ไฟอ่อนๆ ขณะที่ทำการกลั่น)

- 4 นำสารละลายที่ได้มากรองด้วย Filtering crucible หรือ gooch crucible เมื่อกรองหมด ให้ล้าง crucible ด้วยน้ำกลั่นเล็กน้อยประมาณ 5-10 ml.
- 5 นำสารละลายที่กรองรวบรวมทั้งหมดไปไตเตรทด้วยสารละลาย KSCN (Potassium thiocyanate) มาตรฐาน 0.02 N โดยใช้ Iron alum เป็นอินดิเคเตอร์

การคำนวณ

$$\begin{aligned}
 1 \text{ ml. } 0.02 \text{ N AgNO}_3 &= 0.54 \text{ mg. HCN} \\
 \text{HCN (ppm.)} &= \frac{540 \times (\text{ml. } 0.02 \text{ N AgNO}_3)}{\text{น.น. (กรัม) ของตัวอย่างอาหาร}}
 \end{aligned}$$

2 การวิเคราะห์หากรดไฮโดรไซยานิก โดยวิธี Alkaline Titration Method

สารเคมี

- 1 สารละลาย NH_4OH 6 N : ละลาย NH_4OH 840 ml. ในน้ำกลั่น 160 ml.
- 2 สารละลาย KI 5% : ละลาย K 5 กรัม ในน้ำกลั่น 100 ml.
- 3 สารละลาย AgNO_3 มาตรฐาน 0.02 N
- 4 สารละลาย NaOH 2.5% : ชั่ง NaOH 2.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 ml.

อุปกรณ์

- 1 ใช้อุปกรณ์เช่นเดียวกับการทำโดยวิธี Acid Titration Method

วิธีวิเคราะห์

- 1 บดตัวอย่างอาหารที่ต้องการวิเคราะห์ให้ผ่านตะแกรงขนาด 20 mesh แล้วชั่งตัวอย่างประมาณ 10-20 กรัมลงใน Kjeldahl flask แล้วเติมน้ำกลั่นประมาณ 200 ml. พร้อมปิดจุกยางที่ปลาย flask
- 2 ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 2-4 ชั่วโมง พร้อมทั้งเขย่า flask เป็นครั้งคราว
- 3 นำไปเข้าเครื่องกลั่น โดยใช้ 2.5% NaOH จำนวน 20 ml. เป็นตัวจับไฮโดรไซยานิก ที่ปลายของเครื่องกลั่น ทำการกลั่นจนได้สารละลาย 150-160 ml.
- 4 นำสารละลายที่ได้มาถ่ายลงใน volumetric flask ขนาด 250 ml. แล้วปรับปริมาตรของสารละลายให้ได้ 250 ml. ด้วยน้ำกลั่น
- 5 ดูดสารละลายมาครึ่งละ 100 ml. เติมด้วย 6 N NH_4OH 8 ml. และ 5% KI 2 ml. เขย่าให้ผสมกัน แล้วนำไปไตเตรทกับสารละลาย AgNO_3 มาตรฐาน 0.02 N จนกระทั่ง

ได้ตะกอนขาวเกิดขึ้น ถ้าจะให้เห็น end point ชัดเจน ใช้กระดาษสีดำปูรองพื้น flask ขณะทำการไตเตรท

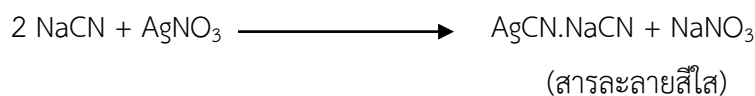
การคำนวณ

$$\begin{aligned}
 1 \text{ ml. } 0.02 \text{ N AgNO}_3 &= 1.08 \text{ mg. HCN} \\
 \text{HCN (ppm.)} &= \frac{1080 \times (\text{ml. } 0.02 \text{ N AgNO}_3)}{\text{น.น. (กรัม) ของตัวอย่างอาหาร}}
 \end{aligned}$$

3 การวิเคราะห์หากรดไฮโดรไซยานิก โดยวิธีของ A.A.C.C

หลักการ

การวิเคราะห์หากรดไฮโดรไซยานิก โดยวิธีนี้ เป็นการหากรดไฮโดรไซยานิกโดยการกลั่นตัวอย่างที่จะวิเคราะห์หา ในสารละลายที่เป็นกรด (Tartaric acid) เพื่อให้กรดไฮโดรไซยานิกปล่อยออกมา แล้วใช้ด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นตัวจับกรดไฮโดรไซยานิก แล้วนำสารละลายที่ได้ไปทำการไตเตรทกับสารละลายมาตรฐาน silver nitrate ในการไตเตรทดังกล่าวนี้ ขึ้นอยู่กับการเกิดสารละลายของ silver cyanide sodium cyanide complexes นี้ ดังสมการที่จะเกิดขึ้น ต่อไปนี้



เมื่อใดที่เติมสารละลายมาตรฐาน silver nitrate ที่มากเกินไปเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ก็จะทำให้เกิดตะกอนขาวขึ้นทันที ทั้งนี้เนื่องจากการเกิด insoluble silver cyanide หรือ ถ้าหากมี potassium iodide ทำให้เห็นตะกอนเด่นชัดขึ้น ตะกอนขาวนี้จะมองเห็นได้ชัดเมื่อทำการไตเตรทใน back ground ที่เป็นสีดำ ที่มีแสงสว่างส่องมาจากด้านข้างๆ

จากสมการข้างบนนี้ จะเห็นได้ว่า 1 molecular fraction ของ silver nitrate จะทำปฏิกิริยาพอดี (equivalent) เท่ากับ 2 molecules ของ sodium cyanide วิธีวิเคราะห์วิธีนี้เหมาะที่จะใช้วิเคราะห์หาในอาหารแห้ง และพวกเมล็ดธัญพืช

สารเคมี

1. สารละลาย NaOH 25%
2. สารละลาย AgNO₃ มาตรฐาน 0.02 N
3. Soda-lead mixture : ละลาย sodium carbonate 200 กรัม ในน้ำกลั่นประมาณ 400 ml. และละลาย lead acetate 20 กรัม ในน้ำกลั่น 450 ml. นำสารละลายทั้ง 2 อันนี้ มาผสมกัน แล้วทำให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร
4. สารละลาย Tartaric acid 10%
5. ด่าง Ammonium hydroxide เข้มข้น (A.R.)

วิธีวิเคราะห์

1. ชั่งอาหารประมาณ 50-100 กรัม (ถ้าเป็นแห้งใช้ 25 กรัม) ใส่ใน flask ที่ใช้สำหรับกลั่น ขนาด 1,000 ml. เติมน้ำกลั่น 250 ml. และ 10% Tartaric acid 50 ml. แล้วรีบนำไปต่อเข้าเครื่องกลั่นทันที
2. ที่ปลายอีกด้านของเครื่องกลั่นให้จุ่มท่อกลั่นลงใน 2.5% NaOH 50 ml. สำหรับเป็นตัวจับกรด HCN
3. ทำการกลั่นจนได้สารละลายประมาณ 400-500 ml.
4. ถ้าสารละลายที่ได้มีตะกอนสีเข้ม (dark precipitation) ให้เติม soda-lead mixture 5 ml. แล้วกรองด้วย gooch crucible ที่ปูด้วย asbestos หรืออาจจะใช้ filtering crucible ก็ได้ แล้วล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง ถ้าสารละลายที่ได้มีสีเข้ม คือไม่มี sulfide เกิดขึ้น ก็ไม่จำเป็นต้องกรอง
5. เติม NH_4OH เข้มข้น 10 ml. และ 2% KI 10 ml. ลงในสารละลายที่ได้จากข้อ 3.3.4 แล้วเขย่าให้ผสมกันแล้วนำไปไทเทรตกับ 0.02 N AgNO_3 จนกระทั่งได้ตะกอนขุ่นขาวเกิดขึ้น
6. ทำ blank ในทำนองเดียวกัน

การคำนวณ

$$\text{Cyanide, HCN (ppm.)} = \frac{(A-B) \times N \text{ AgNO}_3 \times 5.4 \times 10^4}{\text{น.น. (กรัม) ของตัวอย่างอาหาร}}$$

A = ml. AgNO_3 required by sample
 B = ml. AgNO_3 required by blank
 N = Normality of AgNO_3

4 การวิเคราะห์หากรดไฮโดรไซยานิคโดย Colorimetric Method

สารเคมี

1. สารละลาย Alkaline picrate ละลาย Na_2CO_3 จำนวน 25 กรัม และ picric acid 5 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร
2. สารละลาย stock cyanide นำ KCN ชนิด AR grade (98% purity) ไปอบที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปทิ้งให้เย็นในโถอบความชื้น แล้วชั่ง KCN 0.255 กรัม ละลายน้ำ 1 ลิตร สารละลายที่ได้จะมี HCN 0.1 mg/ml. หรือ 1 ml. จะมี HCN = 100 μg .

3. สารละลายกรดเกลือ 3 N ละลายกรดเกลือเข้มข้น 129.45 ml. แล้วทำให้ได้ปริมาตร 500 ml. ด้วยน้ำกลั่น
4. การทำ Alkaline picrate filter paper โดยตัดกระดาษกรอง Whatman No. 1 ให้ได้ขนาด 10 x 2 ซม. แล้วชุบใน Alkaline picrate soln. ให้เปียกแล้วผึ่งให้แห้ง แล้วแขวนกระดาษที่ชุบ alkaline picrate จำนวน 2-3 แผ่น (ขึ้นอยู่กับปริมาณ HCN) แล้วผูกแขวนไว้กับจุกยางที่ใช้สำหรับปิด flask ขนาด 500 ml.
5. การสร้าง std. Curve โดยนำ stock soln. จากข้อ 4.1.2 มา 10 ml. แล้วทำให้ได้ปริมาตร 100 ml. แล้วไปเปิดสารละลายที่เจือจางแล้วนี้ ตามตารางข้างล่างนี้ ใส่ใน flask 500 ml. เติม 3 N HCl 1 ml. รีบแขวนกระดาษที่ชุบ alkaline picrate จำนวน 2 แผ่นไว้กับจุกยางของ flask แล้วรีบปิดจุกยาง พร้อมกันนั้น เขย่า flask ให้สารละลายผสมกันดี เสร็จแล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบแล้วนำกระดาษ picrate ออกมาละลายในน้ำกลั่น 10 ml. แล้วนำไปวัด optical density 515 μm .

Diluted stock cyanide soln.	น้ำกลั่น	Conc. HCN, μm
0	10	0
0.5	9.5	5
1.0	9.0	10
1.5	8.5	15
2.0	8.0	20
2.5	7.5	25
3.0	7.0	30
3.5	6.5	35
4.0	6.0	40
4.5	5.5	45
5.0	5.0	50

การวิเคราะห์ตัวอย่าง

- ก. ถ้าเป็นตัวอย่างสด ชั่งตัวอย่างสด 1 กรัม แล้วนำมาบดให้ละเอียด
- ข. ถ้าเป็นตัวอย่างแห้ง ชั่งตัวอย่างแห้งที่บดละเอียด 1 กรัม

นำตัวอย่างที่ชั่งแล้ว เติมน้ำ 25 ml. แล้วนำกระดาษ picrate 2 แผ่น มาผูกติดกับจุก แล้วปิด flask ทันทัน ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จึงนำไปอบที่อุณหภูมิ 60°C

เป็นเวลา 30 นาที (กรณีอาหารสัตว์มี HCN กระดาษ picrate จะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีน้ำตาล)
แล้วจึงนำกระดาษ picrate ออกมาละลายในน้ำกลั่น 20 ml. และนำไปวัดที่ 515 μm และ
เปรียบเทียบค่าความเข้มข้นของ HCN กับ std. Curve วิธีวิเคราะห์นี้เหมาะที่จะใช้กับอาหารสด