หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

วิธีการดำเนินการวิจัย

การดำเนินการวิจัยได้แบ่งออกเป็น 2 ส่วนใหญ่ คือ

1. การวิเคราะห์ทางเคมี(Chemical Analysis)

เพื่อหาองค์ประกอบต่างๆ ของเมล็ดกระบก ได้แก่ การวิเคราะห์สารอาหารในเมล็ดกระบก โดยวิธี Proximate Analysis วิเคราะห์หาปริมาณของแร่ธาตุด้วย Atomic Absorption Spectrophotometer และปริมาณวิตามินในเมล็ดกระบกโดยวิธีวิเคราะห์ของ AOAC 1980 วิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนในโปรตีนด้วย Amino Acid Analyzer วิเคราะห์ชนิด และปริมาณกรดไขมัน และสาร sterol ในไขมันกระบกด้วย Gas Liquid Chromatography

2. การทดลองทางชีวภาพ(Biological Assay)

เพื่อศึกษาคุณค่าของโปรตีนในเมล็ดกระบก โดยใช้สัตว์ทดลอง

การเตรียมตัวอย่าง ตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์ทางเคมีมีการเตรียมดังต่อไปนี้

1. เมล็ดกระบก นำเนื้อในเมล็ดกระบก(kernel) มาบดให้ละเอียดขนาดผ่านแร่งเบอร์ 40 ได้
2. กากกระบก (defatted meal) นำเนื้อในเมล็ดกระบก (kernel) ใส่เครื่องอัดแบบไฮโดรลิก(hydrolic press) เพื่อบีบเอาไขมันออก ได้ไขมันประมาณร้อยละ 51 ส่วนที่เหลือ เรียกว่า กากกระบก ซึ่งมีประมาณร้อยละ 49 กากที่ได้มีลักษณะเป็นแผ่นบางนำมาบดให้ละเอียดขนาดผ่านแร่งเบอร์ 40 ได้

1. การวิเคราะห์ทางเคมี (Chemical Analysis)

1.1 วิเคราะห์ส่วนประกอบทางเคมี ของสารอาหารในเมล็ดกระบก ได้แก่ ความชื้น โปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน กากใย และเถ้า โดยวิธี Proximate Analysis (9,10)

1.1.1 <u>การหาปริมาณความชื้น</u>โดยวิธี Air & Vacuum Oven Method

เครื่องมือ 1. ตู้อบไฟฟ้า (hot air oven)

2. desiccator

3. weighing dish พร้อมฝา

วิธีวิเคราะห์

1. อบ weighing dish เปล่าพร้อมฝาที่อุณหภูมิ 100 °ซ. + 2 °ซ. นาน 15 นาที ในตู้อบไฟฟ้า แล้วปล่อยให้เย็นใน desiccator ก่อน ชั่งน้ำหนักภาชนะแล้วนำเข้าตู้อบใหม่ และปล่อยให้เย็นก่อนชั่งเป็นครั้งที่ 2 ทำเช่นนี้เรื่อยไป จนได้น้ำหนักคงที่คือมีน้ำหนักไม่ต่างจากครั้งก่อน 1-3 มิลลิกรัม

2. ชั่งตัวอย่างที่บดละเอียดใน weighing dish ประมาณ 5 กรัม อบในตู้อบ 100 + 2° ซ. นาน 6 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นใน desiccator แล้วชั่งน้ำหนักโดยเร็ว เมื่อน้ำหนักที่ได้ยังไม่คงที่ นำไปอบต่ออีก 1-2 ชั่วโมง จนชั่งได้น้ำหนักคงที่ น้ำหนักที่หายไปเป็นปริมาณความชื้นทั้งหมด ซึ่งคำนวณได้จากสูตรดังต่อไปนี้

% ความชื้น = (น้ำหนักที่หายไป/น้ำหนักตัวอย่าง) x 100

1.1.2 <u>การหาปริมาณโปรตีน</u> วิธี Kjeldahl's method(9)

เครื่องมือ 1. เครื่องย่อยและเครื่องกลั่นแบบ Kjeldahl's (Buchi 342)
2. Kjeldahl flask ขนาด 300 มิลลิลิตร
3. Erlenmeyer flask ขนาด 500 มิลลิลิตร
4. Burette ขนาด 50 มิลลิลิตร
5. กระบอกตวง ขนาด 100 มิลลิลิตร

สารเคมี 1. Oxidation Catalyst ประกอบด้วย K_2SO_4 ร้อยละ 95 และ $CuSO_4$ ร้อยละ 5
2. กรดซัลฟุริกเข้มข้น
3. 40 % สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์
4. 4 % สารละลายอิ่มตัวของกรดบอริค
5. กรดซัลฟุริกเข้มข้นมาตรฐาน(0.1 N)
6. Modified Methyl Red Indicator เตรียมโดยละลาย Methyl Red 1.250 กรัม และ Methyl Blue 0.825 กรัม ในเอธานอล จำนวน 1 ลิตร

วิธีวิเคราะห์

1. ตัวอย่างที่บดละเอียดนำมาอบให้แห้ง ทิ้งให้เย็นจึงชั่งน้ำหนักประมาณ 1 กรัม ใส่ใน Kjeldahl flask ขนาด 300 มิลลิลิตร

2. เติม Oxidation catalyst น้ำหนัก 5 กรัม และกรดซัลฟุริกเข้มข้น 25 มิลลิลิตร ตั้งบนเตาเพื่อย่อยตัวอย่างให้กลายเป็นสารละลาย เมื่อสารละลายใสหมดแล้ว ให้ย่อยต่ออีกนาน 20-30 นาที เพื่อให้ไนโตรเจนในโปรตีนกลายเป็นอนินทรีย์สารอย่างสมบูรณ์ แล้วทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

3. นำสารละลายจากข้อ 2 มาเติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร และสารละลาย 40 % โซเดียมไฮดรอกไซด์ 80 มิลลิลิตร นำไปกลั่นบนเตาของเครื่องกลั่น Kjeldahl Apparatus(Buchi 342) นาน 5 นาที เพื่อเปลี่ยนเป็นแอมโมเนีย จับแอมโมเนียที่ระเหยออกมาด้วยสารละลายอิ่มตัวของกรดบอริก 50 มิลลิลิตร ที่เติม modified methyl red indicator 2-3 หยด จะเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเขียว

4. นำสารละลายอิ่มตัวของกรดบอริคที่ได้ไปไตเตรตกับ 0.1 N.H_2SO_4 ที่จุดสมบูรณ์จะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน คำนวณหาค่าโปรตีนในเมล็ดกระบกแห้ง จากสูตร

% โปรตีน = [(0.014 x N x V x factor) / Wt of sample] x 100

โดยมีปัจจัยดังต่อไปนี้

factor = 6.25

N = ความเข้มข้นของกรดซัลฟุริกมาตรฐาน

V = ปริมาตรของกรดซัลฟุริกมาตรฐาน

1.1.3 <u>การวิเคราะห์หาปริมาณไขมัน</u> โดยวิธี(Solvent Extraction) (10)

เครื่องมือ 1. Goldfisch Fat Extraction Apparatus

2. Porcelain thimble

3. Beaker สำหรับหาไขมัน ขนาด 150 มิลลิลิตร

สารเคมี 1. n-hexane

วิธีวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่างที่บดละเอียด และอบแห้งใส่ porcelain thimble ประมาณว่าใช้ตัวอย่างมากพอที่จะบรรจุได้ราว 3 ใน 4 ส่วนของความสูงของ thimble ใช้ n-hexane เป็นตัวทำละลายใส่ใน beaker ที่อบแห้งจนได้น้ำหนักคงที่แล้ว ประกอบ thimble, beaker และ condensor ของเครื่อง Goldfisch Extractor เข้าด้วยกัน

2. เลื่อนเตาไฟฟ้าข้างใต้ให้ชิด beaker เมื่อ n-hexane เริ่มเดือด ให้เริ่มจับเวลา และปล่อยให้การสกัดไขมันดำเนินไปประมาณ 6 ชั่วโมง นำสารละลายที่ได้นี้มาระเหยเพื่อไล่ n-hexane ออกให้หมด จะได้ของเหลวข้นๆ นำไปอบในตู้อบที่ 100° ซ. จนได้น้ำหนักคงที่

3. น้ำหนักของ beaker ที่เพิ่มขึ้น เป็นน้ำหนักของไขมันที่สกัดได้ นำมาคำนวณปริมาณไขมันตามสูตรข้างล่างนี้

% ไขมัน = (น้ำหนักของไขมันที่สกัดได้ / น้ำหนักตัวอย่าง) x 100

1.1.4 <u>การหาปริมาณกากใย (Crude Fiber)</u> โดยวิธีของ Osborne (10)

เครื่องมือ 1. Crude Fiber Apparatus
2. Beaker สำหรับการหากากใย ขนาด 600 มิลลิลิตร
3. Fluted Funnel
4. ตู้อบไฟฟ้า
5. Desiccator

สารเคมี 1. สารละลายกรดซัลฟุริก 1.25 % w/v
2. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.25 % w/v
3. แอลกอฮอล์ 95 %

วิธีวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่างที่สกัดเอาไขมันออกแล้วจากข้อ 1.1.3 ประมาณ 2 กรัม ใส่ใน beaker สำหรับการย่อยขนาด 600 มิลลิลิตร

2. เติม 1.25 % กรดซัลฟุริก จำนวน 200 มิลลิลิตร ตั้งบนเตาไฟฟ้าในเครื่องมือ ปล่อยให้ reflux นาน 30 นาที จึงนำมากรองผ่านตัวกรอง และล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นที่เดือด จนกว่าจะเป็นกลาง

3. นำตะกอนที่กรองได้ถ่ายใส่ beaker แล้วเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.25 % จำนวน 200 มิลลิลิตร ตั้งบนเตาเพื่อ reflux ต่ออีกนาน 30 นาที จึงนำมากรองผ่านตัวกรอง และล้างด้วยน้ำกลั่นที่กำลังเดือดจนกว่าจะเป็นกลาง

4. ล้างตะกอนด้วย 95 % แอลกอฮอล์ นำตัวกรองนั้นไปอบในตู้ไฟฟ้าที่ 100 ถึง 105 ° ซ. นาน 3 ชั่วโมง ชั่งแล้วอบจนได้น้ำหนักคงที่ (M_1) ล้างกากเส้นใยออกจากตัวกรองด้วยน้ำ แล้วนำไปอบจนได้น้ำหนักคงที่ (M_2) คำนวณหากากใยตามสูตรดังต่อไปนี้

$$\% \text{ กากใยอาหาร} = [\{(M_1 - M_2)/\text{น้ำหนักตัวอย่าง}\} \times 100] - \% \text{ ปริมาณเถ้า}$$

1.1.5 <u>การหาปริมาณเถ้า(Ash)</u> โดยวิธี Ashing ใน Muffle Furnance

เครื่องมือ 1. Porcelain Crucible ทนไฟ ขนาด 10 มิลลิลิตร (Rosenthall)

2. Desiccator

3. เตาไฟฟ้า(Hot plate) หรือ Bunsen burner

4. เตาเผา(Muffle furnance,Gallenkamp)

วิธีวิเคราะห์

1. ล้าง Porcelain Crucible ขนาด 10 มิลลิลิตรให้สะอาด แล้วอบให้แห้งจนมีน้ำหนักคงที่ ชั่งน้ำหนักไว้ (M_2)

2. ชั่งตัวอย่างประมาณ 5 กรัม ใส่ใน Porcelain Crucible ที่ชั่งแล้วตามข้อ 1 ตั้งบนเตาไฟฟ้าหรือ Busen burner เพื่อเผาเบื้องต้น จนกระทั่งตัวอย่างเป็นสีดำ และไม่มีควันออกมา

3. นำตัวอย่างนี้ไปเผาให้เป็นเถ้า ในเตาเผาที่ 550° ซ. จนกระทั่งเถ้าเป็นสีขาว ซึ่งจะใช้เวลาเผาไม่ต่ำกว่า 8 ชั่วโมง

4. นำออกมาทิ้งให้เย็นใน desiccator แล้วชั่งน้ำหนักคงที่(M_1) นำไปคำนวณหาปริมาณเถ้าได้จากสมการ

$$\% \text{ เถ้า} = [(M_1 - M_2) / \text{น้ำหนักตัวอย่าง}] \times 100$$

1.1.6 <u>การหาปริมาณคาร์โบไฮเดรต</u> จากการคำนวณ

จากส่วนประกอบของอาหารทั้งหมดเป็น 100 ส่วน ถ้าหักค่ารวมของความชื้น โปรตีน ไขมัน กากใยและเถ้าออกแล้ว ค่าที่เหลือจึงเป็นค่าของคาร์โบไฮเดรต ซึ่งย่อยด้วยกรดและด่างได้ ดังสมการข้างล่างนี้

$$\% \text{ คาร์โบไฮเดรต} = 100 - (\% \text{ ความชื้น} + \% \text{ โปรตีน} + \% \text{ ไขมัน} + \% \text{ กากใย} + \% \text{ เถ้า})$$

1.2 วิเคราะห์ปริมาณของแร่ธาตุ พวกที่เป็น Macroelement เช่น Ca, P และ Fe พวกที่เป็น electrolyte เช่น Na และ K และ trace elements เช่น Mn, Mg, Cu และ Zn ในเมล็ดกระบก

เครื่องมือ 1. Digestion tube ขนาด 100 มิลลิลิตร

2. ปิเปต ขนาด 2, 5, 10, 20 และ 25 มิลลิลิตร

3. Volumetric flask ขนาด 100 และ 250 มิลลิลิตร

4. Atomic Absorption Spectrophotometer (Shimadzu AA-650)

5. Ultraviolet Spectrophotometer (Unicam SP 1800)

สารเคมี 1. กรดซัลฟุริกเข้มข้น

2. กรดไนตริกเข้มข้น

3. สารละลายกรดไฮโดรคลอริก 10 %

4. น้ำกลั่นชนิดปราศจากแร่ธาตุ(กลั่น 3 ครั้ง)

5. Potassium dihydrogen phosphate(KH_2PO_4)

6. สารละลายแอมโมเนียเจือจาง

7. Vanadate molybdate composite reagent ซึ่งเตรียมโดยละลาย ammonium molybdate 20 กรัม ในน้ำกลั่นที่ 50 ° ซ. ปริมาตร 400 มิลลิลิตร แล้วเทลงในสารละลาย ammonium vanadate 1 กรัม ในน้ำกลั่นเดือด 300 มิลลิลิตร ที่มีกรดไนตริกเข้มข้นอยู่ 140 มิลลิลิตร ซึ่งทิ้งไว้ให้เย็นก่อนจะเทรวมกัน และคนจนเข้ากันดีจึงปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

วิธีวิเคราะห์

1. ภาชนะทุกชิ้น ก่อนใช้ให้แช่ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 10 % แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นชนิดปราศจากแร่ธาตุ หรือน้ำกลั่น 3 ครั้ง จนภาชนะทุกชิ้นปราศจากแร่ธาตุอื่นเจือปน

2. ชั่งตัวอย่างที่อบแห้งแล้วประมาณ 1 กรัมใส่ใน digestion tube ขนาด 100 มิลลิลิตร ทำการย่อยโดยวิธี wet digestion (11) ใช้กรดซัลฟุริกเข้มข้น 10 มิลลิลิตร และกรดไนตริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ต้มที่ 250 °ซ. จนหมดควันสีเหลืองของ nitrous oxide

3. ถ้าสารละลายยังเป็นสีน้ำตาลเข้มให้หยดกรดไนตริกเพิ่มครั้งละ 3-4 หยด ต้มต่อไปจนกระทั่งได้สารละลายใสสีเหลืองอ่อน และจนหมดควันของกรดซัลฟุริก ใช้เวลาทั้งหมดประมาณ 6 ชั่วโมง

4. เตรียม blank โดยใช้ปริมาณของกรดที่เติมเท่าๆ กัน แต่ไม่มีตัวอย่าง

5. นำตัวอย่างที่ย่อยสมบูรณ์แล้ว ออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็น แล้วถ่ายใส่ใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากแร่ธาตุ จนครบปริมาตร แล้วแบ่งไปใช้วิเคราะห์ปริมาณแคลเซี่ยม โซเดียม โพแทสเซียม แมงกานีส แมกนีเซียม ทองแดง เหล็ก และสังกะสี โดยใช้เครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer (Shimadzu AA-650)

6. สารละลายอีกส่วนแบ่งไปวิเคราะห์หาปริมาณฟอสฟอรัส (12) โดยทำให้เกิดสีด้วย vanadate molybdate composite reagent

ก. เตรียมสารละลายมาตรฐาน standard phosphate solution โดยเตรียมสารละลาย KH_2PO_4 3.834 กรัม/ลิตร ก่อน แล้วนำสารละลายนี้มา 25 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้เป็น 250 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้นของสารละลาย 1 มิลลิลิตร ที่มี 0.2 มิลลิกรัมของ P_2O_5

ข. เตรียมสารละลายมาตรฐาน ที่มีความเข้มข้นต่างกันเป็นระดับ โดยปิเปตสารละลายมาตรฐาน 0, 2.5, 5, 10, 20, 30, 40 และ 50 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวม 50-60 มิลลิลิตร จึงเติมสารละลายแอมโมเนียเจือจาง 2-3 หยด ให้สารละลายเป็นกลาง แล้วเติมกรดไนตริกให้เป็นกรดเล็กน้อย

ค. ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่ได้จากข้อ 5 มา 10-20 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวม 50-60 มิลลิลิตร จึงเติมสารละลายแอมโมเนีย 2-3 หยด ให้สารละลายเป็นกลาง แล้วเติมกรดไนตริกให้เป็นกรดเล็กน้อย

ง. เติม Vanadate molybdate composite reagent 25 มิลลิลิตร ลงในสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างที่เตรียมไว้ในข้อ ข. และ ค. แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 10 นาที วัด absorbance ที่ 470 nm. โดยใช้เครื่อง Ultraviolet Spectrophotometer (Unicam SP 1800)

จ. คำนวณปริมาณฟอสฟอรัสจากกราฟมาตรฐานที่ได้จากสารละลายมาตรฐาน ขณะที่ทำการทดลองพร้อมกัน

1.3 วิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดอะมิโน ในเมล็ดกระบก โดยวิธีของ Mason และคณะ(13)

เครื่องมือ

1. Round bottom flask ขนาด 100 มิลลิลิตร
2. Ice water bath
3. Rotary evaporator
4. Sand bath
5. Amino Acid Analyzer (Hitachi 835-50)

สารเคมี

1. 30 % Hydrogen peroxide
2. 89 % w/w Formic acid และ 6 N. HCl
3. Phenol
4. Sodium pyrosulphite
5. Octyl alcohol
6. Lithium Loading Buffer
7. สารละลายอิ่มตัวของ Lithium hydroxide
8. Performic acid เตรียมจาก 30 % Hydrogen peroxide 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับ 29 % w/w Formic acid 45 มิลลิลิตร และ Phenol 25 มิลลิกรัม แล้ว incubate ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30° ซ.นาน 60 นาที ทิ้งให้เย็นแล้วแช่ใน Ice water bath นาน 15 นาที

015348

110301781

วิธีวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่างกากกระบกที่บดละเอียด และแห้ง ให้มีปริมาณไนโตรเจนประมาณ 10 มิลลิกรัม ใส่ใน round bottom flask ขนาด 100 มิลลิลิตร

2. เติม performic acid ลงในตัวอย่างข้อ 1. อย่างช้าๆ และระมัดระวัง คนให้เข้ากันด้วย glass spatula แล้วปิดภาชนะให้สนิทด้วย parafilm เก็บแช่ในช่องแข็งที่ 0 ° ซ. นาน 16 ชั่วโมง จะเกิดปฏิกิริยา oxidation อย่างช้าๆ แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วย Sodium pyrosulphite 840 มิลลิกรัม

3. ไล่ Formic acid ที่เหลือออกโดยใช้ Rotary evaporator (อุณหภูมิไม่เกิน 40 ° ซ.) แล้วเติม Octyl alcohol ต้องระวังอย่าให้ตัวอย่างเดือด ให้ตัวอย่างที่ถูก oxidazed แล้ว ใกล้จะแห้ง จึงเอาออกจาก evaporator

4. นำ oxidized sample จากข้อ 3. มา hydrolyse ด้วย 6 N. HCl 50 มิลลิลิตร และ phenol 50 มิลลิกรัม บน sand bath ที่อุณหภูมิ 180-200 ° ซ. เป็นเวลานาน 23 ชั่วโมง แล้วเอาออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นใน cold water bath จึงนำไปเจือจางให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ด้วย 6 N. HCl

5. ปิเปตตัวอย่างที่ถูก hydrolyse แล้วมา 25 มิลลิลิตร ใส่ใน round bottom flask ขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วนำไประเหยด้วย rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 40-50 °ซ. จนกระทั่งเหลือตัวอย่างประมาณ 1 มิลลิลิตร อย่างช้าๆ ทำให้เจือจางด้วย lithium loading buffer 50 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ให้ได้ 2.2 ด้วยสารละลายอิ่มตัวของ lithium hydroxide

6. นำตัวอย่างที่ได้ในข้อ 5. ในปริมาตรที่พอเหมาะ ฉีดเข้าเครื่อง Amino Acid Analyzer (Hitachi 835-50) ซึ่งปรับให้มีสภาวะดังต่อไปนี้

Analytical Column	:	2.6x250 mm (Resin # 2619)
Flow Rate	:	0.275 ml/min (200 kg/cm^2) สำหรับ P_1
	:	0.3 ml/min (20 kg/cm^2) สำหรับ P_2
Sample	:	5 nmol/50 ul (500 mV range)
Ammonia Filter Column	:	4x200 mm (Resin # 2650)

7. แปลผลจากโครมาโตรแกรมที่ได้ เปรียบเทียบชนิดกรดอะมิโน และคำนวณปริมาณกรดอะมิโน ตามรายละเอียดในภาคผนวก ค.3

1.4 **วิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดไขมัน ในเมล็ดกระบก** โดยวิธีของ Draft International Standard (14,15)

เครื่องมือ 1. Sand bath
2. ปิเปต ขนาด 5 มิลลิลิตร
3. Pear Shape Flask ขนาด 25 มิลลิลิตร
4. เครื่องควบแน่น
5. Microsyringe ขนาด 5 ไมโครลิตร
6. Gas Liquid Chromatography (Perkin Elmer F22)

สารเคมี 1. Ø.5 N. NaOH ใน Methanol
2. 14 % BF_3-Methanol
3. n-Heptane
4. สารละลายอิ่มตัวของโซเดียมคลอไรด์
5. Anhydrous Sodium Sulphate

วิธีวิเคราะห์

1. เตรียม methyl ester ของกรดไขมัน

ก. นำไขมันกระบกที่แยกได้ตามข้อ 1.1.3 มาหลอมเหลว ซึ่งน้ำมันที่หลอมเหลวแล้วประมาณ 5 หยด หรือประมาณ 150 มิลลิกรัม ใส่ขวดรูปแพร์ขนาด 25 มิลลิลิตรพร้อม glass bead 1 เม็ด

ข. เติม Ø.5 N. NaOH ใน Methanol 5 มิลลิลิตร แล้วจึงต่อเข้ากับเครื่องควบแน่นและ reflux บน sand bath ที่ 120-150 °ซ. ให้เดือดนาน 5-8 นาที

ค. เติมสารละลาย 14 % BF_3-Methanol 5 มิลลิลิตร ลงใน flask แล้ว reflux ต่ออีก 2 นาที จึงปิเปต n-heptane 5 มิลลิลิตร เติมลงไป reflux ต่ออีก 1 นาที

ง. ยกขวด พร้อมเครื่องควบแน่นออกจาก sand bath ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติมสารละลายอิ่มตัวของ sodium chloride ลงใน flask ตั้งทิ้งไว้ให้ชั้น heptane แยกออกมาอยู่ชั้นบน

จ. ดูดเอามาเฉพาะชั้นเฮปเทนใส่ในหลอดทดลองที่มี anhydrous sodium sulphate เพื่อดูดเอาความชื้นออก ตั้งทิ้งไว้จนสารละลายใส กรองสารละลายที่ได้ผ่านสำลี ลงในอีกหลอดทดลอง ระเหยสารละลาย heptane ออกด้วยก๊าซไนโตรเจน จนเหลือปริมาตร 2 มิลลิลิตร

2. หาชนิด และปริมาณของกรดไขมัน โดยเครื่อง Gas Liquid Chromatography (Perkin Elmer F22)

ก. ฉีดสารละลายที่เตรียมไว้ในข้อ 1. ประมาณ 2 ไมโครลิตร หรือปริมาณที่พอเหมาะเข้าเครื่อง Gas Liquid Chromatograohy ซึ่งปรับให้มีสภาวะดังต่อไปนี้

Column stainless steel	ขนาด 6' x 1/8" บรรจุ 5 % DEGS จาก Chromosorb G AW DMCS # 60-80 mesh
Injection temperature	250 ° ซ.
Detection temperature	300 ° ซ.
Column temperature	130-195 °ซ.
Carrier gas (N_2) flow rate	28 ml./min.
Attenuation	10 x 256 หรือ 10 x 512
Chart speed	5 mm./min.

ข. เปรียบเทียบโครมาโตรแกรมที่ได้กับโครมาโตรแกรมมาตรฐานของ Reference Fatty acid Ester และคำนวณปริมาณจากพื้นที่ใต้กราฟ ดังรายละเอียดในภาคผนวก ค.6

1.5 วิเคราะห์ชนิดและปริมาณ sterol ในเมล็ดกระบก (16)

เครื่องมือ

1. Steam bath
2. Conical flask ขนาด 250 มิลลิลิตร
3. เครื่องควบแน่น
4. U.V. Lamp
5. Polygram Sil G precoated plates
6. Glass developing tank ขนาด 20 x 20 ซม.
7. Microsyringe ขนาด 5 ไมโครลิตร
8. Gas Liquid Chromatography
   (Perkin Elmer F22)
9. Pasteur pipette
10. กรวยแยก (Separating funnel) ขนาด 500 มล.
11. Vial ขนาด 3 มิลลิลิตร

สารเคมี

1. Industrial Methylated Spirit (IMS)
2. สารละลายเข้มข้นของโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์
3. Diethyl ether
4. Heptane
5. Acetone
6. Chloroform
7. Developing solvent ของ
   Hexane : ethyl acetate = 4 : 1 v/v
8. Dichlorofluorescein solution
   (2,7-dichlorofluorescein 0.05 กรัมต่อ 100 มิลลิกรัม IMS
9. Internal Standard (5-a-cholestane 20 มิลลิกรัม ใน 50 กรัม dry pyridine)

สารเคมี 10. Standard cholesterol solution (ละลาย cholesterol 20 มิลลิกรัม ใน 50 กรัม dry pyridine)

11. BSA reagent [N-O-bis-(trimethylsilyl)-acetamide]

วิธีวิเคราะห์

1. แยกส่วน Unsaponifiable matter ออกจากไขมันกระบก

ก. นำไขมันกระบกที่แยกได้ตามข้อ 1.1.3 มาหลอมเหลวและชั่งน้ำหนักประมาณ 1-5 กรัม ลงใน conical flask ขนาด 250 มิลลิลิตร เติม IMS 50 มิลลิลิตร และสารละลายเข้มข้นของโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (3 กรัม/2 มิลลิลิตร) จำนวน 3 มิลลิลิตร

ข. ต่อ conical flask เข้ากับเครื่องควบแน่นแล้ว reflux บน steam bath นาน 1 ชั่วโมง แล้วถ่ายใส่กรวยแยก(separating funnel) ขนาด 500 มิลลิลิตร ขณะยังร้อนอยู่

ค. ล้าง conical flask ด้วยน้ำกลั่นครั้งละ 50 มิลลิลิตร 2 ครั้ง แล้วล้างต่อด้วย diethyl ether ครั้งละ 25 มิลลิลิตร อีก 2 ครั้ง ถ่ายใส่กรวยแยกใบแรก โดยเขย่าเบาๆ แล้วตั้งทิ้งไว้

ง. แยกเอาเฉพาะชั้นของ diethyl ether ในกรวยแยกใบแรกใส่กรวยแยกอีกใบ ส่วนชั้นน้ำนั้น นำมาสกัดด้วย diethyl ether อีก 2 ครั้ง แล้วรวมใส่ในกรวยแยกใบที่ 2

จ. ล้างชั้นของ diehtyl ether ด้วยน้ำกลั่น จนกระทั่งหมดด่าง จึงถ่ายใส่ flask ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วนำไประเหยจนแห้งจะได้ส่วนของ Unsaponifiable matter แห้งอยู่บนก้นภาชนะนั้น แล้วเติม acetone 25 มิลลิลิตร ระเหยต่อจนไม่มีของเหลวอยู่บน flask นั้น

2. แยก Sterol ออกจาก Unsaponifiable matter

ก. ละลายส่วน Unsaponifiable matter จากข้อ 1 (จ.) ใน chloroform เล็กน้อย แล้วนำไปหยดลงบนแผ่น Polygram Sil G precoated plates โดยมี silica gel หนา 0.25 mm. บนแผ่นพลาสติก และหยดสารมาตรฐาน beta-sitosterol ลงในแผ่นเดียวกันด้วย

ข. นำแผ่น plate ใส่ใน chromatographic tank ที่อิ่มตัวด้วย developing solvent ของ hexane : ethyl acetate = 4 : 1 v/v จำนวน 150 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ให้ตัวทำละลายวิ่งไปถึงขอบบนของแผ่น จึงเอาออกและปล่อยให้แห้ง แล้วพ่นด้วย dichlorofluorescein solution เฉพาะบริเวณสารมาตรฐาน โดยใช้แผ่นพลาสติกปิดบริเวณสารตัวอย่าง

ค. นำมาตรวจดูภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานทำเครื่องหมายที่แถบของ sterol band ขูดเฉพาะส่วน sterol ของตัวอย่างที่ระดับเดียวกับสารมาตรฐานออกใส่ใน beaker นำมาเติม chloroform แล้วอุ่นบน water bath เพื่อละลายส่วน sterol นี้ออกโดยระวังไม่ให้ร้อนมากเพราะจะทำให้เกิดการกระเด็นสูญหายได้ นำมากรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 จะได้สารละลาย chloroform extract ทำเช่นนี้ 3 ครั้ง รวบรวม chloroform extract ไว้ ระเหยด้วยก๊าซไนโตรเจนให้เหลือปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วใช้ pasteur pipette ดูดขึ้นมาประมาณครึ่งหนึ่ง ถ่ายใส่ Vial ขนาด 3 มิลลิลิตร แล้วทำให้ส่วนนี้แห้งด้วยก๊าซไนโตรเจนเสียก่อนจึงดูดส่วนที่เหลือมาเติม แล้วทำให้แห้งอีก จะได้ของเหลวที่ เข้มข้นอยู่ใน Vial

3. การเตรียม Trimethylsilyl derivative

ก. เติม Internal standard จำนวน 1 มิลลิลิตร ลงในของเหลวที่ระเหยเกือบแห้งตามข้อ 2.(ค.) แล้วเติม BSA reagent 0.5 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่ 70-75 °ซ. นาน 2 ชั่วโมง แล้วทำให้แห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน จะได้ตะกอนนอนก้นหลอด

ข. เตรียม standard cholesterol solution 1 มิลลิลิตร ซึ่งเติม internal standard solution 1 มิลลิลิตร และทำปฏิกิริยากับ BSA reagent 0.5 มิลลิลิตร ที่ 70-75 ° ซ. นาน 2 ชั่วโมง ควบคู่ไปด้วย

ค. ละลายตะกอนด้วย dry ethyl acetate จำนวนน้อยที่สุด แล้วนำไปฉีดเข้าเครื่อง Gas Chromatography โดยปรับสภาวะให้ได้ดังต่อไปนี้

Column : 7 ft x 1/4 in O.D.glass(silanised), ie. about 2mx2mm i.d.

Liquid phase : 3 % OV 17 (silicone rubber) or equivalent

Solid phase : 80-100 mesh chromosorb W (HP)

Carrier gas : Nitrogen flow rate 20 ml min^{-1}

Injector temp : 300 °ซ.

Detector temp : 300 °ซ.

Oven temp : 270 °ซ.

Sample size : 1 ไมโครลิตร

Attenuation : 1-10 x 10^{1}

ง. หาชนิด sterol โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน และค่าคำนวณปริมาณ sterol จากพื้นที่ใต้กราฟ

1.6 วิเคราะห์หาปริมาณวิตามิน บี 1, บี 2, เอ, อี, และไนอะซิน ในเมล็ดกระบก

1.6.1 การวิเคราะห์หาปริมาณวิตามิน บี 1 ตาม AOAC 1980 (17)

เครื่องมือ 1. Water bath

2. เครื่อง centrifuge

3. Spectrofluorometer (Kontron SFN 23 B)

4. Volumetric flask ขนาด 100, 200, 500 และ 1000 มิลลิลิตร

สารเคมี 1. USP Thiamine Hydrochloride Reerance

2. 20 % Alcohol

3. 0.1 N. HCl

4. Thymol blue

5. Sodium Chloride หรือ Potassium Chloride

6. Isobutanol

วิธีวิเคราะห์

1. เตรียมสารละลายมาตรฐาน

ก. Stock thiamine hydrochloride standard solution

ชั่ง USP Thiamine HCl Reference อย่างละเอียด ให้ได้น้ำหนักระหว่าง 50-60 มิลลิกรัม แล้วนำมาละลายใน 20 % alcohol ปรับ pH ให้ได้ระหว่าง 3.5-4.3 ด้วย HCl แล้วเจือจางด้วย acidified alcohol ให้ได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม Thiamine HCl/ml. เก็บไว้ในขวดสีชาที่ 10 ° ซ.

ข. Intermediate solution

ใช้ stock solution 100 มิลลิลิตร ทำให้เจือจางด้วย 20 % alcohol เป็น 1000 มิลลิลิตรแล้วปรับ pH ให้ได้ระหว่าง 3.5-4.3 ด้วย HCl เก็บที่ 10 °ซ.

ค. Standard solution

ใช้ intermediate solution มา 5 มิลลิลิตร เจือจางเป็น 250 มิลลิลิตร ด้วย 0.1 N. HCl จะได้สารละลาย Standard Thiamine HCl Solution 0.2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

2. การเตรียมตัวอย่าง แบ่งเป็น 3 ขั้นตอน คือ

ก. Hydrolysis

ชั่งเมล็ดกระบกแห้ง ที่บดละเอียดแล้ว ให้มีความเข้มข้นของ Thiamine ประมาณ 0.2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เติม 0.1 N. HCl จำนวน 15 มิลลิลิตรต่อ 1 กรัม ของตัวอย่าง ตั้งบน Water bath ที่ 95-100 °ซ. คนสม่ำเสมอ ให้ของแข็งลอยอยู่ใน suspension นั้นนาน 30 นาที

ข. Extraction

แยกเฉพาะส่วนใส มาทดสอบด้วย thymol blue ให้มี pH ระหว่าง 1.0-1.2 ปรับด้วย 0.1 N. HCl ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จึง centrifuge ตัวอย่างให้ชั้นบนเป็นสารละลายใส กรองผ่านตัวกรองหรือกระดาษกรองที่ไม่ดูดซับ thiamine (ash free papers)

ค. Oxidation

ชั่ง NaCl หรือ KCl 2.5 กรัม ใส่ในแต่ละหลอดทดลอง ซึ่งมีทั้งหมด 4 หลอด และเติมสารละลายในหลอดต่างๆ ดังนี้

หลอด 1 เติมสารละลายตัวอย่างที่เตรียมไว้ในข้อ 2.(ข.) 5 มิลลิลิตร

หลอด 2 เติมสารละลายตัวอย่างที่เตรียมไว้ในข้อ 2.(ข.) 5 มิลลิลิตร และ 15 % NaOH 3 มิลลิลิตร

หลอด 3 เติมสารละลายมาตรฐานในข้อ 1.(ค.) 5 มิลลิลิตร

หลอด 4 เติมสารละลายมาตรฐานในข้อ 1.(ค.) 5 มิลลิลิตร และ 15 % NaOH 3 มิลลิลิตร

เขย่าเบาๆ จนละลายหมด จึงวัด fluorescence ที่ 365 nm. ด้วยเครื่อง Spectrofluorometer (Kontron SFN 23 B) ได้

ค่า fluorescence ของ สารละลายตัวอย่าง = 1

ค่า fluorescence ของ สารละลายตัวอย่าง ที่เติม 15 % NaOH 3 มิลลิลิตร = b

ค่า fluorescence ของ สารละลายมาตรฐาน = s

ค่า fluorescence ของ สารละลายมาตรฐาน ที่เติม 15 % NaOH 3 มิลลิลิตร = d

ง. คำนวณค่า

มิลลิกรัม Thiamine HCl ใน 5 มิลลิลิตรของสารละลายตัวอย่าง = (1-b)/(s-d)

1.6.2 <u>การวิเคราะห์หาปริมาณวิตามิน บี 2</u> ตาม AOAC 1980 (17)

เครื่องมือ 1. Steam bath

2. Volumetric flask ขนาด 100, 200, 500, 1000 มิลลิลิตร

3. บิเปต ขนาด 10, 50 มิลลิลิตร

4. Spectrofluorometer (Kontron SFN 23 B)

สารเคมี 1. USP Riboflavin Reference Standard

2. 0.02 N. Acetic acid

3. 4 % Potassium permanganate solution

4. 3 % Hydrogen peroxide

วิธีวิเคราะห์

1. เตรียมสารละลายมาตรฐาน

ก. Stock Riboflavin Solution

ละลาย USP Riboflavin Reference Standard 50 มิลลิกรัม ใน 0.02 N. กรดอะซิติก ให้ได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ตั้งบน steam bath จะช่วยให้ละลายเร็วขึ้น เก็บภายใต้ toluene ที่ 0 ° ซ. จะมีความเข้มข้นของ Riboflavin 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ข. Intermediate solution

ใช้ Stock Riboflavin Solution 100 มิลลิลิตร เจือจางด้วย 0.02 N. กรดอะซิติก ให้ได้ปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตรเก็บภายใต้ toluene ที่ 0 ° ซ. จะมีความเข้มข้นของ Riboflavin 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ค. Working solution

เจือจาง Intermediate solution 10 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร น้ำยานี้จะต้องเตรียมใหม่ทุกครั้ง มีความเข้มข้นของ Riboflavin 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

2. การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

ชั่งเมล็ดกระบกแห้งที่บดละเอียดประมาณ 1 กรัม เติม Ø.1 N.HCl 1Ø มิลลิลิตร ให้มี Riboflavin Ø.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เขย่าแล้วนำไปเข้า autoclave ที่อุณหภูมิ 121-123 °ซ. นาน 3Ø นาที ถ้าเกิดเป็นก้อน ให้เขย่าแรงๆ ให้กระจายออก ปรับ pH ให้ได้ 6.Ø-6.5 ด้วยสารละลายด่าง ถ้ามีตะกอนเกิดขึ้นอีกให้เติมสารละลายกรดเกลือซนิดเจือจาง จนกระทั่งตะกอนหมดไป ปรับปริมาตรแล้วกรองผ่านกระดาษกรอง

3. การทำให้เกิดสี

ปิเปตสารละลายตัวอย่างจากข้อ 2. มา 1Ø มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลอง 4 หลอด โดย 2 หลอดแรก เติม Standard Working Solution ในข้อ 1.(ค.) จำนวน 1 มิลลิลิตร อีก 2 หลอดหลัง เติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร และแต่ละหลอดเติมกรดอะซิติก 1 มิลลิลิตร และ 4.Ø % ของสารละลาย $KMnO_4$ Ø.5 มิลลิลิตร เพื่อป้องกัน oxidation ของสารแปลกปลอม ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที จึงเติม 3% H_2O_2 Ø.5 มิลลิลิตร ซึ่งจะทำลายสีของ $KMnO_4$ ภายใน 1Ø วินาที เขย่าแรงๆ จนกระทั่งออกซิเจนที่เกินถูกไล่ออกหมด จึงวัดค่า fluorescence ด้วย Spectrofluorometer(Kontron SFN 23 B)ที่ความยาวคลื่น 44Ø-565 nm. ได้ค่า fluorescence ของ

หลอดสารละลายตัวอย่างและสารละลายมาตรฐานคู่แรกได้ X_1 และ X_2 เฉลี่ยได้ค่า X

หลอดสารละลายตัวอย่างและน้ำกลั่นคู่หลังได้ B_1 และ B_2 เฉลี่ยได้ค่า B

แล้วนำหลอดทดลองคู่หลังนี้เติมโซเดียมไดไทโอไนต์($Na_2S_2O_4$)เพื่อ ทำลาย fluorescence ของ Riboflavin แล้วนำมาวัดค่า fluorescence จะได้ค่า fluorescence ของหลอดสารละลายตัวอย่างกับน้ำกลั่นและ $Na_2S_2O_4$ 2Ø มิลลิกรัม ได้ค่า C_1 และ C_2 ได้ค่าเฉลี่ย C นำมาคำนวณค่าของวิตามิน บี 2 ตามสมการ

mg Riboflavin/ml final sample solution = [(B-C)/(X-B)]xØ.1ØxØ.ØØ1

โดยค่าของ (B-C)/(X-B) ต้องมีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ Ø.66 และ น้อยกว่าหรือเท่ากับ 1.5 และถ้าใส่ $Na_2S_2O_4$ มากกว่า 2Ø มิลลิกรัม จะไปลดสีของสารอื่น ทำให้อ่านค่าผิดไปได้

1.6.3 <u>การวิเคราะห์หาปริมาณไนอะซิน</u> ตามAOAC 1980 (17)

เครื่องมือ 1. Erlenmeyer flask ขนาด 50, 100 มิลลิลิตร

2. Pipet ขนาด 2, 10, 20 มิลลิลิตร

3. Ultraviolet Spectrophotometer (Unicam SP 800)

4. เครื่องอบ autoclave

สารเคมี 1. USP Niacin Reference Standard

2. 25 % Alcohol

3. 1 N. Sulfuric acid

4. 10 N. Sodium hydroxide

5. Bromocresol green

6. dil. Hydrochloric acid

7. สารละลายแอมโมเนียเจือจาง

8. 10 % Sulfonilic acid เตรียมจาก NH_4OH 1 มิลลิลิตร Sulfonilic acid 20 กรัม และน้ำกลั่น 170 มิลลิลิตร เขย่าจนกระทั่งละลายหมดปรับ pH=4.5 ด้วย HCl(1:1) โดยใช้ Bromocresol green เป็นตัวบอก แล้วเจือจางเป็น 200 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น สารละลายสุดท้ายจะเกือบไม่มีสี

9. 10 % Cyanogen Bromide Solution เตรียมโดยใส่น้ำอุ่นที่ 40 °ซ.370 มิลลิลิตร ในภาชนะก่อน แล้วเติม cyanogen bromide 40 กรัม เขย่าแรงๆ จนกระทั่งละลายหมด ทิ้งให้เย็น แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นเป็น 400 มิลลิลิตร เก็บในตู้เย็น ระวังอย่าให้ถูกผิวหนังและตา

วิธีวิเคราะห์

1. เตรียมสารละลายมาตรฐาน

ก. Stock Niacin Standard Solution

ละลาย USP Niacin Reference Standard 50 มิลลิกรัม ใน 25 % alcohol ปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร เก็บที่ 10 °ซ. จะได้สารละลายมาตรฐานของ stock Niacin ที่มีความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ข. Working Standard Solution

เจือจางสารละลายมาตรฐาน Stock niacin (ก.) 2 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย Working Standard Solution ที่มีความเข้มข้น 4 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

2. เตรียมสารละลายตัวอย่าง

ชั่งเมล็ดกระบกแห้ง ที่บดละเอียดแล้วมา 28.35 กรัม ใส่ใน erlenmeyer flask ขนาด 1 ลิตร เติม 1 N.H_2SO_4 200 มิลลิลิตร แล้วนำไปเข้า autoclave ที่ความดัน 15 ปอนด์ หรือที่อุณหภูมิ 121 °ซ. นาน 30 นาที แล้วทำให้เย็นก่อนปรับ pH ให้ได้ 4.5 ด้วย 10 N. NaOH โดยใช้bromocresol green เป็นตัวชี้บอก แล้วทำให้เจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มี ปริมาตร 250 มิลลิลิตร

3. ชั่ง $(NH_4)_2SO_4$ 17 กรัม ใส่ใน volumetric flask ขนาด 50 มิลลิลิตร 2 ใบ ใบแรกใส่สารละลายตัวอย่าง(ข้อ 2.)40 มล.เจือจางด้วยน้ำกลั่นเป็น 50 มิลลิลิตร ใบหลังใส่ working standard solution (ข้อ ข.) 40 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่นเป็น 50 มิลลิลิตร ซึ่งจะได้ความเข้มข้น 3.2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

4. การทำให้เกิดสี

ปิเปตสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างที่เติม $(NH_4)_2SO_4$ และน้ำกลั่นเรียบร้อยแล้ว(ข้อ 3.) อย่างละ 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลอง 4 หลอด แล้วเติมสารละลายอื่นเพื่อทำให้เกิดสี ดังนี้

Standard Blank	Sample Blank
1.0 ml Standard solution	1.0 ml sample solution
5.0 ml H_2O	5.0 ml H_2O
0.5 ml dil NH_4OH	0.5 ml dil NH_4OH
2.0 ml 10% Sulfanilic acid	2.0 ml 10% Sulfanilic acid
0.5 ml dil HCl	0.5 ml dil HCl

Standard Solution	Sample Solution
1.0 ml Standard solution	1.0 ml Sample solution
0.5 ml dil NH_4OH	0.5 ml dil NH_4OH
5.0 ml CNBr	5.0 ml CNBr
2.0 ml 10% Sulfanilic acid	2.0 ml 10% Sulfanilic acid
0.5 ml H_2O	0.5 ml H_2O

วัดความยาวคลื่นที่ 430-450 nm. ภายใน 30 วินาที หลังจากเติม Sulfanilic acid solution ในหลอด blank ส่วนในหลอดสารละลาย สีจะเข้มสูงสุดภายใน 1.5 นาที หลังจากเติม sulfanilic acid solution จะอยู่ได้นาน 2 นาที แล้วจะซีดลงอย่างช้าๆ จึงควรรีบอ่านค่า Absorbance ของสารละลายมาตรฐาน เมื่อให้ Standard blank มีค่าเป็น 0 และอ่านค่า Absorbance ของสารละลายตัวอย่าง เมื่อให้ sample blank มีค่าเป็น 0 นำมาคำนวณปริมาณไนอะซินในอาหารนั้น

1.6.4 <u>การวิเคราะห์หาวิตามิน เอ และ อี</u> ตามวิธีของ De Vries และคณะ (18)

เครื่องมือ 1. Erlenmyer flask สีชา ขนาด 125 มิลลิลิตร
2. Volumetric flask สีชา ขนาด 100 มิลลิลิตร
3. เครื่อง High Pressure Liquid Chromatography ของ Watters
4. Microsyringe ขนาด 20 ไมโครลิตร

สารเคมี 1. Standard oil

2. Acetone

3. 95 % Ethanol

4. alpha - Tocopheryl acetate

5. Pyrogallic acid

6. Ethanol KOH

7. ก๊าซไนโตรเจน

8. Tetrahydrofuran

วิธีวิเคราะห์

1. เตรียมตัวอย่าง

ชั่งตัวอย่างเมล็ดกระบกแห้งที่บดละเอียดมา 3 กรัม ใส่ Erlenmyer flask สีชา ขนาด 125 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 3 มิลลิลิตร

2. เตรียมสารละลายมาตรฐาน

Vitamin A standard solution ละลาย standard oil 100 มิลลิกรัม ใน acetone 10 มิลลิลิตร แล้วทำให้เจือจางด้วย 95 % ethanol เป็น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้นของ retinol 30 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชา

Vitamin E standard solution ละลาย alpha-tocopheryl acetate 35 มิลลิกรัม ใน acetone 10 มิลลิลิตร ทำให้เจือจางด้วย 95 % alcohol เป็น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้นของวิตามินอี ในรูปของ alpha-tocopheryl acetate 350 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ให้เตรียมใหม่ทุกครั้ง

ผสม Vitamin A Standard Solution 10, 5 มิลลิลิตร และ Vitamin E Standard Solution 10, 5 มิลลิลิตร ภายใน flask เดียวกัน และเติม 95 % ethanol 20, 10 มิลลิลิตร ตามลำดับ

3. เติม antioxidant ที่ใช้ pyrogallic acid 50 มิลลิกรัม เติม ethanol 22 มิลลิลิตร และ ethanol KOH (0.25 กรัม/มิลลิลิตร) 8 มิลลิลิตร reflux ภายใต้ก๊าซไนโตรเจนทั้งสารละลายตัวอย่าง และสารมาตรฐาน นาน 45 นาที ทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

4. ทำให้เป็นกลางด้วยกรดอะซิติก ใน 95 % ethanol เขย่าเป็นครั้งคราวแล้วถ่ายใส่ volumetric flask สีชา ขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย 50:50 ของ Tetrahydrofuran : 95 % ethanol จะทำให้เกลือของกรดไขมันตกตะกอน

5. หาปริมาณของวิตามิน กรองสารละลายที่ได้ผ่านตัวกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร นำแต่ส่วนใสมาฉีดเข้าเครื่อง High Pressure Liquid Chromatography ของ Watters (HPLC) โดยใช้ 20 ไมโครลิตร loop โดยจะปรับสภาวะของเครื่อง สำหรับ

ก. วิตามิน เอ จะปรับสภาวะเครื่องดังนี้

Column : 10 um Lichrosorb RP-18 หรือ 10um Vydoc ODS

Detector : Vari-chrom variable wavelength detector(Varian Palo Alto,CA) excitation
wavelength 328 nm.(20 mm. slit width)
emission wavelength 510 nm.(20 mm. slit width)

Mobile phase : methanol-water 87 + 13

Flow rate : 1.5 ml/min

โดย trans retinol ทุกตัว จะถูก eluted ออกมาภายใน 12 นาที เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน คำนวณปริมาณที่พบจากกราฟที่ได้

ข. วิตามิน อี จะปรับสภาวะเครื่องดังนี้

Column : prepacked reversed phase C 8

Detector : Vari-chrom variable wavelength detector
excitation wavelength 308 nm.(10 mm.slit width)
emission wavelength 330 nm.(10 mm. slit width)

Mobile phase : methanol - water 95+5,pH = 4 ปรับด้วย acetic acid

Flow rate : 1.5 ml/min

คำนวณปริมาณที่พบจากกราฟที่ได้โดย alpha-tocopherol จะถูกแยกออกมาภายใน 10 นาที เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน

2. การทดลองทางชีวภาพ (Biological Assay)

การศึกษาคุณค่าทางโภชนาการของโปรตีนในเมล็ดกระบก ในสัตว์ทดลอง โดยเปรียบเทียบกับเคซีอิน(casein) เพื่อหาค่า PER, cPER, NPR, RNPR, BV และ TD สำหรับเป็นเครื่องบ่งชี้

2.1 **การเตรียมตัวอย่าง**

นำเมล็ดกระบกมาใส่เครื่องอัด บีบเอาไขมันออก จะได้ส่วนกากเป็นแผ่นบางนำมาบดให้ละเอียด แบ่งไปวิเคราะห์หาปริมาณ โปรตีน ไขมัน กากใย เถ้า และคาร์โบไฮเดรต กากที่เหลือนำไปอบแห้งและบดละเอียด ผ่านแร่งขนาด 40 mesh ตัวอย่างที่ได้เรียกกากกระบก

2.2 **การผสมอาหารเลี้ยงสัตว์ทดลอง**

อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงสัตว์ทดลองจะต้องมีปริมาณโปรตีน ไขมัน เกลือแร่ วิตามิน กากใย เถ้า คาร์โบไฮเดรต และความชื้น ร้อยละ 10, 8, 5, 1, 1, 70 และ 5 ตามลำดับ ตามที่กำหนดไว้ใน AOAC 1984(9) ซึ่งในการทดลองนี้จะคำนวณหาปริมาณกากกระบกที่ใช้เพื่อให้ได้โปรตีน ร้อยละ 10 แล้วจึงคำนวณสารอาหารอื่นๆ ที่จะต้องนำมาเติมผสมกับกากกระบกนี้ เพื่อให้มีส่วนผสมตามสูตรอาหารที่กำหนดไว้(ดูในภาคผนวก ข.1.) ควรจะเตรียมอาหารให้มากพอที่จะใช้เลี้ยงสัตว์ทดลองทั้งหมด ตลอด 28 วัน โดยชั่งส่วนประกอบต่างๆ แล้วนำมาผสมในเครื่องผสม (mixer) ขนาดจุได้ครั้งละ 5 กิโลกรัม โดยผสมส่วนผสมที่แห้งให้เข้ากันก่อนนาน 15-20 นาที แล้วจึงค่อยๆ เติมส่วนผสมที่เป็นของเหลวลงไปคลุกเคล้าให้เข้ากันดี อาหารที่เตรียมได้แบ่งไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนและสารอาหารตัวอื่นๆ ว่าได้สัดส่วนตามที่ต้องการหรือไม่ เก็บอาหารที่เตรียมเสร็จแล้วไว้ในถุงพลาสติก(polyethylene) ปิดปากถุงให้แน่น ที่อุณหภูมิ 4 ° ซ. จะใช้หมดภายใน 1 เดือน

2.3 **การทดลองเพื่อหาค่า** Protein Efficiency Ratio (PER) **และ** correct PER (cPER)

เป็นวิธีการที่คาดว่าโปรตีนที่หนูกินทั้งหมด จะถูกนำไปใช้ในการเจริญเติบโตและเสริมสร้างร่างกาย โดยน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นจะมีสัดส่วนคงที่กับโปรตีนที่กิน การทดลองทำตามวิธีของ AOAC 1984 (9)

ก. เตรียมตัวอย่างอาหารมีส่วนประกอบดังนี้ โปรตีน 10 % น้ำมันข้าวโพด 8 % เกลือแร่(salt mixture) 5 % วิตามินรวม(vitamin mixture) 1 % กากใย (cellulose fiber) 1 % น้ำ 5 % และคาร์โบไฮเดรต(น้ำตาลทราย:แป้งข้าวโพด = 2:1) 70 % แล้ววิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในอาหารที่เตรียมโดยวิธี Kjeldahl แล้วเก็บในตู้เย็น 4 °ซ.

ข. สัตว์ทดลองใช้หนูขาว(rat) พันธุ์ Wistar สั่งจากศูนย์สัตว์ทดลอง ศาลายา มหาวิทยาลัยมหิดล ใช้หนูเพศผู้ อายุ 21 ± 1 วัน น้ำหนักเฉลี่ย 45 กรัม ทันทีที่ได้รับสัตว์ทดลองจะชั่งน้ำหนักทุกตัวและขังแยกกรงละหนึ่งตัว กรงที่ใช้มีถาดรับอุจจาระ และปัสสาวะ ช่วงเวลา 2 วันแรก เป็นการปรับตัวของสัตว์ทดลอง เลี้ยงด้วยอาหารธรรมดา และให้น้ำตลอด การทดลองอยู่ในห้องปรับอากาศอุณหภูมิ 25 ° ซ. ได้รับแสงสว่างในเวลากลางวัน 12 ชั่วโมง และมืดในเวลากลางคืน 12 ชั่วโมง

ค. การทดลองเริ่มในวันที่ 3 ของการรับสัตว์ทดลอง ชั่งน้ำหนักใหม่ และแบ่งเป็นกลุ่มๆ ละ 10 ตัว ให้น้ำหนักต่างกันไม่เกิน 10 กรัม แต่ละกลุ่มเลี้ยงด้วยอาหารต่างกันดังต่อไปนี้

กลุ่มมาตรฐาน (casein Reference group) : เลี้ยงด้วยอาหารโปรตีนมาตรฐาน คือ เคซีอิน* ไขมันจากน้ำมันข้าวโพด เกลือแร่ วิตามิน กากใยจาก cellulose คาร์โบไฮเดรต และน้ำร้อยละ 10, 8, 5, 1, 1, 70 และ 5 ตามลำดับ

กลุ่มทดลอง 1 (test group I) : เลี้ยงด้วยโปรตีนจากกากเมล็ดกระบก น้ำมันข้าวโพด เกลือแร่ วิตามิน กากใย คาร์โบไฮเดรต และน้ำ ร้อยละ 10, 8, 5, 1, 1, 70 และ 5 ตามลำดับ

กลุ่มทดลอง 2 (test group II) : เลี้ยงด้วยโปรตีนจากกากเมล็ดกระบก ไขมันจากไขมันเมล็ดกระบก เกลือแร่ วิตามิน กากใย คาร์โบไฮเดรต และ น้ำร้อยละ 10, 8, 5, 1, 1, 70 และ 5 ตามลำดับ

* เคซีอิน ของ ANRC (Animal Nutrition Research Council) จาก Sheffied Products, Memphis, T.N., U.S.A.

โดยให้อาหาร และน้ำตลอดวัน เลี้ยงนาน 28 วัน ในห้องปรับอากาศ 25 °ซ. ให้สว่างในเวลากลางวัน 12 ชั่วโมง และมืดในเวลากลางคืน 12 ชั่วโมง มีภาชนะรองใต้กรงเพื่อเก็บรวบรวมอาหารที่หก ในทุก 1-2 วัน ทำการบันทึกน้ำหนักอาหารที่กินทุกวัน และชั่งน้ำหนักทุก 1-2 วัน นำค่าที่ได้คำนวณหาค่า PER ของแต่ละกลุ่ม โดยค่า PER เป็นอัตราส่วนระหว่างน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นต่อน้ำหนักโปรตีนที่หนูแต่ละตัวกินเข้าไป มีสูตรคำนวณดังนี้

PER = Wt gain (g) of test gr / Protein consumed (g) by test gr

ค่า PER ที่ได้จากการทดลองอาจทำการปรับ(adjust) โดยทำการเปรียบเทียบกับค่า PER ของเคซีอิน ให้ค่า PER ของกลุ่มเคซีอินมีค่าเท่ากับ 2.5 จะให้ค่า PER ใหม่ เรียกว่า correct PER โดยการคำนวณดังนี้

PER(adjusted) = (PER test group/PER reference casein)x2.5

หรือ cPER

2.4 **การทดลอง Net Protein Ratio (NPR) และ relative NPR ของกากกระบก**

ทำการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองหา PER แต่เพิ่มกลุ่มสัตว์ทดลองอีกหนึ่งกลุ่ม คือกลุ่มที่ให้อาหารปราศจากโปรตีน(zero protein) เพื่อใช้ค่าน้ำหนักที่สูญเสียไปในขณะที่กินอาหารที่ไม่มีโปรตีน เป็นค่าโปรตีนที่ถูกใช้เพื่อการดำรงชีวิต(maintenance) อยู่รอด กลุ่มทดลองที่เพิ่ม คือ

กลุ่มทดลอง 3 (zero protein group)	:	เลี้ยงด้วยคาร์โบไฮเดรต น้ำมันข้าวโพด เกลือแร่ วิตามิน กากใย และน้ำ ร้อยละ 80,8,5,1,1 และ 5 ตามลำดับ

การเลี้ยงให้อาหารและน้ำตลอดวัน เลี้ยงนาน 10-14 วัน ทำการบันทึกน้ำหนักอาหารที่กินทุกวันและน้ำหนักตัวหนู ทุก 1-2 วัน นำมาคำนวณ โดย NPR เป็นอัตราส่วนระหว่างผลรวมของน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นของหนูตัวหนึ่งกับน้ำหนักที่สูญเสียไปโดยเฉลี่ยของหนูในกลุ่มทดลอง 3 ต่อผลต่างระหว่างน้ำหนักโปรตีนที่หนูตัวนั้นกินกับโปรตีนเฉลี่ยที่หนูกลุ่มทดลอง 3 กิน ซึ่งมีสูตรคำนวณดังนี้

NPR = (Wt. gain(g) of test gr.+ Wt. loss of zero protein gr.) / (Protein consumed by test gr.- Protein consumed by zero protein gr.)

จาก NPR นำมาคำนวณอัตราส่วนของค่าเฉลี่ยของ NPR ของกลุ่มทดลองต่อค่าเฉลี่ยของกลุ่มมาตรฐาน คูณ 100 จะรายงานค่าเป็น Relative NPR (RNPR) โดยการคำนวณดังนี้

RNPR = (Mean NPR of test protein/Mean NPR of reference Protein) x 100

2.5 **การทดลอง Biological Value (BV) และ True Digestibility (TD) ของกากกระบก**

วัดค่าเหล่านี้โดยใช้วิธีของ Nitrogen balance technique (29) ซึ่งค่า BV เป็น ค่าร้อยละของไนโตรเจนที่ถูกดูดซึม และยังคงเก็บไว้ในร่างกาย ในการทดลองใช้หนูขาวตัวผู้พันธุ์ Wistar อายุ 21 วัน มี 2 กลุ่มทดลอง คือ

กลุ่มที่ 1 : เลี้ยงด้วยโปรตีนจากเมล็ดกระบกและไขมันจากน้ำมันข้าวโพด เกลือแร่ วิตามิน กากใยและน้ำ ร้อยละ 10, 8, 5, 1, 1 และ 5 ตามลำดับ

กลุ่มที่ 2 : เลี้ยงด้วยอาหารปราศจากโปรตีน เพื่อใช้เป็นค่า metabolic fecal และ endogenous urinary nitrogen ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต น้ำมันข้าวโพด เกลือแร่ วิตามิน กากใย และน้ำ ร้อยละ 80, 8, 5, 1, 1 และ 5 ตามลำดับ .

เลี้ยงนาน 1-2 สัปดาห์ โดยชั่งน้ำหนักตัว, น้ำหนักอาหาร, เก็บปัสสาวะและอุจจาระทุกวันตลอดการทดลองโดยรวบรวมไว้ในตู้เย็น จนสิ้นสุดการทดลองจึงนำมาวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนในปัสสาวะและอุจจาระ โดยใช้วิธีของ Kjeldahl ในหัวข้อ 1.1.2 และนำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่า True digestibility และ Biological value มีสูตรการคำนวณดังนี้

$$TD = [I - (F - F_o)] \times 100/I = \text{N absorbed/N intake}$$

$$BV = [I - (F - F_o) - (U - U_o)] \times 100/[I - (F - F_o)]$$

$$= \text{N retained / N absorbed}$$

โดยที่

I = ปริมาณไนโตรเจนที่กลุ่มทดลองกิน

F = ปริมาณไนโตรเจนที่ขับออกทางอุจจาระของกลุ่มทดลอง

F_o = ปริมาณไนโตรเจนที่ขับออกทางอุจจาระ ของกลุ่มที่กินอาหารที่ไม่มีโปรตีน เป็นค่า metabolic fecal nitrogen

U = ปริมาณไนโตรเจนที่ขับออกทางปัสสาวะ

U_o = ปริมาณไนโตรเจนที่ขับออกทางปัสสาวะ ของกลุ่มที่กินอาหารที่ไม่มีโปรตีน เป็นค่า Endogenous urinary nitrogen

2.6 **คำนวณค่า Net Protein Utilization**

จากค่า Biological Value และ True Digestibility สามารถคำนวณความสัมพันธ์ของ Net Protein Utilization (NPU) ซึ่งเป็นค่าดรรชนี บ่งบอกถึงจำนวนไนโตรเจนที่ยังคงเก็บไว้ในร่างกาย ซึ่งมีความสัมพันธ์โดยตรงกับอาหารที่รับประทานเข้าไปโดยใช้สูตรคำนวณดังนี้

NPU = (BV x TD) / 100

= N retained / N intake