หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

การทดลอง

วัตถุดิบ อุปกรณ์ และวิธีวิเคราะห์

3.1 วัตถุดิบ

วัตถุดิบที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 ไข่เป็ดจากฟาร์ม ที่อำเภอมหาชัย จังหวัดสมุทรสาคร

3.1.2 เปลือกไข่เป็ดที่เอาไข่ขาวไข่แดงออกหมด และล้างสะอาดแล้ว

3.1.3 เยื่อหุ้มไข่

3.2 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

3.2.1 Atomic absorption spectrophotometer (Instrument Laboratory, Model 951)

3.2.2 Flame photometer (Klina Beckman, Model 652210)

3.2.3 pH meter (Radiometer, Model PHM 62)

3.2.4 Scanning electron microscope (Jeol, Model JSM-35 CF)

3.2.5 Double beam spectrophotometer (Shimadzu, Model UV 180)

3.2.6 Thermal analyzer (Shimadzu, Model DT-30)

3.3 การศึกษาปริมาณการแพร่กระจายของสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่ซึมผ่านเปลือกไข่

ใช้เปลือกไข่ไก่และไข่เป็ดที่ล้างไข่ขาวไข่แดงออกหมด เติมน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร นำไปแช่ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 15 โดย (น้ำหนัก/ปริมาตร)

ที่อุณหภูมิห้องและที่ 4 องศาเซลเซียส ทุก ๆ 4 วัน ปิเปตสารละลายในเปลือกไข่ออกมา 1 มิลลิลิตร นำมาวิเคราะห์หาปริมาณประจุภาคโซเดียมและประจุภาคคลอไรด์

3.4 <u>การศึกษาปริมาณประจุภาคคลอไรด์ที่ซึมผ่านเปลือกไข่ซึ่งแช่ในสารละลายที่มีความเข้มข้นต่างกัน</u>

ใช้เปลือกไข่ที่ล้างไข่ขาวไข่แดงออกหมด เติมน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร นำไปแช่ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์สองชนิด คือชนิดความเข้มข้นร้อยละ 1 และ 5 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ทุก ๆ 7 วัน ปิเปตสารละลายในเปลือกไข่ออกมา 1 มิลลิลิตร นำมาวิเคราะห์หาปริมาณประจุภาคคลอไรด์

3.5 <u>ปริมาณประจุภาคคลอไรด์ที่ซึมผ่านเปลือกไข่ ที่อุณหภูมิห้องและที่ 38 องศาเซลเซียส</u>

นำเปลือกไข่เป็ดที่ล้างไข่ขาวไข่แดงออกหมดแล้ว เติมน้ำกลั่นลงไป 40 มิลลิลิตร แล้วนำเปลือกไข่นี้ไปแช่ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 15 น้ำหนัก/ปริมาตร ที่อุณหภูมิห้องและที่ 38 องศาเซลเซียส ศึกษาอัตราการซึมผ่านเปลือกไข่เป็ดของประจุภาคคลอไรด์ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ทั้งสองอุณหภูมิ

3.6 <u>การศึกษาอัตราการแพร่กระจายของสารละลายโซเดียมคลอไรด์ผ่านเยื่อหุ้มไข่</u>

<u>การเตรียมเยื่อหุ้มไข่</u> นำเปลือกไข่เป็ดมาแช่ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริดเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร เมื่อละลายเปลือกนอกของไข่ออกเหลือแต่เยื่อหุ้มไข่ นำเยื่อหุ้มไข่นี้ไปใช้ในการทดลองต่อไป

วิธีนี้ต้องเตรียมเครื่องมือขึ้นมาใหม่ โดยนำเยื่อหุ้มไข่ที่มีน้ำกลั่นบรรจุอยู่ 40 มิลลิลิตร ไปหุ้มรอบหลอดแก้วที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 เซนติเมตร ยาวประมาณ 10 เซนติเมตร ปลายตัดทั้งสองข้าง ใช้แผ่นพาราฟิล์มปิดปลายบนเพื่อป้องกันไม่ให้สารละลายในเยื่อหุ้มไข่ระเหยไป นำหลอดแก้วที่มีเยื่อหุ้มไข่ผูกอยู่แช่ในอ่างแก้วที่มีสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 2 (โดยปริมาตร) และแทนนินความเข้มข้นร้อยละ 1 บรรจุอยู่ ปิเปตสารละลายในเยื่อหุ้มไข่ออกมา 1 มิลลิลิตรทุก ๆ วัน วิเคราะห์หาอัตราการแพร่กระจายของโซเดียมคลอไรด์และแทนนินจนสารละลายอยู่ในสภาพสมดุลย์

3.7 การสกัดแทนนินจากใบชา (19)

1. ชั่งใบชาจีนตราสามม้า 1.000 กรัม ใส่ในขวดกลมขนาด 250 มิลลิลิตร น้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร
2. reflux 1 ชั่วโมง
3. นำสารละลายไปวิเคราะห์แทนนิน

3.8 ศึกษาการซึมผ่าน เปลือกไข่ เป็ดของสารละลายจากผงแทนนิน

นำเปลือกไข่ที่ล้างไข่ขาวไข่แดงออกหมดแล้ว เติมน้ำกลั่นลงไป 40 มิลลิลิตร แล้วแช่ในสารละลายแทนนินเข้มข้นร้อยละ 1 น้ำหนัก/ปริมาตร ปิเปตสารละลายภายใน เปลือกไข่ 1 มิลลิลิตร นำมาวิเคราะห์หาปริมาณแทนนินทุก ๆ วัน

3.9 การศึกษาหาระยะ เวลาที่ เหมาะสมในการสกัดแทนนินจากไข่ เยี่ยวม้า

ชั่งไข่ขาว ไข่แดงของไข่เยี่ยวม้าอย่างละ 1.000 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 150 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร อุ่นบนหม้ออังไอน้ำเป็นเวลา 1,2,3,4 ชั่วโมง นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์แทนนิน เพื่อหาระยะ เวลาที่ เหมาะสมในการสกัดแทนนิน

3.10 การหาสารละลายที่จะตกตะกอนโปรตีนไข่สดให้เป็น gel (20)

3.10.1 สารโลหะหนัก สารเคมีที่เลือกมาทดสอบเป็นพวกที่ตกตะกอนโปรตีนในรูป gel ได้ และปลอดภัยต่อผู้บริโภคและมีใช้กันมากในอุตสากรรมผลิตยา ยกเว้นตะกั่วมอนน็อกไซด์ ซึ่งนำมาทดลองเพื่อศึกษาลักษณะของ gel สีของ gelไข่ขาวไข่แดงตลอดจนความสามารถในการซึมผ่าน เปลือกไข่ของตะกั่วมอนน็อกไซด์ เนื่องจากตะกั่วมอนน็อกไซด์เป็นสารเคมีที่ผู้ผลิตไข่เยี่ยวม้านิยมใช้กันมา สารเคมีที่นำมาทดสอบในการตกตะกอนโปรตีนไข่สดให้เป็น gel ได้แก่ ตะกั่วมอนน็อกไซด์ (lead oxide, PbO) สังกะสีคลอไรด์ (zinc chloride,

$ZnCl_2$) อลูมิเนียมไฮดรอกไซด์ (aluminium hydroxide, $Al(OH)_3$) เหล็กซัลเฟต (ferrous sulphate, $FeSO_4$)

วิธีเตรียม

1. ละลายตะกั่วมอนน้อกไซด์ 10 กรัมในสารละลายกรดไนตริกเข้มข้น ปรับปริมาตรจนครบ 1000 มิลลิลิตร อุ่นให้ร้อนได้สารละลายใส ไม่มีสี ปรับ pH ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ได้สารละลาย 4 ระดับคือ 1.50 3.83 10.5 และ 13.05

2. ละลายสังกะสีคลอไรด์10 กรัมในน้ำ ปรับปริมาตรจนครบ 1000 มิลลิลิตร ได้สารละลายใส ปรับ pH ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ได้สารละลาย 4 ระดับ คือ 5.79 6.50 10.50 และ 12.50

3. ละลายอลูมิเนียมไฮดรอกไซด์ 10 กรัมในสารละลายด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 นอร์มัล ปรับปริมาตรจนครบ 1000 มิลลิลิตร ปรับ pH ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ได้สารละลาย 4 ระดับคือ 9.0 10.5 12.0 และ 13.5

4. ละลาย เหล็กซัล เฟต 10 กรัมในสารละลายกรดไฮโดรคลอริคเข้มข้นร้อยละ 10 ปรับปริมาตรจนครบ 1000 มิลลิลิตร แช่เย็นที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที เนื่องจาก เหล็กซัล เฟตละลายในสารละลายที่เย็น ปรับ pH ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ได้สารละลาย 4 ระดับคือ 0.40 6.80 10.50 และ 13.50

การทดลอง

ผสมไข่ขาวดิบ 3 กรัม กับสารละลายโลหะหนักแต่ละชนิดประมาณ 0.5 มิลลิลิตร ทำการทดลองทุกระดับ pH ที่ได้ปรับไว้แล้ว ตรวจผลทดลอง

3.10.2 ยูเรีย โซเดียมคาร์บอเนต แคลเซียมคาร์บอเนต โซเดียมคลอไรด์

สารเคมีที่นำมาทดสอบดังกล่าวใช้ความเข้มข้น 10 กรัม/ลิตร ยกเว้นยูเรียใช้ความเข้มข้นชนิดอิ่มตัว

การทดลอง

ผสมไข่ขาวดิบ 3 กรัม กับสารละลายแต่ละชนิดประมาณ 0.5 มิลลิลิตร ตรวจผลที่เกิดขึ้นจากลักษณะความคงตัว และสีของ gel

3.11 การหาสูตรที่เหมาะสมในการผลิตไข่เยี่ยวม้าที่มีปริมาณตะกั่วน้อย

เลือกสารเคมีที่ตกตะกอนโปรตีนในไข่ให้ gel ที่มีลักษณะคงตัว และเป็นสารที่ไม่เป็นพิษต่อร่างกาย จากข้อ 3.10.1, 3.10.2 ทำการทดลองหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการตกตะกอนโปรตีน ไข่ขาวจนเป็น gel

วิธีทดลองโดยแปรความเข้มข้นของสารเคมีแต่ละชนิดดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงชนิดและความเข้มข้นของสารเคมีที่ใช้ในการหมักไข่เยี่ยวม้า

สารเคมี	ความเข้มข้นสารเคมี (กรัม/ลิตร)						
	สูตรที่ 1	สูตรที่ 2	สูตรที่ 3	สูตรที่ 4	สูตรที่ 5	สูตรที่ 6	สูตรที่ 7
โซเดียมคาร์บอเนต	6	6	6	3	6	6	6
แคลเซียมคาร์บอเนต	5	5	5	5	4	5	5
ยูเรีย	0	50	0	0	0	0	0
สังกะสีคลอไรด์	0	0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
อลูมิเนียมไฮดรอกไซด์	1	0	0	0	0	0	0
ใบชา	1	1	1	1	1	0.5	1
โซเดียมคลอไรด์	5	5	5	5	5	5	2

วิธีทดลอง

1. สูตรที่ 1 ทำการทดลองโดยแปรความเข้มข้นของอลูมิเนียมไฮดรอกไซด์ 1,2,3,4,5,6,7 กรัม/ลิตร ทำการทดลอง 2 ซ้ำ ความเข้มข้นของสารเคมีอื่นคงที่

2. สูตรที่ 2 ทำการทดลองโดยแปรความเข้มข้นของยูเรียเป็น 50,60 70 และระดับอิ่มตัว ทำการทดลอง 2 ซ้ำ ความเข้มข้นของสารเคมีอื่นคงที่

3. สูตรที่ 3 ทำการทดลองโดยแปรความเข้มข้นของสังกะสีคลอไรด์ 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4 กรัม/ลิตร ทำการทดลอง 2 ซ้ำ ความเข้มข้นของสารเคมีอื่นคงที่

4. สูตรที่ 4 ทำการทดลองโดยแปรความเข้มข้นของโซเดียมคาร์บอเนต เป็น 3,4,5,6,7,8 กรัม/ลิตร ทำการทดลอง 2 ซ้ำ ความเข้มข้นของสารอื่นคงที่

5. สูตรที่ 5 ทำการทดลองโดยแปรความเข้มข้นของแคลเซียมคาร์บอเนต เป็น 4,5,6,7,8 กรัม/ลิตร ทำการทดลอง 2 ซ้ำ ความเข้มข้นของสารอื่นคงที่

6. สูตรที่ 6 ทำการทดลองโดยแปรความเข้มข้นของใบซา เป็น 0.5, 1,2,3 กรัม/ลิตร ทำการทดลอง 2 ซ้ำ ความเข้มข้นของสารอื่นคงที่

7. สูตรที่ 7 ทำการทดลองโดยแปรความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เป็น 2,4,5,6,7 กรัม/ลิตร ทำการทดลอง 2 ซ้ำ ความเข้มข้นของสารอื่นคงที่

จากการทดลองทั้ง 7 สูตร นำมาวางแผนการทดลองตามหลักสถิติแบบ factorial randomized design โดยใช้สารเคมีทุกชนิดดังที่แสดงในตารางที่ 5 โดยใช้สารเคมีชนิดละ 2 ความเข้มข้น คือที่ความเข้มข้นสูงสุด กับต่ำสุดที่สามารถแปรรูปไข่เป็ดเป็นไข่เยี่ยวม้า ทำทั้งหมด 32 สภาวะการทดลอง และให้คะแนนตามลักษณะของไข่เยี่ยวม้าที่ได้ดังนี้คือ

ไข่แดงของไข่เยี่ยวม้าเป็น paste ไข่ขาวเป็น gel คงตัวทั้งหมด = 4 คะแนน
ไข่แดงเป็น paste ไข่ขาวเป็น gel ค่อนข้างนิ่มให้ = 3.5 คะแนน
ไข่แดงเป็น paste ไข่ขาวเป็น gel ไม่คงตัวมีส่วนเหลวเยิ้มลงมาให้ = 3 คะแนน
ไข่แดงเป็น paste ไข่ขาวเป็น gel ครึ่งฟอง นอกนั้นเหลวให้ = 2 คะแนน
ไข่แดงเป็น paste ไข่ขาวเป็น gel เล็กน้อย นอกนั้นเหลวให้ = 1 คะแนน

นำคะแนนที่ได้ทั้ง 32 สภาวะการทดลองมาคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์ของอิทธิพลร่วมของตัวแปรโดยใช้ Yates' method เพื่อทดสอบความสำคัญของอิทธิพลของสารเคมีแต่ละชนิด

3.12 <u>การทดสอบทางประสาทสัมผัส</u>

วางแผนการทดลองแบบ factorial randomized design ทดสอบการยอมรับผลิตภัณฑ์ในด้านสี ความเป็น gel ของไข่ กลิ่น รสชาติ เนื้อสัมผัสและระดับการยอมรับรวม โดยใช้ระบบการทดสอบแบบ hedonic scale ใช้ผู้ทดสอบ 8 คนต่อตัวอย่าง ทดลอง 2 ซ้ำ กำหนดช่วงคะแนน 1-7 โดย 7 เป็นคะแนนชอบมากที่สุด และ 1 เป็นคะแนนไม่ชอบมากที่สุด กำหนดให้คะแนนต่ำกว่า 5 เป็นคะแนนที่ผู้บริโภคไม่ยอมรับ

3.13 การเปลี่ยนแปลงของไข่เป็ดตั้งแต่เริ่มต้นจนเป็นไข่เยี่ยวม้าทั้งทางกายภาพและเคมี

นำไข่เป็ดมาแช่ในสารละลายผสมของสารเคมีที่เลือกได้จากข้อ 3.11 ที่อุณหภูมิห้อง ศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะภายในทางด้านกายภาพของไข่ขาว ไข่แดงที่ค่อย ๆ เปลี่ยนไปจนเป็นไข่เยี่ยวม้า และวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของผลิตภัณฑ์ที่ได้ ทำการตรวจครั้งละ 10 ฟอง ทุก ๆ 7 วัน

3.14 การทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพของไข่เยี่ยวม้า

3.14.1 ปริมาณความชื้น (moisture content) วิเคราะห์ตามวิธี AOAC

$$\text{ความชื้นร้อยละ} = \frac{(\text{นน. ก่อนอบ} - \text{นน. หลังอบ})}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}} \times 100$$

3.14.2 การหา pH ของไข่เยี่ยวม้า (19)

1. บดไข่เยี่ยวม้า 5 กรัมให้ละเอียด เติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร
2. นำไปวัดค่า pH ด้วย pH meter

3.15 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของไข่เยี่ยวม้า

นำไข่เยี่ยวม้าที่ได้จากข้อ 3.11 มาวิเคราะห์หาปริมาณประจุภาคต่าง ๆ

3.15.1 การหาปริมาณโซเดียมคาร์บอเนต (21)

1. ชั่งน้ำหนักไข่เยี่ยวม้าที่รู้น้ำหนักแน่นอนประมาณ 2 กรัม
2. บดละเอียดด้วย hand homogenizer เติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร
3. ไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟุริกเข้มข้น 0.1 นอร์มัล โดยใช้ methyl orange เป็น indicator
4. end point ได้สารละลายสีชมพูอมส้ม

3.15.2 การหาปริมาณโซเดียมคลอไรด์ (19)

สารเคมี 1. สารละลายมาตรฐานซิลเวอร์ไนเตรทเข้มข้น 0.1 นอร์มัล

2. สารละลายโปแตสเซียมโครเมตเข้มข้นร้อยละ 10 (น้ำหนัก/ปริมาตร)

วิธีการ

1. ชั่งไข่ขาวหรือไข่แดงมาประมาณ 2 กรัม
2. เติมน้ำกลั่นลงไป 100 มิลลิลิตร บดไข่ให้ละเอียดด้วย hand homogenizer
3. เติมสารละลายโปแตสเซียมโครเมต เข้มข้นร้อยละ 10 (น้ำหนัก/ปริมาตร) จำนวน 2 หยดเป็น indicator
4. ไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานซิลเวอร์ไนเตรทเข้มข้น 0.1 นอร์มัล
5. end point ได้ตะกอนสีแดงอิฐ

$$\text{ร้อยละของ NaCl} = \frac{\text{N } AgNO_3 \text{ x V } AgNO_3 \text{ x } 58.44}{\text{weight of Sample (mg)}} \text{ x } 100$$

3.15.3 การหาปริมาณประจุภาคตะกั่ว (2)

สารเคมี

1. สารละลายแมกเนเซียมไนเตรทเข้มข้นร้อยละ 50 (น้ำหนัก/ปริมาตร)
2. กรดไนตริกเข้มข้นร้อยละ 20 (ปริมาตร/ปริมาตร)
3. สารละลายมาตรฐานตะกั่วไนเตรท

วิธีเตรียมกราฟมาตรฐาน

1. ปิเปตสารละลายมาตรฐานตะกั่วไนเตรท ในปริมาณต่าง ๆ กัน ให้มีความเข้มข้น 0.5,1,3,4, และ 5 ppm ปรับปริมาตรสารละลายให้ครบ 100 มิลลิลิตร ด้วยกรดไนตริกเข้มข้น 0.3 นอร์มัล
2. นำสารละลายไปวัดด้วยเครื่อง atomic absorption spectrophometer ที่ความยาวคลื่น 283.5 นาโนเมตร
3. นำค่าที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐาน

วิธีหาปริมาณประจุภาคตะกั่ว

1. ชั่งไข่ขาวหรือไข่แดงที่มีน้ำหนักแน่นอนประมาณ 5 กรัม ใส่ในชามกระเบื้อง เติมสารละลายแมกเนเซียมไนเตรทเข้มข้นร้อยละ 50 (น้ำหนัก/ปริมาตร) จำนวน 2.5 มิลลิลิตร แล้วระเหยให้แห้ง

2. เผาในตู้ควันจนหมดควัน

3. นำไปเผาต่อในเตาเผาอุณหภูมิ 500 อาศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง จนได้เถ้าสีขาว

4. ละลายเถ้าด้วยกรดไนตริกเข้มข้นร้อยละ 20 (ปริมาตร/ปริมาตร) จำนวน 8 มิลลิลิตร

5. กรองแล้วเติมน้ำกลั่นจนครบ 25 มิลลิลิตร

6. นำไปวัดด้วยเครื่อง atomic absorption spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 283.5 นาโนเมตร

7. คำนวณหาปริมาณประจุภาคตะกั่วเทียบกราฟมาตรฐาน

3.15.4 การหาปริมาณประจุภาคสังกะสี (22)

สารเคมี 1. สารละลายมาตรฐานสังกะสีไนเตรท

2. กรดไนตริกเข้มข้น 0.3 นอร์มัล

วิธีเตรียมกราฟมาตรฐาน

1. ปิเปตสารละลายมาตรฐานสังกะสีไนเตรท ในปริมาณต่าง ๆ กัน ให้มีความเข้มข้น 10, 20,30,40 และ 100 ppm ปรับปริมาตรสารละลายให้ครบ 100 มิลลิลิตร ด้วยกรดไนตริกเข้มข้น 0.3 นอร์มัล

2. นำสารละลายไปวัดด้วยเครื่อง atomic absorption spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 213.2 นาโนเมตร (22)

3. นำค่าที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐาน

วิธีหาปริมาณประจุภาคสังกะสี

1. ชั่งไข่เยี่ยวม้าที่รู้น้ำหนักแน่นอนประมาณ 5 กรัม

2. เผาในตู้ควันจนหมดควัน

3. นำไปเผาต่อในเตาเผาอุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง จนเป็นเถ้าสีขาว

4. ละลายเถ้าด้วยกรดไนตริกเข้มข้น 0.3 นอร์มัล จำนวน 20 มิลลิลิตร แล้วกรองปรับปริมาตรของสารละลายที่ได้ด้วยกรดไนตริกเข้มข้น 0.3 นอร์มัลจนครบ 100 มิลลิลิตร

5. นำสารละลายไปวัดด้วยเครื่อง atomic absorption spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 213.2 นาโนเมตร

6. คำนวณหาปริมาณประจุภาคสังกะสี เทียบกับกราฟมาตรฐาน

3.15.5 การหาปริมาณประจุภาคแคลเซียม (22)

สารเคมี 1. สารละลายมาตรฐานแคลเซียมไนเตรท

2. กรดไนตริกเข้มข้น 0.3 นอร์มัล

วิธีเตรียมกราฟมาตรฐาน

วิธีเตรียมเช่นเดียวกับการหาปริมาณประจุภาคสังกะสี แต่วัดปริมาณด้วยแคลเซียมด้วย atomic absorption spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 422.7 นาโนเมตร

วิธีหาปริมาณประจุภาคแคลเซียม

1. เตรียมเหมือนวิธีการในข้อย่อยที่ 1-3 ในหัวข้อ 3.15.4

2. นำสารละลายไปวัดด้วยเครื่อง atomic absorption spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 422.7 นาโนเมตร

3. นำค่าที่ได้คำนวณหาปริมาณแคลเซียมเทียบกับกราฟมาตรฐาน

3.15.6 การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี kjeldahl

วิเคราะห์ตามวิธี AOAC (19) ดังนี้

สารเคมี

1. คอปเปอร์ซัลเฟตและโปแตสเซียมซัลเฟตใช้เป็นคะตาลิสม์
2. กรดซัลฟุริกเข้มข้น (เข้มข้นร้อยละ 98 โดยน้ำหนักและปราศจากไนโตรเจน)
3. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 50 (น้ำหนัก/ปริมาตร)
4. สารละลายมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 นอร์มัล
5. modified methyl red solution ใช้เป็น indicator (เตรียมโดยละลาย methyl red 1.25 กรัม และ methylene blue 0.825 กรัม ใน เอทานอลร้อยละ 90 โดยปริมาตรจำนวน 1 ลิตร)
6. กรดบอริกเข้มข้นร้อยละ 4 โดยปริมาตร

วิธีการ

1. ชั่งไข่เยี่ยวม้าที่รู้น้ำหนักแน่นอนประมาณ 5 กรัมใส่ใน kjeldahl flask ทำ blank ควบคู่ไปด้วย
2. เติมโปแตสเซียมหรือโซเดียมซัลเฟต 10-15 กรัม
3. เติมคอปเปอร์ซัลเฟต 0.5 กรัม
4. เติมกรดซัลฟุริกเข้มข้นปริมาตร 25 มิลลิลิตร
5. นำไปย่อยบน kjeldahl digestion apparatus โดยใช้ไฟอ่อน ๆ เมื่อหมดฟองแล้ว จึงเร่งไฟให้แรงขึ้น และย่อยต่อไปจนสารละลายใส
6. จากนั้นย่อยต่อไปอีก 20-30 นาที เพื่อให้การย่อยเป็นไปอย่างสมบูรณ์ ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น
7. เตรียมสารละลายกรดบอริกเข้มข้นร้อยละ 4 โดยปริมาตรจำนวน 50 มิลลิลิตร ใส่ใน erlenmeyer flask เพื่อจับแก๊สแอมโมเนียที่ได้จากการกลั่น เติม modified methyl red indicator 2 หยด
8. นำสารละลายใน kjeldahl flask ที่ย่อยจนใสแล้วในข้อ 6 มาทำให้เจือจางโดยเติมน้ำกลั่นลงไปประมาณ 300 มิลลิลิตร

9. เติม pumice stone 1-2 กรัม เพื่อลดการ bumping ของสารละลายในช่วงการกลั่น และเติม phenolpthalein 2-3 หยด แล้วปิดจุกยางที่มี thistle funnel และ Kjeldahl spray trap เข้ากับปาก kjeldahl flask

10. ต่อสายยางจาก Kjeldahl spray trap ที่เตรียมไว้ใน ข้อ 9 เข้ากับ condenser ของเครื่องแก้ว

11. เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 50 โดยปริมาตรจำนวน 100 มิลลิลิตรลงไปทาง thistle funnel ช้า ๆ พร้อมทั้งเขย่าเบา ๆ ถ้าปริมาณด่างไม่พอก็เติมลงไปอีก จนสารละลายเป็นด่างเล็กน้อย โดยดูจากสีของ phenolpthalein

12. กลั่นโดยเก็บแก๊สแอมโมเนียในสารละลายกรดบอริกจนได้สารละลายประมาณ 200 มิลลิลิตร

13. ล้างปลายสายยางภายนอกด้วยน้ำกลั่นจำนวนเล็กน้อยลงไปใน flask ที่รองรับ

14. นำไปไตเตรทกับสารละลายมาตรฐานของกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 นอร์มัล โดยใช้ modified methyl red เป็น indicator

15. จากปริมาณกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ หักปริมาณที่ใช้ใน blank ออก นำไปคำนวณหาปริมาณโปรตีนในตัวอย่างไข่เยี่ยวม้าได้โดยใช้สูตร

$$\text{ร้อยละของโปรตีน} = \frac{0.014 \times N \times V \times \text{factor}}{\text{weight of Sample (gm)}} \times 100$$

N = นอร์มาลิตี้ของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไตเตรท

V = จำนวนมิลลิลิตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไตเตรท

factor = 6.25

ปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้อง

$$H_2SO_4 \xrightarrow{\text{Catalyst}} H_2O + SO_2 + O$$

$$R.CH(NH_2).COOH \xrightarrow{H_2O + SO_2 + \hat{O}} NH_3 + H_2O + CO_2$$

$$2NH_3 + H_2SO_4 \longrightarrow (NH_4)_2SO_4$$

$$(NH_4)_2SO_4 + 2NaOH \longrightarrow 2NH_3 + 2H_2O + Na_2SO_4$$

$$3NH_3 + H_3BO_3 \longrightarrow (NH_4)_3BO_3 \text{ (loosely bound)}$$

$$(NH_4)_3BO_3 + 3HCl \longrightarrow 3NH_4Cl + H_3BO_3$$

3.15.6 การหาปริมาณแทนนินในไข่เยี่ยวม้า (22)

ทดลองใช้ใบชา 1,2 กรัม/ลิตร ในสูตรการหมักไข่เยี่ยวม้า จากนั้นนำไข่เยี่ยวม้าที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณแทนนิน

สารเคมี

1. สารละลายมาตรฐานของกรดแทนนิกเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร
2. สารละลายอิ่มตัวของโซเดียมคาร์บอเนต
3. สารละลาย Folin-Denis เตรียมจากโซเดียมทังสเตท 100 กรัม กรดฟอสฟอโมลิบดิก 20 กรัม และกรดฟอสฟอริกเข้มข้นร้อยละ 85 จำนวน 50 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นลงไป 750 มิลลิลิตร reflux สารผสมทั้งหมดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทำให้เย็นที่ 25 องศาเซลเซียส ปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

วิธีเตรียมกราฟมาตรฐาน

1. ปิเปตสารละลายมาตรฐานของกรดแทนนิกเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร ในปริมาตรต่าง ๆ ปรับให้มีความเข้มข้น 0.01, 0.05, 0.10, 0.20 และ 0.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

2. เติมสารละลาย Folin-Denis 1.2 มิลลิลิตรและสารละลายอิ่มตัวของโซเดียมคาร์บอเนต ลงในแต่ละความเข้มข้น

3. เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 30 นาที แล้วกรอง

4. วัดความเข้มข้นของสีที่ 760 นาโนเมตร ใน double beam spectrophotometer

5. บันทึกค่าการดูดกลืนแสงแล้วนำไปสร้างกราฟมาตรฐาน

วิธีหาแทนนิน

1. ชั่งไข่เยี่ยวม้าที่รู้น้ำหนักแน่นอนประมาณ 2 กรัม

2. เติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร อุ่นบนหม้ออังไอน้ำ โดยใช้เวลาที่ได้จากข้อ 3.15

3. จากนั้นเทสารละลายทั้งหมดลงใน volumetric flask ขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 50 มิลลิลิตร

4. ปิเปตสารละลายในข้อ 3 มา 1 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร แล้วดำเนินการเหมือนการเตรียมกราฟมาตรฐานจากข้อ 2-4

5. หาปริมาณแทนนินในไข่เยี่ยวม้าจากกราฟมาตรฐานและน้ำหนักของไข่เยี่ยวม้าที่ใช้

3.16 การศึกษาวิธีการที่จะลดเวลาการหมักไข่สดเป็นไข่เยี่ยวม้า

3.16.1 การแปรสภาพเปลือกไข่เป็ดด้วยกรดอะซิติคเข้มข้นร้อยละ 1 (ปริมาตร/ปริมาตร) ในช่วงเวลาต่าง ๆ

นำไข่เป็ดแช่ลงใน beaker ขนาด 150 มิลลิลิตร ซึ่งมีสารละลายกรดอะซิติคปริมาตร 100 มิลลิลิตรบรรจุอยู่ เมื่อเวลาผ่านไป 10 20 30 และ 45 นาที ปิเปตสารละลายกรดอะซิติคเข้มข้นร้อยละ 1 (ปริมาตร/ปริมาตร) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร มาไตเตรทกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล เพื่อวัดความสามารถในการละลายเปลือกไข่ของกรดอะซิติคที่เวลาต่าง ๆ กัน นำเปลือกไข่ที่ผ่านการแช่กรดอะซิติคที่เวลาต่าง ๆ กัน ไปศึกษาขนาดของรูบนเปลือกไข่ด้วย scanning electron microscope แล้วเลือกระยะเวลาที่เหมาะสมไปใช้

3.16.2 ปริมาณประจุภาคคลอไรด์ที่ซึมผ่านเปลือกไข่เป็ดที่ผ่านการแปรสภาพเปลือกด้วยกรดอะซิติคในช่วงเวลาต่างกัน

นำเปลือกไข่เป็ดที่ล้างไข่ขาวไข่แดงออกหมดแล้ว แช่ในกรดอะซิติคเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตร ในเวลาต่าง ๆ กันคือ 5 นาที และ 30 นาที แล้วนำเปลือกไข่ทั้งสองชนิดไปแช่ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ในช่วงทุก ๆ 4 วัน ปิเปตสารละลายในเปลือกไข่ออกมาวิเคราะห์ปริมาณประจุภาคคลอไรด์

3.16.3 การแปรสภาพเปลือกไข่และเยื่อหุ้มไข่ด้วยกรดอะซิติคและศึกษาขนาดรูบนเปลือกไข่และเยื่อหุ้มไข่โดยกล้องจุลทัศน์อิเลคตรอน

นำเปลือกไข่และเยื่อหุ้มไข่มาแช่ในสารละลายกรดอะซิติคเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตร ในเวลา 30 และ 40 นาที นำมาล้างน้ำกลั่นให้สะอาด ทำให้แห้ง แล้วนำไปวัดขนาดรูบนเปลือกไข่และเยื่อหุ้มไข่ด้วยกล้องจุลทัศน์อิเลคตรอน

3.16.4 การหมักไข่เยี่ยวม้าด้วยไข่สดที่เปลือกไข่ผ่านการแปรสภาพด้วยกรดอะซิติค

นำไข่เป็ดไปแช่ในสารละลายกรดอะซิติคเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตร โดยใช้ระยะเวลาที่ได้จากข้อ 3.16.2 จากนั้นจึงนำไข่ไปแช่ในสารละลายที่จะหมักไข่เยี่ยวม้า ศึกษาเวลาที่ไข่เป็ดเปลี่ยนเป็นไข่เยี่ยวม้าเปรียบเทียบกับไข่เป็ดที่ไม่ได้ผ่านการแปรสภาพของเปลือกไข่

3.17 การตรวจสอบ gel ไข่ขาวของไข่เยี่ยวม้าด้วย differential thermal analysis (DTA) (23)

เพื่อศึกษาลักษณะ gel ไข่ขาวของไข่เยี่ยวม้าที่ผลิตขึ้นจากงานวิจัยนี้เทียบกับไข่เยี่ยวม้าของต่างประเทศ โดยดูจากกราฟ (thermogram) ที่แสดงการเปลี่ยนแปลงของ gel เมื่อเพิ่มอุณหภูมิขึ้นอย่างสม่ำเสมอ

หลักการของ differential thermal analysis (DTA)

การวิเคราะห์ด้วย differential thermal analysis เป็นเทคนิคทางความร้อน ซึ่งบอกความเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิตัวอย่าง (sample) ที่แตกต่างจากอุณหภูมิของสารเปรียบเทียบ (reference material) (โดยมากใช้ผงอะลูมินา, หรือ indium ซึ่งเป็นสารที่จุดเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิที่คงที่) ลักษณะกราฟที่ได้ (thermogram) เป็นลักษณะที่บอกอุณหภูมิสุทธิของผลต่างของสารตัวอย่างและสารเปรียบเทียบ เมื่อเพิ่มอุณหภูมิขึ้นสารตัวอย่างจะเกิดการเปลี่ยนสถานะ เช่น เกิดการหลอมเหลว เกิดการสลาย bond ของโปรตีน ดังนั้นจึงได้นำเทคนิคนี้มาศึกษาลักษณะของ gel ไข่ขาวในไข่เยี่ยวม้า

วิธีทดลอง โดยชั่งน้ำหนักของสารตัวอย่างบรรจุลงใน cell สำหรับทดลองและชั่งน้ำหนักของสารเปรียบเทียบบรรจุลงใน cell อีกอันหนึ่งสำหรับใช้เปรียบเทียบ จากนั้นค่อย ๆ เพิ่มอุณหภูมิอย่างสม่ำเสมอจากน้อยไปหามาก แล้วศึกษาลักษณะ thermogram ที่ได้

3.18 การตรวจสอบ gel ไข่ขาวของไข่เยี่ยวม้าเปรียบเทียบกับไข่ขาวดิบด้วย differential scanning colorimetry (DSC) (23)

ศึกษาลักษณะ gel ไข่ขาวของไข่เยี่ยวม้าที่ผลิตขึ้นจากงานวิจัยนี้เทียบกับไข่ขาวดิบที่อุณหภูมิต่าง ๆ

หลักการของ differential scanning colorimetry (DSC)

หลักการคล้ายกับ DTA เพียงแต่เพิ่มอุปกรณ์วัดค่าพลังงานความร้อนแทน thermocouple ลักษณะ thermogram ที่ได้เป็นค่าของพลังงานความร้อน (enthalpy) สุทธิของผลต่างของสารตัวอย่างและสารเปรียบเทียบ ซึ่งอาจเป็นปฏิกิริยาดูดกลืนความร้อน (endothermic reaction) หรือปฏิกิริยาคายความร้อน (exothermic reaction) เมื่ออุณหภูมิเปลี่ยนไป สารตัวอย่างจะเกิดการเปลี่ยนสถานะ เช่น การแยกสลาย bond ของโปรตีน หรือเกิดการหลอมเหลว

ประโยชน์นี้นำมาศึกษา thermogram ไข่ขาวของไข่เยี่ยวม้าและไข่ขาวดิบดูลักษณะ thermogram ที่แตกต่างกัน

วิธีทดลอง ดำเนินการเหมือนวิธีของ DTA

3.19 การศึกษาความสดของไข่เป็ดที่สามารถใช้ในการหมักไข่เยี่ยวม้า

เตรียมสารละลายจากข้อ 3.11 ให้มีความเข้มข้นและปริมาตรเท่ากันใส่ในภาชนะ 25 ชุด และแช่ไข่เป็ดลงไป ทำการทดลองตั้งแต่ 0-25 วัน เมื่อครบเวลา ก็นำมาศึกษาดูความแตกต่างของไข่เยี่ยวม้าแต่ละชุด เพื่อหาอายุของไข่เป็ดที่สามารถใช้ในการหมักไข่เยี่ยวม้า

3.20 การศึกษาจุลินทรีย์ในไข่เยี่ยวม้า (24)

สารเคมี

1. น้ำเกลือร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก/ปริมาตร
2. plate count agar (PCA)
3. potato dextrose agar (PDA)

3.20.1 การศึกษาเชื้อราและยีสต์บนเปลือกไข่เยี่ยวม้า

1. ทำความสะอาดเปลือกไข่ภายนอกโดยล้างด้วยน้ำให้สะอาด
2. เปิดเปลือกไข่เยี่ยวม้าด้วยกรรไกรที่ฆ่าเชื้อแล้ว ใช้ที่คีบดึงเปลือกไข่ ใช้ไม้ swab จุ่มน้ำเกลือที่ปราศจากเชื้อ เช็ดเปลือกด้านในของไข่จนทั่ว
3. นำ swab จากข้อ 1 มา streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เพื่อศึกษาเชื้อราและยีสต์บนเปลือกไข่

3.20.2 การศึกษาปริมาณจักเตรีในไข่เยี่ยวม้า

1. นำไข่เยี่ยวม้าทั้งฟองที่ลอกเปลือกออกแล้วใส่ในเครื่องตีปั่นที่ผ่านการนึ่งปราศจากเชื้อแล้ว
2. เติมน้ำเกลือเข้มข้นร้อยละ 0.85 โดยน้ำหนัก/ปริมาตรลงไป 100 มิลลิลิตร
3. นำสารละลายจากข้อ 2 มา 25 มิลลิลิตร เติมน้ำเกลือเข้มข้นร้อยละ 0.85 (น้ำหนัก/ปริมาตร) 225 มิลลิลิตร ที่ปราศจากเชื้อ เพื่อทำให้สารละลายเจือจางลงเป็น 1:10

4. นำสารละลายจากข้อ 3 มาเติมน้ำเกลือปราศจากเชื้อ เพื่อทำให้สารละลายเจือจางลงเป็น 1 : 10^2, 10^3, 10^5

5. นำสารละลายแต่ละความเจือจางที่เตรียมไว้ในข้อ 4 มา pour plate และ spread plate บนจานอาหาร PCA

6. บ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง

7. นำจานเพาะเชื้อทั้งหมด มานับจำนวนโคโลนี

จำนวนเชื้อบักเตรีทั้งหมด = จำนวนโคโลนีที่นับได้ x dilution factor

3.21 <u>การศึกษาอายุการเก็บของไข่เยี่ยวม้า</u>

นำไข่เยี่ยวม้าที่ผลิตได้มาเก็บในภาชนะสำหรับวางไข่ที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้ไข่เยี่ยวม้าครั้งละ 10 ฟอง ทำการทดลอง 2 ซ้ำ ศึกษาปริมาณความชื้นและจุลินทรีย์ในไข่เยี่ยวม้า เมื่อเก็บไข่เยี่ยวม้าไว้ในช่วงเวลา 4,8 เดือน

i17804852