ภาคผนวก

ภาคผนวก ก. แบบประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสทดสอบแบบ 9- POINT HEDONIC SCALE

แบบประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส
ผลิตภัณฑ์ข้าวเกรียบปลา

ข้อมูลทั่วไปของผู้ทดสอบ

ชื่อ-สกุล.....ชื่อผลิตภัณฑ์.....

วันที่ ..... เดือน..... พ.ศ..... เวลา.....น.

คำชี้แจง : กรุณาทดสอบตัวอย่างที่เสนอให้จากซ้ายไปขวา แล้วให้คะแนนตามความชอบในแต่ละตัวอย่างที่ตรงกับความรู้สึกของท่านมากที่สุด และกรุณากลั้วปากระหว่างตัวอย่างทุกครั้ง

โดยกำหนดให้ 9 = ชอบมากที่สุด 8 = ชอบมาก 7 = ชอบปานกลาง
6 = ชอบเล็กน้อย 5 = เฉยๆ 4 = ไม่ชอบเล็กน้อย
3 = ไม่ชอบปานกลาง 2 = ไม่ชอบมาก 1 = ไม่ชอบมากที่สุด

คุณลักษณะที่ทดสอบ	ระดับคะแนนความชอบ		
	รหัส.....	รหัส.....	รหัส.....
สี			
กลิ่นคาวปลา			
กลิ่นรสพริกไทย			
รสเค็ม			
ความกรอบ			
การพองตัว			
ความชอบโดยรวม			

ข้อเสนอแนะ

.....

.....

.....

.....

ขอบคุณที่ให้ความร่วมมือ

Prince of Songkla University Pattani Campus

แบบประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส
ผลิตภัณฑ์ข้าวเกรียบปลา

ข้อมูลทั่วไปของผู้ทดสอบ

ชื่อ-สกุล..... วันที่ ..... เดือน..... พ.ศ.....
เวลา.....น.

คำชี้แจง : กรุณาทดสอบตัวอย่างที่เสนอให้จากซ้ายไปขวา แล้วให้คะแนนคุณลักษณะของแต่ละปัจจัยของตัวอย่างที่ใกล้เคียงกับความรู้สึกของท่านมากที่สุด ตามรายละเอียดของเกณฑ์การประเมินคุณลักษณะ **และกรุณากลั้วปากระหว่างตัวอย่างทุกครั้ง**

คุณลักษณะที่ทดสอบ	ระดับคะแนน		
	รหัส.....	รหัส.....	รหัส.....
สี			
กลิ่นคาวปลา			
กลิ่นรสพริกไทย			
รสเค็ม			
ความกรอบ			
การพองตัว			

เกณฑ์การประเมินคุณลักษณะ

ระดับคะแนน	สี	กลิ่นคาวปลา	กลิ่นรสพริกไทย	รสเค็ม	ความกรอบ	การพองตัว
1	ขาวมาก	ไม่มีกลิ่น	ไม่มีกลิ่น	ไม่เค็มเลย	ไม่กรอบเลย	ไม่พองตัวเลย
2	ขาวเล็กน้อย	มีกลิ่นเล็กน้อย	มีกลิ่นเล็กน้อย	เค็มเล็กน้อย	กรอบเล็กน้อย	พองตัวเล็กน้อย
3	ขาวปานกลาง	มีกลิ่นปานกลาง	มีกลิ่นปานกลาง	เค็มปานกลาง	กรอบปานกลาง	พองตัวปานกลาง
4	ค่อนข้างเหลือง	ค่อนข้างมีกลิ่น	ค่อนข้างมีกลิ่น	ค่อนข้างเค็ม	ค่อนข้างกรอบ	ค่อนข้างพองตัว
5	เหลืองเข้ม (อมน้ำตาล)	มีกลิ่นมาก	มีกลิ่นมาก	เค็มมาก	กรอบมาก	พองตัวมาก

Prince of Songkla University Pattani Campus

เอกสารประกอบการประเมิน
ผลิตภัณฑ์ข้าวเกรียบปลา

รายละเอียดการให้คะแนนคุณลักษณะ

1. สี

1= ขาวมาก 2 = ขาวเล็กน้อย 3 = ขาวปานกลาง
4 = ค่อนข้างเหลือง 5 = เหลืองเข้ม (อมน้ำตาล)

2. กลิ่นคาวปลา

1= ไม่มีกลิ่น 2 = มีกลิ่นเล็กน้อย 3 = มีกลิ่นปานกลาง
4 = ค่อนข้างมีกลิ่น 5 = มีกลิ่นมาก

3. กลิ่นรสพริกไทย

1= ไม่มีกลิ่น 2 = มีกลิ่นเล็กน้อย 3 = มีกลิ่นปานกลาง
4 = ค่อนข้างมีกลิ่น 5 = มีกลิ่นมาก

4. รสเค็ม

1= ไม่เค็มเลย 2 = เค็มเล็กน้อย 3 = เค็มปานกลาง
4 = ค่อนข้างเค็ม 5 = เค็มมาก

5. ความกรอบ

1= ไม่กรอบเลย 2 = กรอบเล็กน้อย 3 = กรอบปานกลาง
4 = ค่อนข้างกรอบ 5 = กรอบมาก

6. การพองตัว

1= ไม่พองตัวเลย 2 = พองตัวเล็กน้อย 3 = พองตัวปานกลาง
4 = ค่อนข้างพองตัว 5 = พองตัวมาก

ภาคผนวก ข การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

1. การวิเคราะห์ปริมาณความชื้นโดยวิธี Air oven method (A.O.A.C., 2000)

อุปกรณ์

1. ตู้อบไฟฟ้า (Hot air oven)
2. ภาชนะอะลูมิเนียม
3. โถดูดความชื้น (Desiccator)
4. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง

วิธีการ

1. อบภาชนะอะลูมิเนียมในตู้อบไฟฟ้าอุณหภูมิ 105 ± 5°ซ นานประมาณ 2-3 ชั่วโมง แล้วนำออกมาจากตู้อบไฟฟ้าใส่ไว้ในโถดูดความชื้น ปล่อยทิ้งไว้ให้เย็นโดยให้อุณหภูมิของภาชนะลดลงเท่ากับอุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นชั่งน้ำหนัก

2. กระทำเช่นข้อ 1 ซ้ำ จนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งสองครั้งค่าแตกต่างกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

3. ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน ประมาณ 1-2 กรัม ใส่ในภาชนะซึ่งทราบน้ำหนักแล้ว

Prince of Songkla University Pattani Campus

4. นำไปอบในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105 $\pm$ 5°ซ นานประมาณ 5-6 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบใส่ไว้ในโถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนักภาชนะพร้อมตัวอย่างนั้น

5. นำกลับเข้าตู้อบอีกครั้ง กระทำเช่นเดิมจนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

6. คำนวณหาปริมาณความชื้นจากสูตร

$$\text{ความชื้น (ร้อยละ} = \frac{(a - b)}{a} \times 100$$

เมื่อ a = น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ (กรัม)

b = น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ (กรัม)

2. การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า โดยวิธี Direct method (A.O.A.C., 2000)

อุปกรณ์

1. เตาเผา (Muffle furnace)
2. ถ้วยกระเบื้องเคลือบ (Porcelain crucible)
3. เตาไฟฟ้า (Hot plate)
4. โถดูดความชื้น (Desiccator)
5. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง

วิธีการ

1. เผาถ้วยกระเบื้องเคลือบในเตาเผาที่อุณหภูมิ 600°ซ เป็นเวลานาน 3 ชั่วโมง ปิดสวิตช์เตาเผาแล้วรอประมาณ 30-45 นาที เพื่อให้อุณหภูมิในเตาเผาลดลงก่อน แล้วนำออกมาเตาเผาใส่ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้องแล้วชั่งน้ำหนัก

2. เผาซ้ำอีกครั้งประมาณ 30 นาที และกระทำเช่นข้อ 1 จนได้ผลต่างของน้ำหนักทั้ง 2 ครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

3. ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักแน่นอนประมาณ 2 กรัม ใส่ในถ้วยกระเบื้องเคลือบที่ทราบน้ำหนักแน่นอนแล้ว นำไปเผาในตู้ควันจนหมดควัน แล้วจึงนำเข้าเตาเผาอุณหภูมิ 600°ซ และกระทำเช่นเดียวกับข้อ 1-2

4. คำนวณปริมาณเถ้าจากสูตร

$$\text{ปริมาณเถ้า (ร้อยละโดยน้ำหนัก)} = \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างหลังเผา (กรัม)}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น (กรัม)}} \times 100$$

Prince of Songkla University Pattani Campus

3. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน โดยวิธี Kjeldahl method (A.O.A.C., 2000)

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ย่อยโปรตีน
2. อุปกรณ์กลั่นโปรตีน
3. ขวดปรับปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร
4. ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร
5. ปิเปตขนาด 5 และ 10 มิลลิลิตร
6. บิวเรตขนาด 25 มิลลิลิตร
7. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง
8. ลูกแก้ว
9. บีกเกอร์
10. กระดาษกรอง

สารเคมี

1. สารเร่งปฏิกิริยา (ใช้สารผสมระหว่างคอปเปอร์ซัลเฟต : โพเทสเซียมซัลเฟต อัตราส่วน 1 : 10)
2. กรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 96-97 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร
3. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 40
4. สารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 นอร์มัล
5. สารละลายกรดบอริก (H_2BO_3) เข้มข้นร้อยละ 4
6. อินดิเคเตอร์ (สารผสมระหว่าง Bromocresolresin : Methyl red : Methylein blue อัตราส่วน 0.1 : 125 : 0.028 ใน Ethyl alcohol 100 มิลลิลิตร)

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่างบนกระดาษกรอง ให้ได้น้ำหนักแน่นอนประมาณ 1-2 กรัม ห่อให้มิดชิดใส่ลงในขวดย่อยโปรตีน
2. เติมสารเร่งปฏิกิริยาลงไป 5 กรัม
3. เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นปริมาตร 20-25 มิลลิลิตร
4. ใส่ลูกแก้ว นำไปย่อยบนเตาเผาในตู้ควัน จนกระทั่งได้สารละลายใส่ ปล่อยทิ้งไว้ให้เย็น
5. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงในหลอดย่อยโปรตีน
6. เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 40 ปริมาตร 60 มิลลิลิตร ลงในหลอดย่อยโปรตีน
7. นำขวดรูปชมพู่ ซึ่งบรรจุกรดบอริกเข้มข้นร้อยละ 4 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร เติมอินดิเคเตอร์ 2-3 หยด นำไปกลั่นลงในขวดที่รองรับ
8. กลั่นนานประมาณ 10 นาที ล้างปลายชุดควบแน่นด้วยน้ำกลั่นลงในขวดที่รองรับ
9. ไตเตรทสารละลายที่กลั่นได้ด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่เข้มข้น 0.1 นอร์มัล จนกระทั่งสีของสารละลายเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีม่วง บันทึกปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไป

Prince of Songkla University Pattani Campus

10. ทำแบลงค์ ตามข้อ 1-9 โดยไม่ต้องใส่ตัวอย่าง

11. คำนวณปริมาณโปรตีนจากสูตร

$$\text{ปริมาณโปรตีน (ร้อยละโดยน้ำหนักแห้ง)} = \frac{(A - B) \times N \times 14.007 \times F}{Wt}$$

เมื่อ A = ปริมาณของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการไตเตรทตัวอย่าง (มิลลิลิตร)
B = ปริมาณของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการไตเตรทแบลงค์ (มิลลิลิตร)
N = ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก (นอร์มัล)
F = ค่าแฟคเตอร์ (F = 6.25)
Wt = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

4. การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน โดยวิธี Solvent extraction (A.O.A.C., 2000)

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ชุดสกัดไขมันประกอบด้วยขวดกลมสำหรับใส่สารตัวทำละลายได้แก่ ซอคเลต (Soxhlet) อุปกรณ์ควบแน่น (Condenscr) และเตาให้ความร้อน (Heating mantle)
2. หลอดใส่ตัวอย่าง (Extraction thimble)
3. ตู้อบไฟฟ้า (Hot air oven)
4. โถดูดความชื้น (Desiccator)
5. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง
6. สำลี

สารเคมี

ปิโตรเลียมอีเทอร์

วิธีการ

1. อบขวดกลมสำหรับหาปริมาณไขมัน ขนาด 250 มิลลิลิตร ในตู้อบที่อุณหภูมิ 105°ซ ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักจนกระทั่งได้น้ำหนักที่แน่นอน
2. ชั่งตัวอย่างบนกระดาษกรองที่ทราบน้ำหนัก ถ้าตัวอย่างที่ใช้เป็นอาหารที่มีไขมันมากให้ชั่ง 1-2 กรัม ถ้าเป็นชนิดที่มีไขมันน้อยใช้ 3-5 กรัม ห่อให้มิดชิด แล้วใส่ลงในหลอดสำหรับใส่ตัวอย่าง
3. นำหลอดใส่ตัวอย่างลงในซอคเลต
4. เติมสารตัวทำละลายปิโตรเลียมอีเทอร์ปริมาตร 200 มิลลิลิตร แล้ววางบนเตาให้ความร้อน
5. ประกอบเข้าชุดกับชุดสกัดไขมันพร้อมกับเปิดน้ำหล่ออุปกรณ์ควบแน่นและเปิดสวิตซ์ให้ความร้อน
6. ใช้เวลาในการสกัดไขมันนานประมาณ 14 ชั่วโมง โดยปรับความร้อนให้หยดของสารตัวทำละลายกลั่นตัวจากอุปกรณ์ควบแน่นด้วยอัตรา 150 หยดต่อนานที

Prince of Songkla University Pattani Campus

7. เมื่อสกัดจนครบ 14 ชั่วโมงแล้ว นำหลอดใส่ตัวอย่างออกจากซอคเลต ทิ้งให้ตัวทำละลายไหลจากซอคเลตลงในขวดกลมจนหมด

8. ระเหยตัวทำลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ

9. นำขวดกลมไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 80-90°ซ ประมาณ 30 นาที ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักกระทำซ้ำจนกระทั่งได้น้ำหนักคงที

10. คำนวณหาปริมาณไขมันจากสูตร

$$\text{ปริมาณไขมัน (ร้อยละโดยน้ำหนักแห้ง)} = \frac{\text{น้ำหนักไขมันหลังอบ (กรัม)}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}} \times 100$$

-คาร์โบไฮเดรตที่ใช้ประโยชน์ได้

หาจากการคำนวณ

- คำนวณปริมาณคาร์โบไฮเดรตโดยใช้สูตร

ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด (ร้อยละ) = 100 – ความชื้น(ร้อยละ) - ไขมัน (ร้อยละ) – โปรตีน(ร้อยละ) – เถ้า (ร้อยละ)

-คำนวณหาพลังงาน

ใช้ค่าใช้ค่าสำหรับคูณจำนวนกรัมของสารอาหารหลัก

4 × จำนวนกรัมของโปรตีน

4 × จำนวนกรัมของคาร์โบไฮเดรต

9× จำนวนกรัมของไขมัน

ภาคผนวก ค การวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพ

- การวิเคราะห์การพองตัว

การขยายตัว (Expansion) เป็นการวัดความหนาของข้าวเกรียบ (มิลลิเมตร) ก่อนและหลังการทอดที่น้ำมัน 150 องศาเซนเซียส โดยใช้เวอร์เนียวัดความหนาที่ตำแหน่งต่าง ๆรอบ ๆแผ่นข้าวเกรียบ ตำแหน่ง ใช้ค่าเฉลี่ยตัวอย่างละ 10 แผ่น จากนั้นคำนวณโดย การวัดการพองตัว โดยวิธี Yu Michell and Abdullah (Yu,S.Y., Michell,J.R. and Abdullah, A., 1981)

$$\text{Percentage linear expansion} = \frac{\text{Length after puffing - Length before puffing}}{\text{Length before puffing}} \times 100$$

- การวิเคราะห์ค่าความแข็ง

การวัดค่าแรงกดของเนื้อสัมผัส (Compression Force) โดยใช้อุปกรณ์ เครื่อง (Texture analyzer) ยี่ห้อ Stable micro system

Prince of Songkla University Pattani Campus

วิธีการ

1. เลือกโปรแกรม Texture expert English
2. ใช้หัววัดแบบหัวเข็มรูปวงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 45 มิลลิลิตร และติดฐานวางตัวอย่างข้าวเกรียบลงบนฐานรองรับรูปทรงกระบอกกรวงขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร
3. ทำการวัดโดยให้หัววัดกดลงบนตัวอย่าง ซึ่งความเร็วของหัววัดขณะทดสอบ 1 มิลลิเมตรต่อวินาที ความเร็วของหัววัดหลังการทดสอบ 10 มิลลิเมตรต่อวินาที และให้หัววัดกดตัวอย่างลงเป็นระยะทาง 3 มิลลิเมตรต่อวินาที ทดสอบจำนวน 10 ซ้ำ
4. อ่านค่าแรงกดสูงสุดของตัวอย่างข้าวเกรียบที่วัดได้ จากค่า Maximum force

การวิเคราะห์ปริมาณ Thiobarbituric acid ดัดแปลงตามวิธีของ (Buege and Aust,1978)

วิธีการวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่างน้ำหนักอย่างละเอียด 10 กรัม ปั่นให้ละเอียดกับน้ำ 50 มิลลิลิตร ด้วยเครื่องโอโมจิไนซ์นาน 2 นาที ถ่ายลงในขวดก้นกลมกลั้วด้วยน้ำกลั่น 47.5 มิลลิลิตร เติม 4 N HCl 2.5 มิลลิลิตร
2. เติม glass bead 2-3 เม็ด และ dilution antiforrming agent 0.5 มิลลิลิตร
3. นำไปกลั่นให้ได้ distrillate ประมาณ 50 มิลลิลิตร
4. ใช้ปิเปตถ่ายสารละลายตัวอย่างในข้อ 4 จำนวน 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดแก้วที่แห้ง เติม TBARs reagent 5 มิลลิลิตร (ละลาย 2- Thiobarbituric acid ใน 90% acetic acid) ปิดฝาเขย่าให้ผสมเข้ากันดี นำไปต้มในน้ำเดือด 35 นาที
5. ทำให้เย็นโดยการแช่ในน้ำเย็นประมาณ 10 นาที
6. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร
7. คำนวณค่า TBARs ในรูปของ malonaldehyde โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5, 1.0,1.5, และ 2.0 µg/ml รายงานค่าเป็น mg malonaldehyde /kg.sample

ภาคผนวก ง วิธีการศึกษา Calcium availability from foods by dialysis method

สารเคมี

1. สารละลายกรดไฮโดรคลอริคที่มีความเข้มข้น 0.1 โมลาร์
2. สารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนตความเข้มข้น 0.1 โมลาร์
3. 6 M HCl
4. 0.5 M NaOH
5. Pepsin (P-7000 from porcine stomach)
6. Pancreatin (P-1750 from porcine pancreas)
7. Salt biliary extract (B-8631 porcine)
8. Na_2EDTA 0.01M
9. 2%$NaHCO_3$
10. 1%Na dodecylsulphate

Prince of Songkla University Pattani Campus

11. Calcium standard
12. NHO_3 sp.gr. 1.40
13. De-ionized distill water

อุปกรณ์

1. Dialysis membranes, pore size (MMCO) of 10000-12000 Da (Visking 3-20/32",15.9 Medicell, London, UK)
2. Erlenmayer flask 500, 250 ml
3. pipette 10 ml
4. beaker 500 ml, 50 ml
5. ขวดพลาสติกขนาด ความจุ 50 ml
6. centrifuge tube ขนาด 25 ml
7. forceps
8. เครื่องชั่ง ความละเอียด 0.001 กรัม
9. pH meter
10. shaking water bath with temperature control

อุปกรณ์และเครื่องแก้วทุกชนิดที่ใช้จะต้องทำการแช่ในสารละลาย HNO_3 (sp.gr. 1.40) เป็นเวลา 10 นาที และล้างด้วยน้ำ DI 3 รอบเพื่อกำจัดแร่ธาตุที่อาจมีการปนเปื้อน และทำให้แห้งก่อนนำไปใช้*

การเตรียมน้ำย่อย (เตรียมเสร็จและใช้ทันที)

1. Pepsin solution: ละลายเปปซินปริมาณ 1.6 กรัม ใน 10 มล.ของสารละลายกรดไฮโดรคลอริคที่มีความเข้มข้น 0.1 โมลาร์
2. Pancreatin & biliary salt solution: ละลายแพนครีเอตินปริมาณ 0.2 กรัม และ สารสกัดเกลือน้ำดีปริมาณ 1.25 กรัม ใน 50 มล.ของสารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนตความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

วิธีการเตรียมถุง dialysis

1. ใส่ถุงมือ ก่อนตัดถุง dialysis ยาวประมาณ 35-40 เซนติเมตร เพื่อใช้พื้นที่ 25 cm
2. ต้มถุงในสารละลาย 0.01M Na_2EDTA, 2%$NaHCO_3$ และ 0.1%Na dodecylsulphate เป็นเวลา 10 นาที เพื่อกำจัดแร่ธาตุต่าง ๆ ที่มีการปนเปื้อนในถุง
3. นำถุงไปล้างผ่านน้ำ DI 5 ครั้ง หลังจากนั้นนำไปต้มในน้ำ DI เป็นเวลา 5-10 นาที
4. เก็บถุงไว้ใน สารละลาย ethanol ความเข้มข้น 20% โดยเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4^0C
5. ก่อนจะนำไปใช้ ให้ล้างด้วยน้ำ DI หลาย ๆ ครั้ง

การเตรียม Calcium standard (เตรียมและใช้ทันที)

ใช้น้ำ DI เจือจางสารละลายแคลเซียมมาตรฐานที่ความเข้มข้น 1000 มก/ลิตร (1 มก./มล)

วิธีการ

In vitro digestion (อ้างจาก Mechteldis et al, 1993)

1. Pepsin digestion

Private of Songkla University Pattani Campus

1.1 นำตัวอย่างอาหารแห้งปริมาณ 25 กรัม ไปละลายในน้ำ DI ปริมาตร 200 มล. ที่บรรจุในขวดพลาสติก

1.2 ปรับ pH เป็น 2.1 ด้วยกรด HCl

1.3 เติมสารละลายเปปซินปริมาตร 7.5 มล. และปรับ pH ให้ได้ ให้อยู่ในช่วง 1.97 – 2.03

1.4 ปรับน้ำหนักของสารละลายทั้งหมดให้เป็น 250 กรัม ด้วยน้ำ DI

1.5 บ่มสารละลายทั้งหมดใน shaking water bath ควบคุมอุณหภูมิที่ 37^{0}C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยปรับ pH ให้ได้ 2 ในทุก ๆ 30 นาที [100-200 stroke/min, arm movement = 2 cm (Luthen et al, 1996)]

2. Titratable acidity

ในระหว่างที่ทำการวัด titratable acidity ให้เก็บตัวอย่างที่ผ่านการย่อยด้วยเปปซินในน้ำแข็ง (หรือ ตู้เย็น) เป็นเวลา 90 นาที

2.1 แบ่งตัวอย่างที่ผ่านการย่อยด้วยเปปซิน มา 20 กรัม แล้วเติมสารละลายแพนครีเอตินปริมาณ 5 กรัม แล้วปรับ pH เป็น 7.5 ด้วย 0.5 M NaOH (อุณหภูมิตัวอย่างทดลองอยู่ที่ 20^{0}C)

2.2 เมื่อเวลาผ่านไป 30 นาที ทำการวัด pH และปรับ pH ให้อยู่ในที่ 7.5

Titratable acidity คือ ปริมาตร 0.5 M NaOH ที่ใช้เพื่อควบคุม pH ให้อยู่ที่ 7.5

3. pH adjustment for pancreatic digestion

3.1 แบ่ง suspension ที่ผ่านการย่อยด้วยเปปซินแล้ว ออกเป็นส่วน ๆ ละ 20 ใส่ใน Erlenmayer flash ขนาด 250 มล. กรัม (ทำ 3 ซ้ำ) นำไปวางใน water bath อุณหภูมิ 37^{0}C เป็นเวลา 5 นาที

3.2 นำถุง dialysis ความยาว 25 ซม. ที่ทำความสะอาดแล้ว ที่บรรจุ Na_2HCO_3 ในปริมาณ (จำนวนโมล) ที่เท่ากับ titratable acidity (โมลของ NaOH ที่ใช้ในการทำ titratable acidity) แล้วเติมน้ำ DI ให้มีปริมาตร 25 มล. ไปใส่ในขวดตัวอย่าง

3.3 ชั่งน้ำหนักรวมของถุง สารละลาย และclip

3.4 บ่มขวดที่มีสารที่ย่อยทั้งหมด ใน shaking water bath ควบคุมอุณหภูมิที่ 37^{0}C เป็นเวลา 30 นาที

4. Pancreatin digestion

4.1 วัด pH แล้วเติม pancreatin-bile extract mixture ลงในตัวอย่าง 3 ขวด ๆ ละ 5 มล.

4.2 บ่มขวดที่มีสารที่ย่อยทั้งหมด ใน shaking water bath ควบคุมอุณหภูมิที่ 37^{0}C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง วัด pH เมื่อสิ้นสุดการบ่ม

4.3 ปิดขวดใส่ตัวอย่างในระหว่างกระบวนการย่อย ด้วยพาราฟิล์ม

** run blank ในทุก experiment เพื่อ correction of small amounts of dialyzable minerals and trace element from reagents**

Calcium determination

1. เก็บตัวอย่าง dialyzable Calcium

1.1 ล้างถุง dialysis ด้วยน้ำ DI สะเด็ดน้ำให้แห้ง (อย่างระมัดระวัง) ชั่งน้ำหนัก

1.2 เทสารละลายในถุง dialysis ในขวดที่แช่กรดแล้ว

Prince of Songkla University Pattani Campus

1.3 ชั่งน้ำหนักถุง พร้อม clip

2. วิเคราะห์ปริมาณ dialyzable calcium ด้วย AAS (เติม lanthanum ในปริมาณ 0.1%(W/V)

Dry ashing

ใช้น้ำนมปริมาณ 10 กรัม หรือนมผงปริมาณ 2 กรัม ตัวอย่างข้าวเกรียบในปริมาณ 2 กรัม เผาให้เป็นเถ้าในเตาเผา อุณหภูมิ 450 องศา เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อได้เป็นเถ้าแล้วให้ละลายด้วยกรดไฮโดรคลอริค (sp.gr. 1.19) ปริมาตร 0.4 มล. แล้วเติมน้ำ DI ให้ได้ 10 มล.

วิเคราะห์ปริมาณ calcium ในเถ้าของตัวอย่าง ด้วย AAS

การคำนวณ dialysis percentage

%dialysis = 100 *D/C

เมื่อ D คือ ปริมาณแคลเซียมที่วิเคราะห์ได้ในถุง dialysis (หน่วยเป็น mgCa/100 ml sample)

C คือ ปริมาณแคลเซียมทั้งหมดในตัวอย่าง (หน่วยเป็น mgCa/100 ml sample)

การหา solubility percentage

ตัวอย่างที่ผ่านการย่อยทั้งหมด ส่วนที่ไม่ได้ dialysate ไปปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบ 3000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำส่วนใสไปวิเคราะห์หาปริมาณแคลเซียม ส่วนนี้คือปริมาณแคลเซียมที่ละลายได้แต่ไม่ซึมผ่านเมมเบรน

% soluble calcium = [100*(D+ปริมาณแคลเซียมใน supernatant)]/C

ปริมาณแคลเซียมใน supernatant (mgCa/100 ml sample)

วิธีเตรียมถุง dialysis

1. ใส่ถุงมือ ก่อนตัดถุง dialysis ยาวประมาณ 20-25 เซนติเมตร เพื่อใช้พื้นที่ 5 cm
2. soak in deionized water (DI water) for 15 min
3. stir, heat at 80 °C in 10 mM sodium bicarbonate for 30 min (MW/100 = 10 mM)
4. transfer membrane to 10 mM Na_2EDTA and soak for 30 min
5. transfer membrane to DI water + stir at 80 °C for 30 min
6. cool down
7. เก็บตู้เย็น โดยแช่ใน 0.05% sodium azide solution
   หรือ 0.1% sodium benzoate solution
   เพื่อป้องกันเชื้อรา

เช้าวันที่จะใช้ถุง dialysis

1. ล้างด้วย DI water

Prince of Songkla University Pattani Campus

2. ล้างด้วย dialysis buffer
3. clamp ปลายข้างหนึ่งของถุง ใส่ DI water or buffer เพื่อ test ว่าถุงรั่วไหม
4. ใส่ sample
5. ใส่ buffer or DI water ที่จะใช้ในการทดลอง
6. นำถุง dialysis ที่มี sample + buffer ไปใส่ในขวดรูปชมพู่ที่มี DI water

ใช้น้ำนมปริมาณ 10 กรัม หรือนมผงปริมาณ 2 กรัม ตัวอย่างข้าวเกรียบในปริมาณ 2 กรัม เผาให้เป็นเถ้าในเตาเผา อุณหภูมิ 450 องศา เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อได้เป็นเถ้าแล้วให้ละลายด้วยกรดไฮโดรคลอริค (sp.gr. 1.19) ปริมาตร 0.4 มล. แล้วเติมน้ำ DI ให้ได้ 10 มล.

วิเคราะห์ปริมาณ calcium ในเถ้าของตัวอย่าง ด้วย AAS

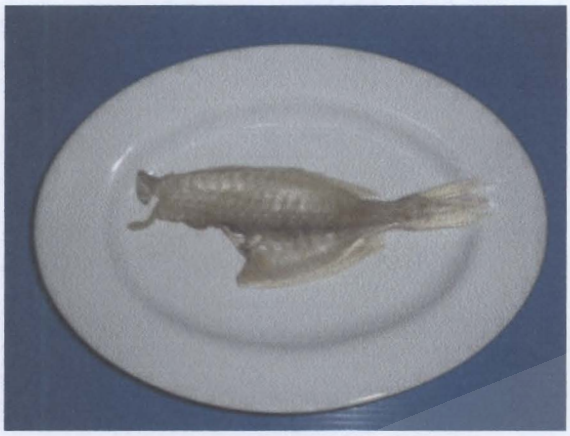
การคำนวณ dialysis percentage

% dialysis = 100 *D/C

เมื่อ D คือ ปริมาณแคลเซียมที่วิเคราะห์ได้ในถุง dialysis (หน่วยเป็น mgCa/100 ml sample)
C คือ ปริมาณแคลเซียมทั้งหมดในตัวอย่าง (หน่วยเป็น mgCa/100 ml sample)

Prince of Songkla University Pattani Campus

ภาคผนวก จ ภาพประกอบผลการวิจัย

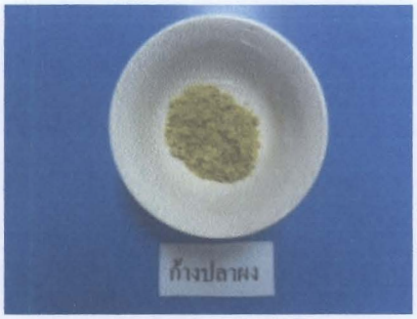


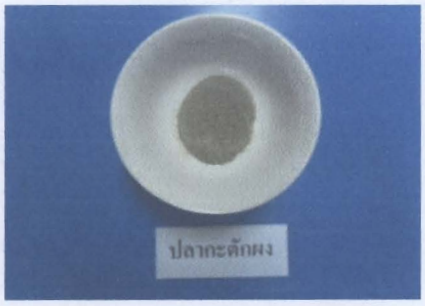
ก้างปลา

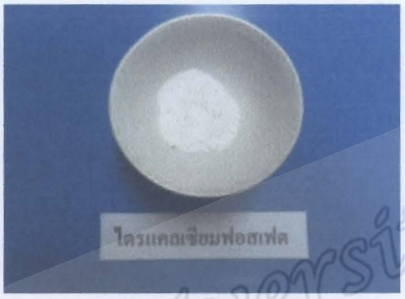
ปลากระตัก

ภาพที่ 7 วัตถุดิบปลา

Prince of Songkla University Pattani Campus

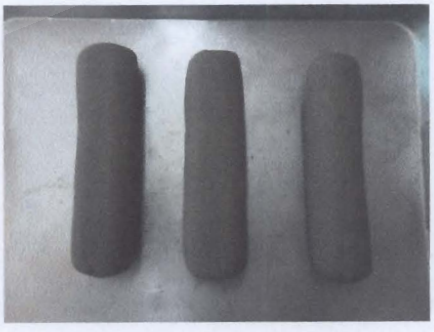




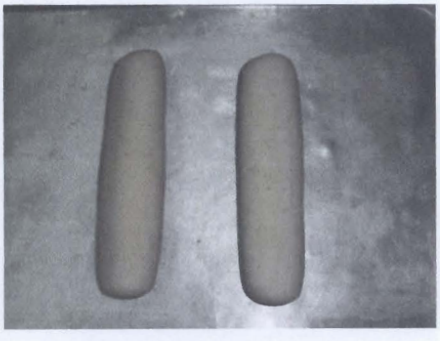


ภาพที่ 8 วัตถุดิบแคลเซียมผง

โดข้าวเกรียบก้างปลา



โดข้าวเกรียบปลากระตัก



โดข้าวเกรียบไตรแคลเซียมฟอสเฟต

ภาพที่ 9 โดข้าวเกรียบก่อนการนึ่ง

Prince of Songkla University Pattani Campus

ข้าวเกรียบเสริมก้างปลาผง

ข้าวเกรียบเสริมปลากระตักผง

ข้าวเกรียบเสริมไตรแคลเซียมฟอสเฟต

ภาพที่ 10 ข้าวเกรียบเสริมแคลเซียม

Prince of Songkla University Pattani Campus