

รายงานการปฏิบัติงานสหกิจศึกษา

“MCL(Manufacturing control limit) Review Line2”

“Freshness (review)”

“RVA(Rapid visco-analyzer) condition
for material”

ผู้จัดทำ

นางสาว เพ็ญประภา ปิยธรรมวิบูลย์
B4152545

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของรายวิชา 305467 สหกิจศึกษา
สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

รายงานการปฏิบัติงานสหกิจศึกษา

“MCL(Manufacturing control limit) Review Line2”

“Freshness (review)”

“RVA(Rapid visco-analyzer) condition
for material”

ผู้จัดทำ

นางสาว เพ็ญประภา ปิยธรรมวิบูลย์

B4152545

ปฏิบัติงาน ณ

บริษัท เอฟเฟม ฟู้ดส์ ประเทศไทย จำกัด

799 หมู่ 4 ต.จันทึก อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

วันที่ 16 เมษายน พ.ศ. 2545

เรื่อง ขอส่งรายงานการปฏิบัติงานสหกิจศึกษา

เรียน อาจารย์ที่ปรึกษาสหกิจศึกษา สาขาวิชา เทคโนโลยีอาหาร

ตามที่ข้าพเจ้า นางสาวเพ็ญประภา ปิยธรรมวิบูลย์ นักศึกษาสาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ได้ออกปฏิบัติงานสหกิจศึกษา (305467) ระหว่างวันที่ 24 ธันวาคม 2544 ถึง วันที่ 12 เมษายน 2545 ในแผนกวิจัยและพัฒนา ณ บริษัท เอฟเฟม ฟู้ดส์ ประเทศไทย และได้รับมอบหมายจาก Supervisor ให้ศึกษา เรื่อง MCL(Manufacturing control limit) Review, Freshness (review) และ RVA(Rapid visco-analyzer) condition for material

บัดนี้ การปฏิบัติงานสหกิจศึกษาได้สิ้นสุดลงแล้ว ข้าพเจ้าจึงขอส่งรายงานดังกล่าวจำนวน 1 เล่ม เพื่อขอรับคำปรึกษาต่อไป

จึงเรียนมาเพื่อโปรดพิจารณา

ขอแสดงความนับถือ

เพ็ญประภา

(นางสาวเพ็ญประภา ปิยธรรมวิบูลย์)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

กิตติกรรมประกาศ

การที่ข้าพเจ้าได้มาปฏิบัติงานสหกิจศึกษา ณ บริษัท เอฟเอ็ม ฟู้ดส์ ประเทศไทย จำกัด ตั้งแต่วันที่ 24 ธันวาคม พ.ศ. 2544 – 12 เมษายน พ.ศ. 2545 ส่งผลให้ข้าพเจ้าได้รับความรู้และประสบการณ์ต่างๆ ในการทำงานอย่างมากมาย และการปฏิบัติงานรวมทั้งรายงานฉบับนี้ ซึ่งได้สำเร็จลุล่วงมาด้วยดีจากความ ร่วมมือและสนับสนุนจากพี่ที่บริษัทหลายๆฝ่าย โดยเฉพาะ คุณ นพรัตน์ เดชณรงค์ศักดิ์ (Co-op supervisor) ที่คอยให้คำปรึกษา ดูแล แนะนำ และคอยช่วยเหลือเป็นอย่างดีในระหว่างที่ปฏิบัติงานสหกิจ ศึกษา พี่ๆที่ห้องปฏิบัติการเคมีและจุลชีววิทยา(Laboratory) พี่ๆในส่วนของผลิต (production) และบุคคล อื่นๆที่ไม่ได้เอียนาม ณ ที่นี้

ข้าพเจ้า ใคร่ขอขอบพระคุณเป็นอย่างยิ่ง ในความอนุเคราะห์ในเรื่องต่างๆในระหว่างที่ข้าพเจ้า ปฏิบัติงานสหกิจศึกษาอยู่ที่บริษัทไว้ ณ ที่นี้

เพ็ญประภา ปิยธรรมวิบูลย์

ผู้จัดทำรายงาน

12 เมษายน 2545



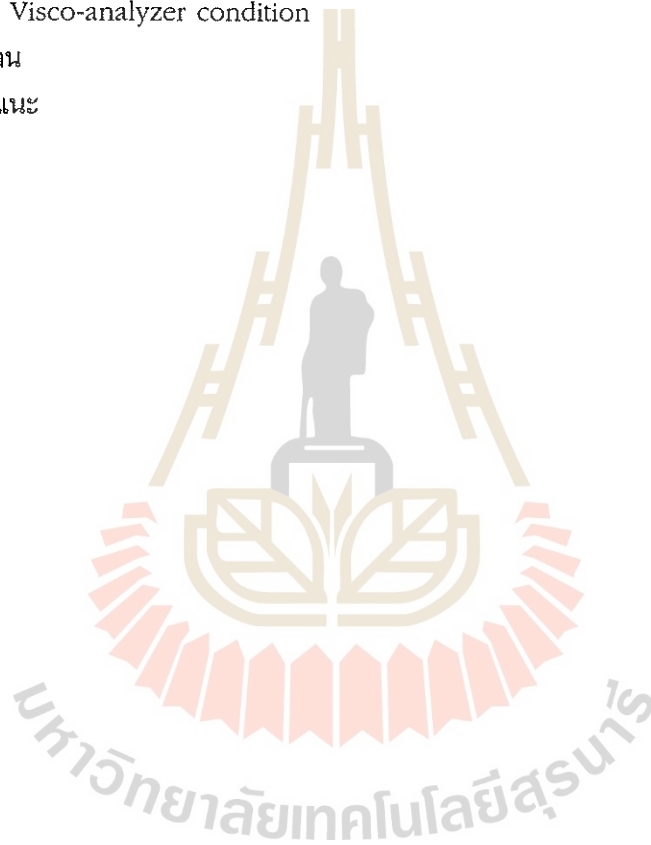
บทคัดย่อ

บริษัท เอฟเฟมฟู๊ดส์ ประเทศไทย เป็นบริษัทในเครือของ Mars ซึ่งผลิตอาหารสุนัขและอาหารแมว ภายใต้ชื่อ “Pedigree” , “Whiskas”, “Chappi” etc. จากการที่ได้เข้าปฏิบัติงานโครงการสหกิจศึกษา ในบริษัท เอฟเฟมฟู๊ดส์ ประเทศไทย ได้รับมอบหมายให้ปฏิบัติงานในแผนกวิจัยและพัฒนา นั้น ได้รับมอบหมายให้ศึกษาในเรื่องการหาคอนดิชันของเครื่องวัดความหนืดในแป้งที่เป็นวัตถุดิบ(RVA; Rapid visco-analyzer condition for material) โดยทำการหาคอนดิชันที่ใช้ได้กับวัตถุดิบได้ภายในคอนดิชันเดียวกัน ทำการเลือกจากลักษณะกราฟที่ได้เป็นกราฟของการเกิดเจลของเม็ดแป้ง(Pasting curve) และคอนดิชันที่ได้ คือ standard 1 ส่วนการศึกษาเรื่องดัชนีบอกความสด(Freshness)นั้นจะทำการรวบรวมข้อมูลที่เป็นดัชนีบอกความสดขององค์ประกอบที่เป็นโปรตีนและเปรียบเทียบกับการนำไปใช้ในวัตถุดิบA และพบว่าวัตถุดิบA สามารถใช้ลักษณะปรากฏและค่าของHistamine เป็นดัชนีบอกความสดได้แต่ควรมีการศึกษาที่ต่อเนื่องไปอีก และการศึกษาสมรรถนะของกระบวนการผลิต(MCL review)รวบรวมข้อมูลที่ได้จากกระบวนการผลิต โดยเครื่องอิเล็กทรอนิกส์เครื่องที่2 ตั้งแต่เดือน มกราคม 2544 ถึง เดือนมกราคม 2545 และคำนวณหาค่า C_{pk} เพื่อบอกสมรรถนะของการผลิตโดยทั่วไป $C_{pk} \geq 1.33$ แสดงว่ากระบวนการผลิตยังใช้ได้ดี ถ้า $1.33 > C_{pk} \geq 1.00$ แสดงว่ากระบวนการผลิตยังใช้ได้ และถ้า $C_{pk} < 1.00$ แสดงว่ากระบวนการผลิตนั้นควรแก้ไข ซึ่งในการปฏิบัติดังกล่าวข้างต้นทำให้เกิดประโยชน์แก่บริษัทและข้าพเจ้าเป็นอย่างยิ่ง



สารบัญ

	หน้า
จดหมายนำส่ง	I
กิตติกรรมประกาศ	II
บทคัดย่อ	III
บทนำ	1
รายละเอียดของโครงการ	2
1. Manufacturing control limit Line 2	3
2. Freshness	6
3. Rapid Visco-analyzer condition	11
สรุปผลการปฏิบัติงาน	17
ปัญหาและข้อเสนอแนะ	18
บรรณานุกรม	19
ภาคผนวก	20



สารบัญตารางและรูปภาพ

	หน้า
1. Manufacturing control limit Line 2	
รูปที่ 1 แสดงค่าทางสถิติของ Sample Z	4
ตารางที่1 แสดงค่า C_{pk} , C_{pkU} และ C_{pkL} ของ sample Z	5
2. Freshness	
รูปที่1 แสดงผลกระทบของวิธีการหาค่าของ TVB-N ในปลา Atlantic cod (<i>Gadus morhua</i>) แช่เย็น	7
ตารางที่1 แสดงค่าของดัชนีบอกความสดของวัตถุดิบA ที่ทำการวัดใน 7 วัน	9
ตารางที่2 แสดงระดับคะแนนทางประสาทสัมผัส	9
3. Rapid Visco-analyzer condition	
รูปที่1 กราฟการเกิดเจลของเมล็ดแป้ง	11
รูปที่2 แสดง Pasting curve ของแป้ง	12
รูปที่3 Comparing between standard 1 and pocket UBA profile	13
รูปที่4 Pasting curve ของ Meal RBC	13
รูปที่5 Pasting curve ของ Wheat flour	14
รูปที่6 Pasting curve ของ China maize gluten	14
ตารางที่ 1 แสดงผลการวิเคราะห์ที่ได้จาก RVA	15
ตารางที่2 แสดงปริมาณตัวอย่างที่ใช้โดยสรุปจากการทดลอง	16

บทนำ

1. รายละเอียดเกี่ยวกับบริษัท

บริษัท เอฟเฟมฟูดส์ ประเทศไทย เป็นบริษัทในเครือของ Mars โรงงานตั้งอยู่ ณ เลขที่ 799 หมู่ 4 ต.จันทึก อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130 ซึ่งผลิตอาหารสุนัขและอาหารแมวภายใต้ชื่อ

- Pedigree
- Whiskas
- Chappi
- Kitekat
- Pure performance
- Advance

หลักห้าประการของมาร์ส

คุณภาพ	ผู้บริโภคนายของเรา คุณภาพคืองานของเรา และความคุ้มค่าเงินคือเป้าหมายของเรา
ความรับผิดชอบ	ส่วนบุคคล เรารับผิดชอบต่อตนเอง ส่วนรวม เราสนับสนุนผู้อื่นด้วยความรับผิดชอบ
ผลประโยชน์ร่วมกัน	การแบ่งปันผลประโยชน์ร่วมกันจะสร้างความสัมพันธ์อันมั่นคง
ประสิทธิภาพ	เราให้ทรัพยากรอย่างเต็มที่ในสิ่งที่เป็นประโยชน์โดยไม่มีการสูญเสีย และทำในสิ่งที่เราทำได้ดีที่สุดเท่านั้น
ความอิสระ	เราจำเป็นต้องมีความอิสระเพื่อกำหนดอนาคตของเรา และเราจำเป็นต้องมีผลกำไรเพื่อคงความอิสระนั้นไว้

2. วัตถุประสงค์

- เพื่อการปฏิบัติงานจริงในบริษัทที่เกี่ยวข้องกับสาขาที่เรียนมา
- เพื่อประยุกต์ใช้ในเรื่องที่เรียนให้เข้ากับการทำงานจริง
- เพื่อเรียนรู้การทำงานร่วมกับผู้อื่นและการแก้ไขเฉพาะหน้า

รายละเอียดของโครงการที่ปฏิบัติ (Project)

โครงการที่ปฏิบัติ นั้น มี 3 โครงการด้วยกัน คือ

1. MCL(Manufacturing control limit) Review Line2
2. Freshness (review)
3. RVA(Rapid visco-analyzer) condition for material

ซึ่งจะนำเสนอต่อไปนี้



Manufacturing control limit

Line 2

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาและเป็นแนวทางการปรับปรุงประสิทธิภาพในกระบวนการผลิต

บทนำ

การจัดเก็บข้อมูลเพื่อทำฮิสโตแกรม(Histograms)ทำให้เราสามารถทราบความผันแปรของข้อมูล ที่เกิดขึ้นในกระบวนการผลิตจริงซึ่งอาจเกิดจากปัจจัยต่างๆ อาทิ เช่น คน เครื่องจักร วิธีการทำงาน สภาพแวดล้อมในการทำงาน และเรายังสามารถทำการประมาณค่าต่างๆ เช่น ค่าเบี่ยงเบน (standard deviation) ค่าเฉลี่ย (mean) จากข้อมูลทำการเก็บรวบรวม เพื่อนำไปคำนวณหาค่าสมรรถนะของ กระบวนการผลิต(process capability)

ในการเก็บข้อมูลเพื่อทำหน้าที่ควบคุมลักษณะกระบวนการผลิตนั้น ต้องเลือกตัวแปรที่เหมาะสมที่สามารถบ่งลักษณะจำเพาะเพื่อใช้ควบคุม ซึ่งควรพิจารณา ดังนี้

- เป็นลักษณะเฉพาะ สะท้อนให้เห็นถึงสถานะของกระบวนการผลิต
- มีผลกระทบจากปัจจัยภายนอกต่อตัวแปรน้อยที่สุด หรือไม่มีเลย
- การตรวจวัดนั้นต้องทำได้ทันที
- ควรจะมีค่าใช้จ่ายต่ำ

ขั้นตอนและวิธีการศึกษา

ทำการเก็บรวบรวมข้อมูลการผลิตที่ต้องการ ศึกษาจาก conformance sheet ตั้งแต่เดือนมกราคม 2544 - เดือนมกราคม 2545 แล้วนำมาคำนวณหาค่าเฉลี่ย (mean) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน(standard deviation) เพื่อนำค่าทั้งสองที่ได้มาคำนวณหา Process capability

ค่า C_p , $C_{p_{ku}}$, $C_{p_{kl}}$ คำนวณได้จากสูตร ดังนี้

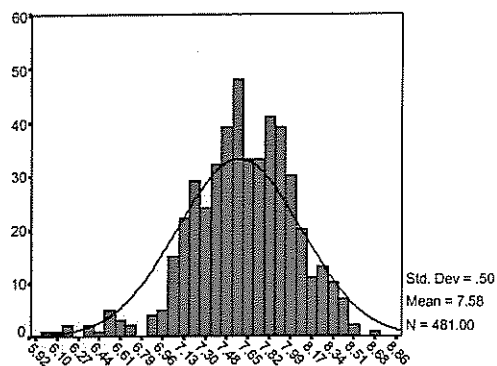
$$C_p = \frac{UCL - LCL}{6 (\sigma)}$$

$$C_{p_{ku}} = \frac{UCL - \bar{X}}{3 (\sigma)}$$

$$C_{p_{kl}} = \frac{\bar{X} - LCL}{3 (\sigma)}$$

MC out cooler

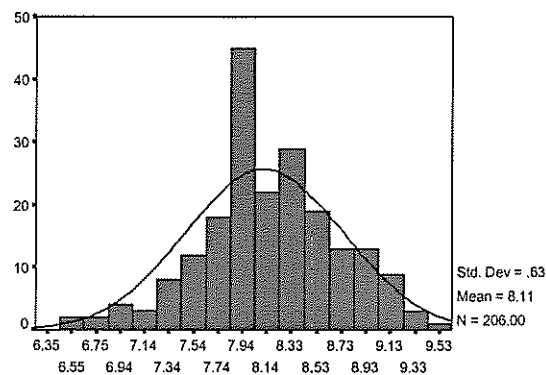
Sample Z



(A)

MC out coater

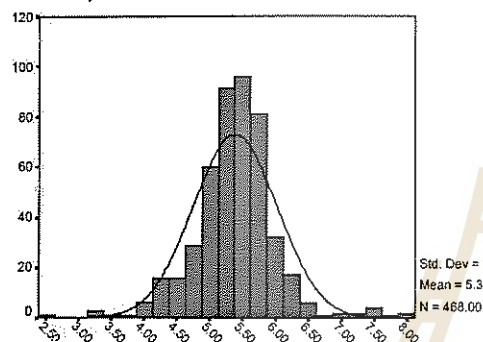
Sample Z



(B)

MC out dryer

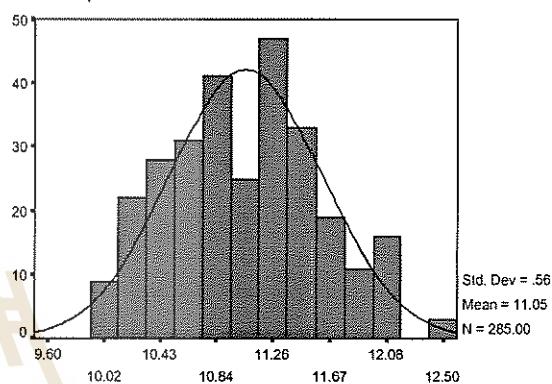
Sample Z



(C)

Size A

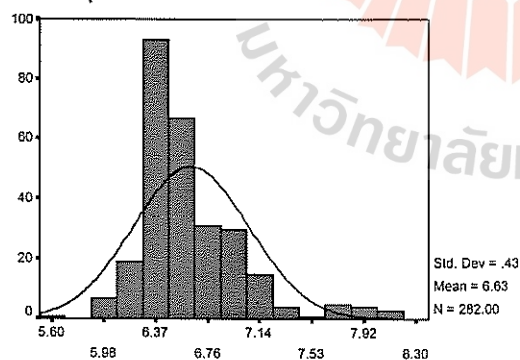
Sample Z



(D)

Size C

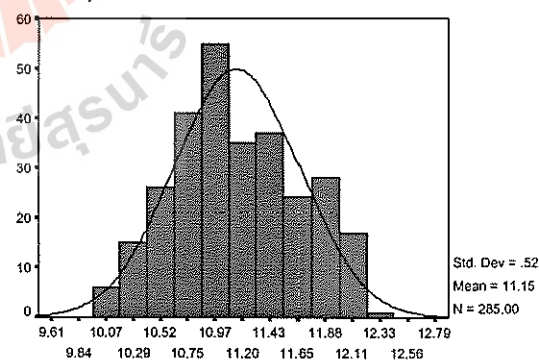
Sample Z



(E)

Size B

Sample Z



(F)

รูปที่ 1 แสดงค่าทางสถิติของ Sample Z

(A) Moisture after cooler

(B) Moisture after coater

(C) Moisture after dryer

(D) Size A

(E) Size B

(F) Size C

ผลการทดลอง

ตารางที่1 แสดงค่า C_{pk} , C_{pku} และ C_{pkl} ของ sample Z

	mean	SD	Target	UCL	LCL	CP	Cpku	Cpkl
MC out dryer	5.38	0.64	5.50	6.00	5.00	0.26	0.32	0.20
MC out cooler	7.58	0.50	7.50	8.50	6.50	0.67	0.61	0.72
MC out coater	8.11	0.63	7.50	8.50	6.50	0.53	0.21	0.85
Size A	11.05	0.56	11.30	12.30	10.00	0.68	0.74	0.63
Size B	11.15	0.52	11.60	12.60	10.00	0.83	0.93	0.74
Size C	6.63	0.43	7.30	8.30	6.30	0.78	1.29	0.26

สรุป

จะเห็นได้ว่า ฮีสโตแกรมแสดงข้อมูลกับขอบเขตสเปกสามารถคาดคะเน ค่าของ C_p , C_{pkl} , C_{pku} ได้ โดยที่กราฟเบี่ยงทางด้านใดค่า C_{pk} ที่ทางด้านนั้นจะต่ำ ค่า C_p ที่ต่ำแสดงถึงกระบวนการผลิตไม่เป็นไปตามที่ต้องการ แต่สามารถแก้ไขได้โดยอาจปรับปรุงกระบวนการผลิตใหม่โดยทำให้มีค่าที่แปรปรวนน้อยลง หรือปรับเปลี่ยน spec ของผลิตภัณฑ์ใหม่ ซึ่งการแก้ไขนั้น ขึ้นอยู่กับสาเหตุ และจากค่า C_{pkl} จะเห็นว่าค่าเฉลี่ยที่ได้จะเท่าๆกัน ยกเว้นค่าเฉลี่ย C_{pkl} ของความชื้นหลังออกจาก dryer ที่จะมีค่าต่ำมาก แต่กรณีนี้เราจะเห็นได้ว่าผลกระทบที่จะมีต่อกระบวนการผลิตจะมีน้อย เพราะในกระบวนการผลิตยังมีขั้นตอนต่อไปที่ทำให้ความชื้นเพิ่มขึ้น ดังนั้นในผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้ก็จะมีค่าอยู่ในขอบเขตที่สเปกกำหนด โดยทั่วไปแล้วนั้นค่า C_p จะบอกถึงกระบวนการผลิตดังนี้ ค่า C_p มากกว่า 1.33 แสดงว่ากระบวนการ ผลิตนั้นยังใช้ได้ดี ค่า C_p น้อยกว่า 1.33 แต่ยังมากกว่า 1.00 กระบวนการผลิตนั้นยังจัดว่าใช้ได้ แต่ถ้า C_p น้อยกว่า 1.00 กระบวนการผลิต

Freshness

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาหลักการ เปรียบเทียบ และการนำไปใช้ของดัชนีที่สามารถบอกความสดในวัตถุดิบ

วิธีการ

ทำการเก็บรวบรวมข้อมูลของดัชนีบอกความสด แล้วเปรียบเทียบการนำไปใช้กับการทดลองในวัตถุดิบ A

บทนำ

คุณภาพเป็นสิ่งสำคัญ ที่เป็นที่ต้องการสำหรับผู้บริโภค ดังนั้นผู้ผลิตจึงจำเป็นต้องผลิตสินค้าที่มีคุณภาพตามที่ผู้บริโภคต้องการ ซึ่งต้องควบคุมตั้งแต่วัตถุดิบ กระบวนการผลิต การบรรจุตลอดถึงการขนส่ง ซึ่งในการศึกษานี้ต้องการปัจจัยที่สามารถบ่งบอกถึงคุณภาพในวัตถุดิบที่ใช้ในโรงงานในส่วนที่เป็นเนื้อสัตว์ และในปัจจัยที่สามารถบ่งบอกถึงคุณภาพในวัตถุดิบนั้นมีหลายปัจจัยด้วยกัน เช่น ความสมบูรณ์ คุณค่าทางสารอาหาร ความสด ท่าหนิ และสี เป็นต้น ในการศึกษาครั้งนี้จะทำการสนใจที่ศึกษาถึง ดัชนีบอกความสดในเนื้อสัตว์ ซึ่งค่าต่างๆที่สามารถใช้บอกความสดของเนื้อสัตว์ มีหลายชนิดและจะกล่าวถึงดังต่อไปนี้

1. Histamine

Histamine เป็นสารในกลุ่ม amine ที่เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ histidine Decarboxylase ย่อยสลายกรดอะมิโนที่ชื่อว่า histidine ซึ่งสร้างโดยแบคทีเรีย

Histamine เป็นสารพิษสำหรับผู้บริโภคทำให้เกิดการแพ้ ความรุนแรงของอาการแตกต่างกันในแต่ละบุคคล โดยมีอาการบวมแดง ขาที่ปาก จนถึงคลื่นไส้ อาเจียน ความดันต่ำ USFDA ได้ระบุว่าอาการแพ้ฮิสตามีน จะเกิดขึ้นเมื่ออยู่ในระดับที่สูงกว่า 200 ppm

วิธีการหาค่า Histamine นั้นทำได้หลายวิธี เช่น Chemical method, Biological method, Fluorometric method และ HPLC เป็นต้น

2. Hypoxanthine

เป็นค่าที่เกิดจากการย่อยสลายของ ATP ซึ่งเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ที่มีอยู่ในเนื้อสัตว์เอง Hypoxanthine จะเป็นดัชนีวัดความสดได้ดีในช่วงแรก แต่ในช่วงที่ 2 หลังจากเก็บไว้ Hypoxanthine จะถูกออกซิไดซ์เป็น xanthine และถูกออกซิไดซ์ต่อไปเป็น Uric acid ดังนั้นในช่วงหลัง Hyxanthine จึงไม่สามารถเป็นดัชนีวัดความสดที่ดีได้

ค่า Hypoxanthine มักหาโดยวิธี HPLC หรือ ทำการย่อยสลาย Hypoxanthine ให้เปลี่ยนเป็น Uric acid จากนั้นจึงวัดโดยเครื่อง spectrophotometer

3. K-value

ค่า K-value เป็นการวัดความเข้มข้นของ Hypoxanthine ซึ่งเกิดจากการย่อยสลายของ ATP (โปรตีนในภาคผนวก) โดยเป็นอัตราส่วนกับค่าการย่อยสลายทั้งหมดของ ATP ซึ่งหาได้จากสูตร

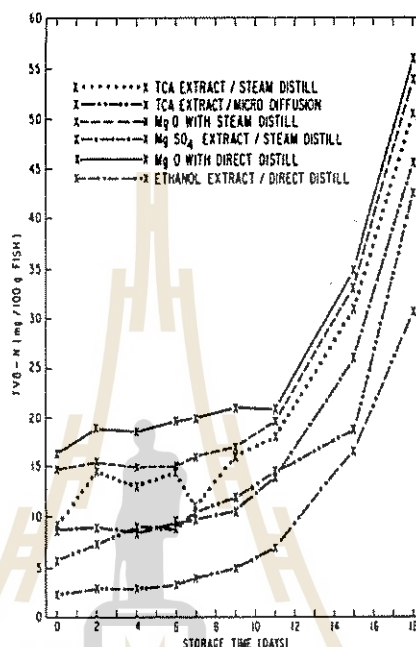
$$K\text{-value} = \frac{[\text{Inosine}] + [\text{Hypoxanthine}]}{[\text{ATP}] + [\text{ADP}] + [\text{AMP}] + [\text{IMP}] + [\text{Inosine}] + [\text{Hypoxanthine}]}$$

การหาค่า K-value นั้นสามารถหาได้โดยใช้ HPLC หรือ ELISA (Test kit)

ค่า Hypoxanthine และ K-value นั้นจะเป็นดัชนีบอกความสดได้ดีที่สัตว์เลือดเย็นมากกว่าสัตว์เลือดอุ่น และผลของค่าที่ได้ในสัตว์ต่างชนิดกันจะแตกต่างกันเนื่องจากอัตราในการสะสม ATP ต่างกัน

4. TVB-N

เป็นการวัดค่าของสารระเหยที่เกิดขึ้น (primary ammonia, dimethylamine, trimethylamine) โดยการทำให้เสื่อมเสียจากจุลินทรีย์ ซึ่งค่าของ TVB-N นี้ ไม่เป็นเส้นตรงที่สัมพันธ์กับเวลา (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 แสดงผลกระทบของวิธีการหาค่าของ TVB-N ในปลา Atlantic cod (*Gadus morhua*) แช่เย็น

ที่มา : Botta, J.R. (1995)

5. TMA

ค่า TMA เป็นการเปลี่ยนแปลงที่เกิดจากการเปลี่ยน Trimethyl amine oxide ของจุลินทรีย์ด้วยเอนไซม์ amine oxidase เป็น Trimethyl amine ทำให้เกิดกลิ่นไม่สดชื่น ซึ่งสารประกอบ Trimethyl amine oxide นี้เป็นสารที่พบในสัตว์ทะเล

TMA ไม่สามารถเป็นดัชนีวัดความสดที่ดีได้ เพราะค่า TMA ไม่เสถียรในกระบวนการให้ความร้อนและระหว่างการเก็บเยือกแข็ง และเมื่อเติมสาร preservative เข้าไปเช่น EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) จะทำให้เกิดผลเช่นเดียวกัน คือ TMA ไม่สามารถเป็นดัชนีบอกความสดที่ไม่ดี เพราะ preservative จะไปยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่สร้าง amine oxidase

TMA จะเป็นตัวบ่งชี้คุณภาพของความสดได้เมื่อผ่านการเก็บปลาในน้ำแข็งประมาณ 6 วัน ส่วน TVB-N จะเป็นตัวบ่งชี้คุณภาพของความสดได้เมื่อผ่านการเก็บปลาในน้ำแข็งประมาณ 10 วัน

การหาค่าของ TMA นั้น หาโดยวิธี Gas chromatography หรือโดย spectrophotometer

6. Appearance

ลักษณะปรากฏเป็นวิธีที่ดีวิธีหนึ่งที่สามารถใช้เป็นดัชนีบอกความสดได้ โดยการดูจากสี กลิ่น และรสชาติ ซึ่งถ้าเป็นตัวอย่างที่ทดสอบด้านรสชาติแล้วเสี่ยงที่จะเกิดผลกระทบต่อร่างกายมักจะไม่ทำการทดลองกัน แต่วิธีนี้เป็นวิธีที่ประหยัด รวดเร็ว และเป็นที่ยอมรับแต่ก็อาจจะมีปัญหาเกิดขึ้นในกรณีที่ลักษณะปรากฏยังเป็นที่ยอมรับแต่ค่าทางเคมีและจุลชีววิทยาไม่เป็นที่ยอมรับ

นอกจากนี้ยังมีค่าต่างๆที่สามารถบอกความสดได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดและองค์ประกอบที่มีอยู่ ซึ่งสามารถเลือกใช้ได้ตามลักษณะของตัวอย่าง วิธีอื่นๆ เช่น

1. Indole
2. Peroxide value
3. Free fatty acid
4. Thiobarbituric acid value
5. Ammonia
6. Water holding capacity



วิธีการทดลองในวัตถุดิบA

ทำการวัดอุณหภูมิของ วัตถุดิบA ที่ได้ทำการละลายไว้และเก็บตัวอย่างตรวจค่า TVB-N, Histamine: ลักษณะปรากฏและกลิ่นที่เกิดขึ้น ทุกๆวัน

ผลการทดลอง

ตารางที่1 แสดงค่าของดัชนีบอกความสดของวัตถุดิบA ที่ทำการวัดใน 7 วัน

Day	TVB-N (mg/100g)	Histamine (ppm)	Appearance	smell
0	18.5	< 5	5	5
1	15.1	< 5	5	5
2	12.3	5.71	4	5
3	16.7	25.7	4	5
4	12.5	12.6	3	4
5	weekend			
6	weekend			
7	14.3	17.6	3	2

ตารางที่2 แสดงระดับคะแนนทางประสาทสัมผัส

Score	Description	
	Appearance	smell
1	Green or brown and swollen	Unacceptable smell
2	Slight green or brown and start to swollen	The sample has off odour/just acceptable
3	Slight grey and don't have ice	Start to get off odour but still acceptable
4	Dark grey and don't have ice	Faint off odour
5	Dark grey and still have ice	Fresh fishy smell/suitable use

สรุปและวิจารณ์

จากการทำการทดลองหาอายุการเก็บของ Thawing วัดดูดิบA พบว่าค่าของ Histamine ในวันที่ 3 ที่ทำการทดลอง ค่า Histamine จะสูงออกจากข้อมูล ซึ่งโดยทั่วไปการวิเคราะห์ค่า Histamine จะทำการวิเคราะห์ การเปลี่ยนแปลง ในส่วนที่เป็นเนื้อ ในตัวอย่างจะเป็นส่วนประกอบที่เป็นเนื้อติดอยู่น้อย ซึ่งการสุ่มตัวอย่างที่ส่วนต่างๆกันก็จะทำให้ค่าที่ได้ต่างกัน แต่จะเห็นได้ว่าแนวโน้มของค่า Histamine จะเพิ่มขึ้น ส่วนค่าของ TVB-N นั้น จะขึ้นๆลงๆ ดังนั้นในการทดลองจึงควรใช้ค่า Histamine มากกว่าค่า TVB-N ในการประเมินในทางเคมี เพราะแม้ว่าทฤษฎีจะได้กล่าวไว้ว่า TVB-N จะเป็นดัชนีบอกความสดได้ดี เมื่อผ่านการเก็บได้ 10 วัน แต่ในการทดลองนี้ได้ไม่ยอมรับค่าทางประสาทสัมผัสที่เกิดขึ้นเมื่อวัดดูดิบA ละลายในวันที่ 7 และควรจะใช้การประเมินทางประสาทสัมผัส(sensory) และลักษณะปรากฏควบคู่ไปด้วย เพราะบางครั้งในขณะที่ค่าทางเคมียังไม่เกินในเกณฑ์ที่ยอมรับแต่ค่าทาง ประสาทสัมผัสไม่เป็นที่ยอมรับแล้ว

ข้อเสนอแนะ

1. การทำรายงานฉบับนี้การรวบรวมข้อมูลส่วนใหญ่เป็นการทดลองในเนื้อปลาแต่ในวัดดูดิบที่จะนำมาใช้ในโรงงานนั้นจะมีเนื้อสัตว์หลายชนิด ดังนั้นควรมีการทำการทดลองหลายๆวิธีเพื่อเป็นการยืนยันความน่าเชื่อถือของค่าที่จะนำมาเป็นดัชนีความสด
2. การทดลองควรจะทำหลายๆครั้งเพื่อพิสูจน์ว่าค่าที่ได้นั้นมีความผิดพลาดมากน้อยแค่ไหน และควรวัดค่าดัชนีตัวอื่นๆด้วย



Rapid Visco-analyzer condition

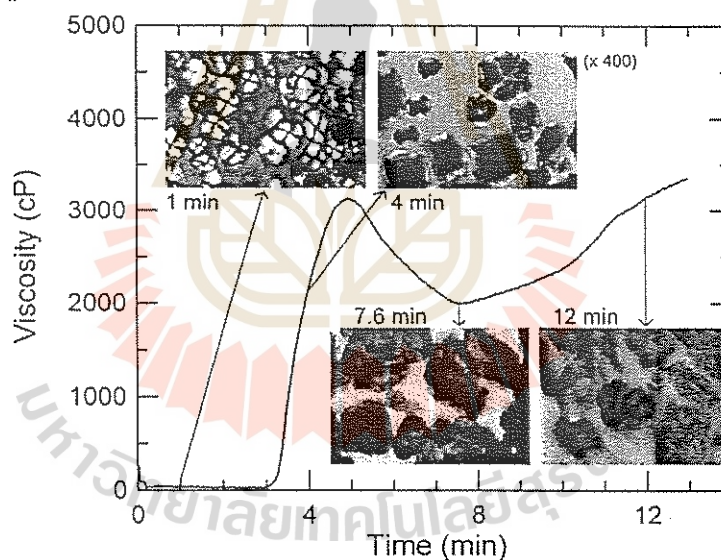
วัตถุประสงค์

เพื่อหา profile ของ Rapid Visco-analyzer ที่สามารถใช้หาสภาวะในการเกิดเจลละตินเนชัน (Gelatinization) ในวัตถุดิบและ meal of product ได้ ภายใน profile เดียวกัน

บทนำ

RVA (Rapid Visco-analyzer) เป็นเครื่องมือที่สามารถวิเคราะห์หาสภาวะในการเกิดเจลของเม็ดแป้ง โดยในการผลิตผลิตภัณฑ์ของ โรงงานนั้นแป้งเป็นส่วนผสมหลักที่ต้องผ่านการเอกซทราซัน ทำให้การหาสภาวะในการเกิดเจลของเม็ดแป้ง มีความสำคัญ เพราะอาจทำให้ทราบถึงว่าวัตถุดิบตัวไหน ที่มีปัญหาในกระบวนการผลิต ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาถึง condition ที่เหมาะสมสำหรับวัตถุดิบต่างๆ

การเกิดเจล(Gelatinization) เป็นปรากฏการณ์ที่เกิดเมื่อน้ำแป้งได้รับความร้อน ส่วนที่เป็นอะไมโลสจะละลายน้ำและดูดน้ำได้มาก ทำให้เกิดการพองตัวมากขึ้น โมเลกุลของแป้งจะเข้ามา ไกลกันและยึดเข้าด้วยกัน บางส่วนของอะไมโลสจะแตกออกมาอยู่ในน้ำ ทำให้ได้สารละลาย ที่ข้นหนืด ซึ่งโดยปกติเมื่อน้ำแป้งไปใส่น้ำเย็น น้ำจะสามารถซึมผ่านเข้าไปในโมเลกุลของแป้งโดยไม่ทำลายโครงสร้างของแป้งได้ ประมาณ 30 % ทำให้เกิดการพองตัวขึ้นซึ่งมองด้วยตาเปล่าไม่เห็น ซึ่งสามารถดูได้จากกราฟการเกิดเจลของเม็ดแป้ง ดังรูปที่1



รูปที่1 กราฟการเกิดเจลของเม็ดแป้ง

ปัจจัยที่มีผลต่อ Pasting curve

1. แหล่งของแป้ง

แป้งที่ได้จากเมล็ดธัญชาติ จะเกิดกราฟที่มีลักษณะ จุดยอดของความหนืดต่ำ แต่ setback สูง เมื่อเทียบกับแป้งที่ได้จากพืชหัวและwaxy cereal ที่จะมีกราฟที่มีลักษณะจุดยอดของความหนืดสูง แต่ setback ต่ำ

2. Test condition

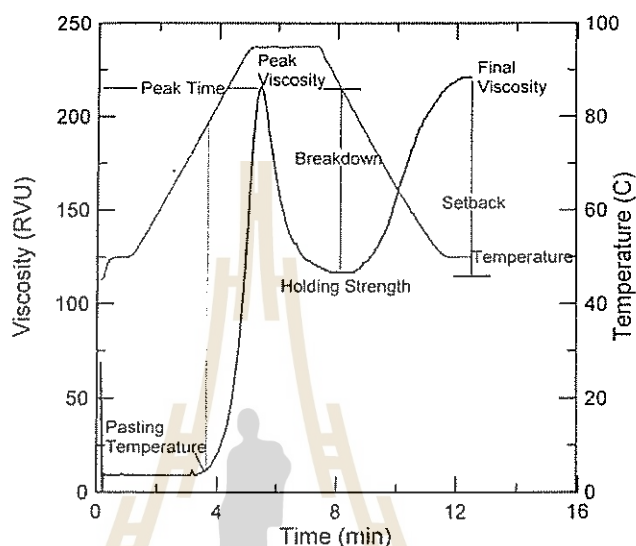
ความเข้มข้นของแป้งจะมีผลต่อความหนืดและค่าต่างๆที่ได้ อัตราการเพิ่มของอุณหภูมิจะมีผลต่อการพองตัวของเม็ดแป้งและการละลายที่ต่างกันในแต่ละชนิดกัน

3. การเตรียมตัวอย่าง

ขนาดของเม็ดแป้งที่ต่างกัน มีผลคือ เม็ดแป้งที่มีขนาดเล็กจะสามารถพองตัวได้เร็วกว่าเม็ดแป้งที่มีขนาดใหญ่ การบดตัวอย่าง เมื่อทำการบดตัวอย่างจะเกิดการเสียดสีเกิดขึ้นทำให้เกิดความร้อนจะทำให้เม็ดแป้งสูญเสียสภาพ ดังนั้นคุณสมบัติในการเกิดเจลจะต่างไปจากเดิม

4. pH และ เอนไซม์

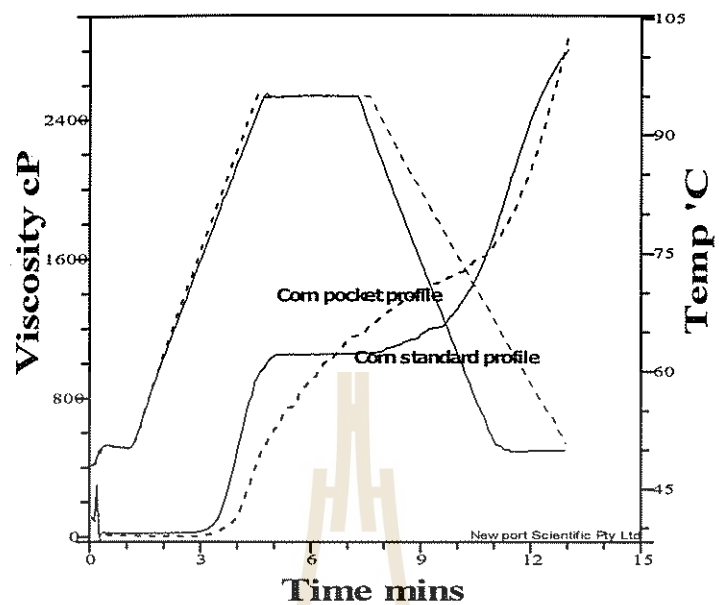
pH จะทำให้เกิดการไฮโดรไลซิสของแป้งเกิดขึ้น ทำให้ความหนืดต่ำลง เอนไซม์ก็เช่นกัน ในธรรมชาติของพืชต่างกันจะมี endogenous enzyme ต่างกัน และถ้ามีเอนไซม์ amylase จะมีผลทำให้ความหนืดต่ำลงเนื่องจากการถูกทำลายพันธะของ amylose



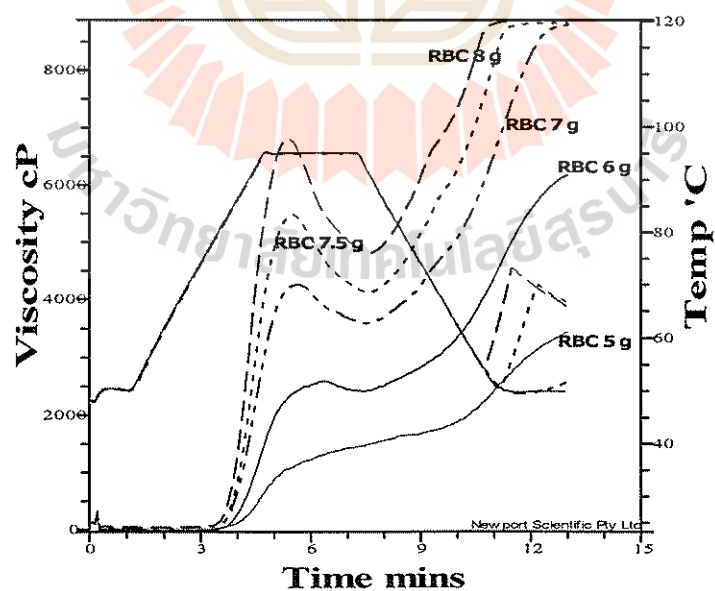
คำนิยาม

- Peak** คือจุดที่แสดงให้เห็นถึงการพองตัวของเม็ดแป้งที่สูงที่สุด ซึ่งจะเป็นจุดที่สูงที่สุดในช่วงการเพิ่มของอุณหภูมิ
- Holding strength หรือ Trough** เป็นจุดความหนืดที่ต่ำที่สุดหลังจากเกิด peak สูงสุด ในปกติ trough จะเกิดในช่วงแรกของการทำให้เย็น(cooling)
- Breakdown** เป็นค่าของ peak viscosity ลบด้วย trough viscosity
- Final viscosity** คือจุดสุดท้ายที่เกิดความหนืดของการทดลอง Final viscosity มักใช้เป็นตัวติดตามการเกิดเจลหลังจากการทำให้สุก(cooking) และทำให้เย็น(cooling) Final viscosity ควรอยู่ในช่วง 500 - 5,000 cP
- Setback** โดยทั่วไป setback เป็นค่าที่ได้จาก final viscosity ลบด้วย trough viscosity แต่อาจเป็นค่าที่ได้จาก final viscosity ลบด้วย peak viscosity แต่ในการทำการทดลองจะใช้ค่า Setback ที่กล่าวข้อแรก ค่า Setback สามารถบอกถึงลักษณะของเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์

ผลการทดลอง

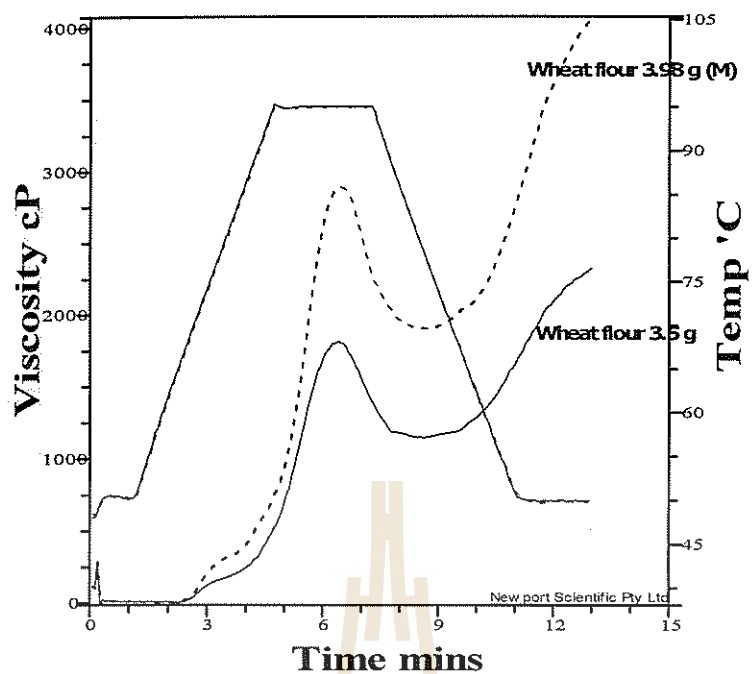
Graphical Analysis Results - 20020401

รูปที่ 3 Comparing between standard 1 and pocket UBA profile

Graphical Analysis Results - 20020401

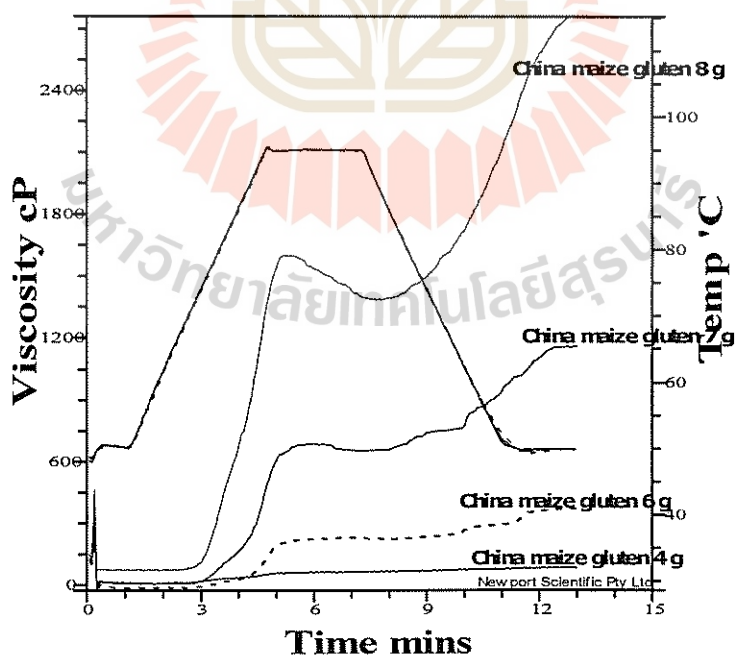
รูปที่ 4 Pasting curve ของ Meal RBC

Graphical Analysis Results - 20020401



รูปที่ 5 Pasting curve ของ Wheat flour

Graphical Analysis Results - 20020401



รูปที่ 6 Pasting curve ของ China maize gluten

ตารางที่ 1 แสดงผลการวิเคราะห์ที่ได้จาก RVA

	Peak 1	Trough 1	Breakdown	Final Visc	Setback	Peak Time	Pasting Temp
corn std	1057	1052	5	2802	1750	6.93	78.2
corn PK	1144	921	223	2882	1961	7	87.6
Meal B 5g	1199	1056	143	2583	1527	7	85.5
Meal B 5g	540	469	71	1225	756	7	90.4
Meal B 7g	2035	1872	163	4516	2644	7	82.2
Meal B 8 g	3169	2861	308	6940	4079	6.27	81.6
RBC_5g	1423	1238	185	3437	2199	7	84.05
RBC_6g	2588	2415	173	6186	3771	6.4	81.55
RBC_7g	4265	3602	663	8801	5199	5.6	79.95
RBC_7.5g	5479	4131	1348	8832	4701	5.47	79.15
RBC_8g	6806	4814	1992	8872	4058	5.4	79
Meal A_5g	463	439	24	915	476	6.87	91.05
Meal A_6g	914	900	14	1746	846	5.93	84.85
Meal A_7g	1568	1366	202	2880	1514	5.6	82.3
Meal A_8g	2619	1971	648	4467	2496	5.47	81.6
Broken rice 3 g	3035	1958	1077	3150	1192	5.87	84
Broken rice 3.5 g	5422	2960	2462	4340	1380	5.53	78.3
Broken rice 3.91 g (M)	6476	3025	3451	4850	1825	5.53	75.95
Broken rice 4 g	6967	3197	3770	5127	1930	5.53	74.25
maize gluten(us) 4 g	19	14	5	21	7	5.4	Err
maize gluten(us) 8 g	250	210	40	462	252	6.93	Err
maize gluten(us) 10 g	1321	1223	98	2575	1352	7	84.7
china maize gluten_4g	66	60	6	83	23	6.4	Err
china maize gluten_6g	235	225	10	374	149	6.73	92.8
china maize gluten_8g	1600	1385	215	2763	1378	5.2	74.25
china maize gluten_7g	689	652	37	1158	506	6	87.15
wheat flour 3.5 g	1815	1147	668	2327	1180	6.4	70.3
soy bean 4g	61	56	5	86	30	6.67	Err
soy bean_6g	784	669	115	1641	972	7	86.45
soy bean_7g	2012	1722	290	4834	3112	7	65.2
soy bean_8g	4672	3831	841	4903	1072	6.6	50.15
corn sr 5 g	3006	2475	531	7674	5199	5.33	77.45
corn sr 4.5 g	2077	1891	186	6295	4404	5.27	78.2
corn sr 4g	1036	855	181	3407	2552	7	87.3
corn sr 2.5g	156	122	34	410	288	7	Err
corn sr 4.7 g	2473	1959	514	6716	4757	5.53	76.8
corn sr 4.8 g	2643	2071	572	7060	4989	5.4	76.8
corn sangraung 4 g	1036	855	181	3407	2552	7	87.3
corn sirichai 4 g	1425	1375	50	4095	2720	6.8	81.4
corn trongphanit 4 g	1299	1178	121	4157	2979	7	84.05
corn kornkaew 4 g	1057	1052	5	2802	1750	6.93	78.2
FG wheat 6 g	983	85	898	153	68	3.27	66.85
FG wheat 8 g	2217	197	2020	375	178	3.47	65.3
FG wheat 10g	5523	539	4984	768	229	3.73	65.35
GPI wheat_12/12/01_4 g	1533	653	880	1485	832	5	67.75
GPI wheat_8/12/01_4 g	1705	881	824	2028	1147	5.2	67.75
Rice UBA_8/11/01_4 g	2387	1708	679	3104	1396	6.07	87.8
Rice UBA_27/11/02_4 g	2719	1813	906	3296	1483	6.07	83.85

วิจารณ์ผลการทดลอง

จะเห็นได้ว่าถ้าใช้ profile ของ pocket UBA จะไม่สามารถหา peak และ trough ของข้าวโพดได้ แต่เมื่อเปลี่ยนมาใช้ standard 1 ทำให้กราฟการเกิดเจลของข้าวโพดเป็นกราฟปกติของ การเกิดเจลของแป้ง จึงทำการศึกษาต่อโดยเปลี่ยนปริมาณน้ำหนักของตัวอย่างโดยจะเห็นว่าเมื่อเปลี่ยน น้ำหนักของRBCไปปริมาณหนึ่งก็จะทำให้กราฟพอลิเมอร์ไม่สามารถควบคุมได้ ถึงแม้ว่ากราฟที่ได้จะเป็นกราฟ ของการเกิดเจลของแป้ง ดังนั้นในการเลือกกราฟที่ได้จึงควรพิจารณาจากหลายๆลักษณะที่เกิดขึ้น และเมื่อ ทำการทดลองโดยใช้ปริมาณน้ำหนักที่ทำการคำนวณความชื้นก่อน (วัดความชื้นโดยใช้ moisture balance) พบว่าค่าที่ได้ต่างกันไม่มาก และในกระบวนการจริงนั้นต้องการความรวดเร็วดังนั้นการเลือกนั้นควรดูลักษณะ ของตัวอย่างที่ใช้ว่ามีความผิดปกติเช่น ความชื้นมากแปลกไปจากเดิมหรือไม่และควรทำการเก็บข้อมูล ความชื้นควบคู่ไปด้วย

สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดลอง พบว่า profile ที่เหมาะสม คือ standard 1 ส่วน analysis data นั้นก็ใช้ standard 1 แต่ขึ้นอยู่กับว่าถ้ากราฟที่ได้ออกมาไม่สอดคล้องกับช่วงเวลาที่ตั้ง description ไว้จึงควร ขยับช่วงเวลาใหม่ การหาการเกิดเจลในตัวอย่าง soy bean meal และ wheat gluten นั้นไม่จำเป็นต้องหา เพราะจะเห็นได้ว่าถึงแม้จะเพิ่มปริมาณตัวอย่างแล้วก็ไม่ทำให้เกิดกราฟของการเกิดเจลขึ้น ทำให้ เมื่อเพิ่มตัวอย่างไปในระดับหนึ่งก็จะทำให้น้ำไม่เพียงพอที่จะละลายแป้ง เพราะองค์ประกอบอื่นสามารถ ดูดซับน้ำเข้าไปได้ ปริมาณของตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์สรุปได้ดังตารางต่อไปนี้

ตารางที่2 แสดงปริมาณตัวอย่างที่ใช้โดยสรุปจากการทดลอง

ตัวอย่าง	ปริมาณน้ำหนักที่ใช้/น้ำ 25 กรัม
Corn	5
Broken rice	3
Maize gluten(US)	10
China maize gluten	8
Wheat flour	3.5
Meal A	7
Meal B	8
Meal RBC	6

ข้อเสนอแนะ

- 1.ในกรณีที่วัตถุดิบจากผู้ขาย (supplier) ต่างกันควรจะทำการศึกษาแยกกัน เช่น ข้าวเพราะต่างเจ้ากันก็อาจจะเป็นข้าวต่างพันธุ์กัน
- 2.ในกรณีที่เป็น meal ของตัวอย่างก่อนผ่านเอกซเรย์ ควรนำไปร่อนผ่านตะแกรงร่อนขนาด 0.5 มิลลิเมตร ก่อน ส่วนวัตถุดิบนั้นควรทำการบดผ่าน screen 0.5 มิลลิเมตร
3. ไม่ควรผสมน้ำกับตัวอย่างก่อนการทดลองนานกว่า 1 นาที ถ้าพร้อมที่จะทำการเดินเครื่องแล้ว จึงค่อยผสมกัน เพราะในน้ำเย็นนั้นเม็ดแป้งจะสามารถดูดน้ำได้ปริมาณหนึ่ง ซึ่งจะส่งผลทำให้ค่าที่ได้ คลาดเคลื่อน

สรุปผลการปฏิบัติงาน

จากการปฏิบัติงานในแผนกวิจัยและพัฒนา ณ บริษัท เอฟเพิมฟู๊ดส์ ประเทศไทย นั้น ส่งผลให้เกิดประโยชน์ในหลายด้านดังนี้

1. ด้านสังคม

- ได้เรียนรู้ถึงการปรับตัวและทำงานร่วมกับผู้อื่น
- ได้เรียนรู้ถึงการงานจริงและการแก้ปัญหา
- ได้แลกเปลี่ยนความคิดเห็นร่วมกับผู้อื่น

2. ด้านปฏิบัติ

- ได้เรียนรู้และใช้เครื่องRapid visco-analyzer
- ได้เรียนรู้และทำการสุ่มตัวอย่างวัตถุดิบจริงจาก supplier
- ได้เรียนรู้ถึงการติดต่อและจัดการร่วมกับบริษัทอื่น เช่น Lab จากภายนอก
- ได้เรียนรู้ทั้งงานด้านเอกสารและงานในกระบวนการผลิต

3. ด้านทฤษฎี

- ได้ศึกษาค้นหาความรู้เพิ่มเติมในเรื่องที่ไม่เคยศึกษามาก่อน
- และพยายามใช้ความรู้ที่เคยเรียนมาแก้ปัญหาที่เกิดขึ้นการทำงาน



ปัญหาและข้อเสนอแนะ

จากการออกปฏิบัติงานโครงการสหกิจศึกษา ณ บริษัทเอฟเอ็มฟู๊ดส์ ประเทศไทย นั้นเป็นการออกปฏิบัติงานจริงครั้งแรก การทำงานครั้งนี้ซึ่งเป็นการนำความรู้ที่เรียนในห้องเรียนไปใช้จริงจึงทำให้ประสบกับปัญหาและอุปสรรคบ้างบางประการ ซึ่งปัญหาและอุปสรรคที่พบมีดังนี้

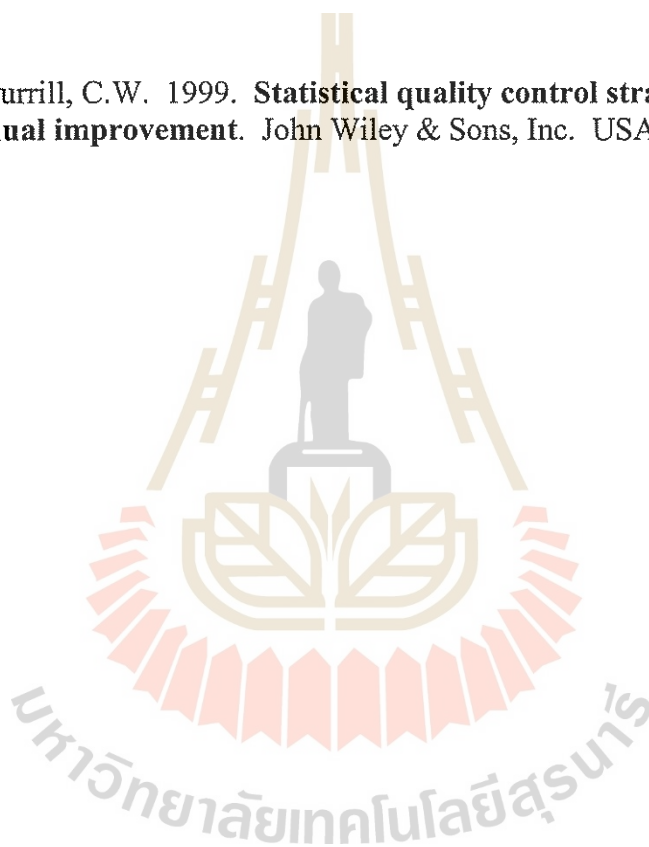
- 1.ได้รับความร่วมมือจากผู้ที่เกี่ยวข้องน้อย ซึ่งเป็นเพียงในระยะเริ่มต้นเท่านั้น
- 2.ในการปฏิบัติงานในการใช้เครื่องมือ เช่น Rapid visco-analyzer ซึ่งไม่เคยใช้มาก่อนนั้นทำให้ต้องเสียเวลาในการศึกษาจากคู่มือและสอบถามจากผู้รู้
- 3.เนื่องจากเป็นการปฏิบัติงานจริงเป็นครั้งแรกจึงทำให้เกิดการจัดการที่ไม่ดี จึงส่งผลกระทบต่อการทำงานในแต่ละวันเล็กน้อย

ซึ่งเมื่อเวลาประสบปัญหานั้นควรทำการปรึกษา Supervisor ทำให้ได้รับคำแนะนำและช่วยเหลือ จึงทำให้ปัญหาที่เกิดขึ้นนั้นสามารถผ่านไปได้ และทำงานได้สำเร็จอย่างลุล่วง



บรรณานุกรม

- ณรงค์ นิยมวิทย์. 2538. องค์ประกอบและการเปลี่ยนแปลงทางเคมีการภาพของอาหาร. บริษัท
ฟอแมทพริ้นติ้ง จำกัด. กรุงเทพฯ.
- เสรี ยูนิพันธ์, จรุง มหิตาพองกุล และ ดำรงค์ ทวีแสงสกุลไทย. 2538. เทคนิคการควบคุมคุณภาพ.
ภาควิชาวิศวกรรมอุตสาหการ คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ฮิโตชิ คูเมะ. 2543. วิธีทางสถิติเพื่อการพัฒนาคุณภาพ. สำนักพิมพ์ ส.ส.ท. กรุงเทพฯ.
- Botta, J.R. 1995. **Evaluation of seafood freshness quality.** VCH Publishers, Inc. USA.
- Ledolter, J. and Burrill, C.W. 1999. **Statistical quality control strategies and tools for continual improvement.** John Wiley & Sons, Inc. USA.





ภาคผนวก ก

Total volatile basic nitrogen (TVB-N)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. blender
2. Kjeldahl distillation apparatus
3. flask
4. MgO
5. anti-forming agent
6. 4 % boric acid
7. 0.1 N HCl
8. Methylred indicator

ขั้นตอนและวิธีการ

1. เตรียมตัวอย่างโดยการบดตัวอย่างให้เป็นเนื้อเดียวกันมากที่สุด และควรใช้ตัวอย่างภายใน 4 ชั่วโมง หลังจากเตรียมตัวอย่าง
2. ชั่งตัวอย่าง 10.0 ± 0.1 กรัม ลงใน distillation tube จากนั้นนำไปกลั่นด้วยเครื่อง Kjeldahl distillation (ซึ่งในกระบวนการนี้จะอัตโนมัติ) หลังจากเครื่องทำการเติมน้ำ 50 มล. แล้ว ให้ทำการเติม MgO 1 กรัมและ anti-forming agent 3 มล. ลงไป จากนั้นปล่อยให้เครื่องทำการกลั่นโดยให้กลั่นลงใน flask ที่บรรจุด้วย 4 % boric acid อยู่ 25 มล. จากนั้นนำไปไทเทรตด้วย 0.1 N HCl ที่ทำการ standardization ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนแล้ว

การคำนวณ

$$\text{mg TVB-N/100g} = \frac{(\text{T-B})\text{ml} \times 14.007 \times \text{N} \times 100}{\text{weight of sample (g)}}$$

T = sample titration (ml)

B = blank titration (ml)

N = normality of titrant

นิตยภัตควบคุมตรวจสอบสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์ สุนทรสาคร

องค์ควบคุมตรวจสอบผลิตภัณฑ์และการแปรรูปสัตว์น้ำ กรมประมง

องค์ปฏิบัติการเคมี

วิธีการวิเคราะห์ทางเคมี

หมายเลขเอกสาร : 1

บทที่ : 6 - TVB-N

หน้า : 1/3

เมื่อออกเอกสาร : 1 มกราคม 2544

ผู้ที่ออกเอกสาร : หัวหน้าฝ่ายเคมี

บทที่ 6

Total Volatile Basic Nitrogen (TVB-N)

วิธีเคมี

สารละลายกรดบอริกเข้มข้น 1% ที่ผสม indicator แล้ว

ละลาย boric acid 5 กรัม ด้วย ethanol 100 ml เติมนixed indicator solution 5 ml เทลงใน volumetric flask 500 ml ปรับปริมาตรด้วย DW.

Mixed indicator solution

ละลาย bromocresol green 0.005 กรัม ผสมกับ methyl red 0.01 กรัม ใน ethanol 5 ml

Hydrochloric acid เข้มข้นประมาณ 0.02 N (หาความเข้มข้นที่แน่นอนอีกครั้ง)

ป้อน conc HCl 1.7 ml เจือจางด้วย DW. และปรับปริมาตรจนครบ 1000 ml นำไป standardize กับ NaOH ตามความเข้มข้นแน่นอนโดยใช้ฟีนอล์ฟทาเลอินเข้มข้น 1% จำนวน 10 หยดเป็นอินดิเคเตอร์

หมายเหตุ การหาความเข้มข้นที่แน่นอนของ NaOH

อบ Potassium hydrogen phthalate ที่ 105 °C ประมาณ 3 ชม. นำมาใส่ไว้ในเคซิเคเตอร์จนเท่าอุณหภูมิห้อง (ประมาณครึ่งชม.) นำไปชั่งให้ทราบน้ำหนักแน่นอนในขวดรูปชมพู่โดยใช้เครื่องชั่ง 4 คน. (ปริมาณที่ชั่งขึ้นกับ ปริมาณเข้มข้นของ NaOH ที่นำมา standardize) เติมน DW. ที่ต้มไล่ CO₂ และทำให้เย็นแล้วลงไป 50 ml เขย่าเบาๆ ให้ potassium hydrogen phthalate ละลายหมด เติมนฟีนอล์ฟทาเลอินเข้มข้น 1% จำนวน 10 หยด เพื่อใช้เป็นอินดิเคเตอร์ ป้อนไตเตรตกับ NaOH ที่อยู่ในบิวเรต (ควรทำ 3 ซ้ำ)

สารละลาย potassium carbonate (K₂CO₃) อิมตัว

ละลาย K₂CO₃ 60 กรัม ใน DW. 40 ml นำไปต้มไฟอ่อนๆ ประมาณ 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น จะเกิดผลึกของ O₂ กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1

Trichloroacetic acid เข้มข้น 4%

ละลาย TCA 40 กรัม ใน DW. 960 ml

วาสลิน

นัยควบคุมตรวจสอบสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์ สมุทรสาคร

องค์ควบคุมตรวจสอบผลิตภัณฑ์และการแปรรูปสัตว์น้ำ กรมประมง

วงปฏิบัติการเคมี

การวิเคราะห์ทางเคมี

หมายเลขเอกสาร : 1

บทที่ : 6 - TVB-N

หน้า : 2/3

ที่ออกเอกสาร : 1 มกราคม 2544

ผู้ที่ออกเอกสาร : หัวหน้าฝ่ายเคมี

เครื่องมือและอุปกรณ์

Conway's unit

Micro-burette ขนาด 2 ml

Oven

Volumetric flask 10 ml และ 1000 ml

Pipette 1 ml และ 10 ml

Mortar และ pestle (กรรกและสากที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ)

Centrifuge

Centrifuge tube

กระดาษ Whatman เบอร์ 1

เตรียมตัวอย่าง

บดตัวอย่างด้วย mortar และ pestle โดยวาง mortar ไว้ในน้ำแข็งเพื่อให้ตัวอย่างคงสภาพความสดเท่าเดิม

ชั่งตัวอย่างที่บดแล้ว 5 กรัม ใส่ลงในขวดแก้วขนาด 50 ml

เติม 4% TCA 20 ml ใช้แท่งแก้วคนให้ขบ.กระจายทั่ว ปิดฝาขวด ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที โดยคน
ระยะ

กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ลงใน volumetric flask ขนาด 25 ml หรือ centrifuge ที่ความเร็ว
rpm 10 นาที ปรับปริมาตรด้วย 4% TCA

ถ้ายังไม่วิเคราะห์ต่อทันที ให้เก็บสารละลายขบ.ที่กรองได้ไว้ที่ -20°C โดยแช่ไว้ในหลอดฝานเกลียว (อย่า
ต้มหลอดเพราะจะทำให้หลอดแตกเมื่อสารละลายแข็งตัว)

ปริมาณ TVB-N

ท้าวาสลินที่ขบ Conway's unit ทั้งตัวและฝา

เปิดสารละลายกรบอริกเข้มข้น 1% ที่ผสม indicator แล้ว 1 ml ใส่ลงในวงในของ conway (inner ring)

เปิดสารละลายขบ.ที่กรองได้ 1 ml ใส่ลงในวงนอกของ conway (outer ring)

เปิดสารละลายอื่นตัว K_2CO_3 1 ml ใส่ลงในวงนอกของ conway ให้อยู่ตรงข้ามกับด้านที่ใส่ขบ.

แนวควบคุมตรวจสอบสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์ สมุทรสาคร
แนวควบคุมตรวจสอบผลิตภัณฑ์และการแปรรูปสัตว์น้ำ กรมประมง

งปฏิบัติการณ์
การวิเคราะห์ทางเคมี

หมายเลขเอกสาร : 1

บทที่ : 6 - TVB-N

หน้า : 3/3

ที่ออกเอกสาร : 1 มกราคม 2544

ผู้ที่ออกเอกสาร : หัวหน้าฝ่ายเคมี

ปัดผา conway ทิ้งที่ ขยับให้สารละลายคย.และ K_2CO_3 ผสมกัน ระวังอย่าให้ปนเข้าไปในวงใน (ทำคย.ละ
ไก)

ตั้งไว้ 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง

ถ้ามีค่าที่ระเหยได้เกิดขึ้น จะสังเกตเห็นว่าสารละลายกรดอริกเปลี่ยนจากสีชมพูเป็นสีเขียว นำไปไตเตรท
HCl เข้มข้นประมาณ 0.02 N ที่อยู่ใน micro-burette จนสารละลายเปลี่ยนกลับเป็นสีชมพู

ทำblank โดยใช้ 1 ml ของ 4% TCA แทนสารละลายคย.

คำนวณ

$$TVB-N (mg\%) = [14 \times N \times (V_A - V_B) \times 25 \times 100] / 5$$

$$= 7000 \times N \times (V_A - V_B)$$

$$V_A = \text{ปริมาณ HCl ที่ใช้ไตเตรทกับตัวอย่าง}$$

$$V_B = \text{ปริมาณ HCl ที่ใช้ไตเตรทกับ Blank}$$

$$N = \text{ความเข้มข้นของ HCl}$$

เข้มข้นของ HCl

$$= \text{ความเข้มข้นของ NaOH} \times \text{ปริมาณ NaOH ที่ใช้ไตเตรท} / \text{ปริมาณ HCl ที่ใช้}$$

เข้มข้นของ NaOH

$$= [\text{นน. Potassium hydrogen phthalate (g)} \times 1000] / [\text{ปริมาณ NaOH ที่ใช้ไตเตรท} \times 204.229]$$

reference

Laboratory Manual On Analysis Methods And Procedures For Fish And Products, 2nd edition, 1992 Marine
Fishes Research Department Southeast Asian Fisheries Development Center, Singapore.

AOAC Official Method 977.13
Histamine in Seafood
Fluorometric Method

First Action 1977

Final Action 1987

Caution: See Appendix B: Laboratory Safety for "Safe Handling of Alkalies" - sodium hydroxide; "Safe Handling of Acids" - phosphoric and hydrochloric acids; and "Safe Handling of Special Chemical Hazards" - methanol. Dispose of waste solvents in an appropriate manner compatible with applicable environmental rules and regulations.

Method Performance

See Tables 977.13A and B for method performance data and Table 977.13C for recovery data.

A. Principle

Sample is extracted with 75% methanol. Extract is passed through ion exchange column. *o*-Phthaldialdehyde solution is added to eluate to form fluorescent histamine derivatives. Fluorescent intensity of derivatives is measured using fluorometer and histamine is quantified using external standards.

B. Apparatus

Rinse all plastic and glass containers with HCl (1 + 3) and H₂O before use.

(a) *Chromatographic tube*.—200 × 7 (id) mm polypropylene tube fitted with small plastic stopcocks and ca 45 cm Teflon tubing. Control flow rate at >3 mL/min by adjusting height of column relative to tubing outlet. Alternatively, use 2-way valve in place of tubing.

(b) *Photofluorometer*.—Equipped with medium pressure Hg lamp with excitation at 350 nm and measuring emission at 444 nm.

(c) *Repipets*.—1 and 5 mL.

C. Reagents

(a) *Ion exchange resin*.—Bio-Rad AG 1-X8, 50 100 mesh (Bio-Rad Laboratories, 1414 Harbour, South Richmond, CA 94804) or

Dowex 1-X8, 50 100 mesh. Convert to -OH form by adding ca 15 mL 2N NaOH/g resin to beaker. Swirl mixture and let stand <30 min. Decant liquid and repeat with additional base. Thoroughly wash resin with H₂O, slurry into fluted paper, and wash again with H₂O. Prepare resin fresh weekly and store under H₂O. Place glass wool plug in base of tube, (a), and slurry in enough resin to form 8 cm bed. Maintain H₂O level above top of resin bed at all times. Do not regenerate resin in packed column; rather, use batch regeneration in beaker when necessary. Wash column with ca 10 mL H₂O before applying each extract.

(b) *Phosphoric acid*.—3.57N. Dilute 121.8 mL 85% H₃PO₄ to 1 L. For other concentration H₃PO₄, volume required for 1 L 3.57N acid = 17493/(density H₃PO₄ × % H₃PO₄). Standardize 5.00 mL by titration with 1.00N NaOH to phenolphthalein end point, and adjust concentration if necessary.

(c) *o-Phthaldialdehyde (OPT) solution*.—0.1%. Dissolve 100 mg OPT in 100 mL distilled-in-glass methanol. Store in amber bottle in refrigerator. Prepare fresh weekly.

(d) *Histamine standard solutions*.—Store in refrigerator. (1) *Stock solution*.—1 mg/mL as free base. Accurately weigh ca 169.1 mg histamine 2HCl (98%) into 100 mL volumetric flask, and dissolve and dilute to volume with 0.1N HCl. Prepare fresh weekly. (2) *Intermediate solution*.—10 µg/mL. Pipet 1 mL stock solution into 100 mL volumetric flask, and dilute to volume with 0.1N HCl. Prepare fresh weekly. (3) *Working solutions*.—0.5, 1.0, and 1.5 µg/5 mL. Pipet 1, 2, and 3 mL intermediate solution into separate 100 mL volumetric flasks, and dilute each to volume with 0.1N HCl. Prepare fresh daily.

(e) *Methanol*.—75%. Place 75 mL MeOH (distilled in glass) into 100 mL volumetric flask or stoppered graduated cylinder. Dilute to volume with H₂O. Swirl flask while adding H₂O.

D. Preparation of Standard Curve

Pipet duplicate 5 mL aliquots of each working standard solution into separate 50 mL glass or polypropylene Erlenmeyers. Pipet in 10 mL 0.1N HCl to each flask and mix. Pipet in 3 mL 1N NaOH and mix. Within 5 min, pipet in 1 mL OPT solution and mix immediately. After exactly 4 min, pipet in 3 mL 3.57N H₃PO₄ and mix immediately. It is important to mix thoroughly after each addition and at least once during OPT reaction. (Run 6-10 OPT reactions simultaneously by adding reagents to Erlenmeyers in set order.) Prepare blank by substituting 5 mL 0.1N HCl for histamine solution. Within

Table 977.13A Method Performance for Determination of Histamine in Tuna by Fluorometric Method
 (Based on Collaborative Study Results of the Original Method)

Sample	Histamine ^b , mg/100 g	Ave. histamine found, mg/100 g	s _r	RSD _r , %	s _R	RSD _R , %
Acceptable skipjack packed in water	1	1.4	0.643	46.9	1.009	73.6
Skipjack with 25 mg histamine added/100 sample	26	25.6	0.950	3.7	1.363	5.4
Decomposed albacore packed in water	30	31.6	2.053	6.5	3.473	11.0
Decomposed yellowfin packed in water	20	19.8	0.941	4.7	1.729	8.7
Decomposed skipjack packed in oil	120	125.6	6.432	5.1	8.807	7.0
Decomposed yellowfin packed in oil	200	198.8	4.801	2.4	10.6555	5.4

^a Blind duplicates.

^b Approximate composition.

Table 977.13B Method Performance for Determination of Histamine in Canned Tuna and Frozen Mahimahi by Fluorometric Method (Generated for Modified Method Using 75% Methanol)^a

Sample	Mean, µg/g	S _r , µg/g	s _R , µg/g	RSD _r , %	RSD _R , %	r ^b	R ^c
1	9.896	0.884	0.915	9.01	9.32	2.475	2.562
2	13.0	1.710	1.710	13.17	13.17	4.788	4.788
3	5.627	1.205	1.295	21.42	23.03	3.374	3.626
4	7.831	1.084	1.084	13.84	13.84	3.035	3.035
5	20.28	1.140	2.077	5.62	10.24	3.192	5.816
6	58.02	2.111	5.466	3.64	9.42	5.911	15.305
7	158.4	6.575	14.050	4.15	8.87	18.410	39.340

^a Based on results received from 16 laboratories.

^b $r = 2.8 \times s_r$, ^c $R = 2.8 \times s_R$.

1.5 h record fluorescence intensity (*I*) of working standard solutions with H₂O in reference cell, using excitation wavelength of 350 nm and emission wavelength of 444 nm. Plot *I* (corrected for blank) against µg histamine/5 mL aliquot.

Table 977.13C Recovery of Histamine Added to Canned Tuna (Generated for Modified Method Using 75% Methanol)^a

Laboratory ^b	Background, µg/g	Found, µg/g	Recovered, µg/g	Recovery, %
A	10.00	69.00	59.00	117.65
		66.00	56.00	111.67
B	9.85	63.30	53.45	106.58
		62.20	52.35	104.39
C	9.65	67.00	57.35	114.36
		72.40	62.75	125.12
D	8.95	55.00	46.05	91.82
		58.10	49.15	98.01
E	9.50	58.40	48.90	97.51
		55.10	45.60	90.93
F	9.65	58.10	48.45	96.61
		51.80	42.15	84.05
G	11.55	61.40	49.85	99.40
		57.80	46.25	92.22
H	9.20	54.10	44.90	89.53
		54.10	44.90	89.53
J	9.30	55.60	46.30	92.32
		56.10	46.80	93.32
K	10.25	53.00	42.75	85.24
		53.00	42.75	85.24
N	10.10	54.30	44.20	88.14
		54.30	44.20	88.14
O	10.00	59.00	49.00	97.71
		59.00	49.00	97.71
P	10.70	53.30	42.60	84.95
		53.30	42.60	98.89
Av. recovery, %				96.41

^a Added 50.15 µg histamine/g.

^b Data from Laboratories I, L, and M were excluded because results for the background or the spike were outliers.

E. Determination

Extract prepared sample with 75% methanol as in 957.07C (see 35.1.31), paragraph 1. Pass 4–5 mL H₂O through column, (a), and discard eluate. Pipet 1 mL extract onto column and add 4–5 mL H₂O.

Immediately initiate column flow into 50 mL volumetric flask containing 5.00 mL 1.00N HCl. When liquid level is ca 2 mm above resin, add ca 5 mL H₂O and let elute. Follow with H₂O in larger portions until ca 35 mL has eluted. Stop column flow, dilute to volume with H₂O, stopper, and mix. Refrigerate eluate.

“Pipet 5 mL eluate into 50 mL Erlenmeyer, and pipet in 10 mL 0.1N HCl. Proceed as in D, beginning Pipet in 3 mL 1N NaOH . . .”

If sample contains >15 mg histamine/100 g fish, pipet 1 mL sample-OPT mixture into 10 mL beaker containing exactly 2 mL blank-OPT mixture, and mix thoroughly. Read fluorescence of new solution. Dilute and mix aliquots with blank-OPT mixture as needed to obtain measurable reading. This approximation indicates proper dilution of eluate required prior to second OPT reaction needed for reliable quantitation of sample. Alternatively, use sensitivity range control of fluorometer (if instrument has one) to estimate dilution. Use these approximations to prepare appropriate dilution of aliquot of eluate with 0.1N HCl, and proceed as in D, beginning “Pipet in 3 mL 1N NaOH . . .”

Calculations

Plot of *I* (measured by meter deflection or recorder response and corrected for blank) against µg histamine/5 mL solution should be straight line passing through origin with slope = $m = [(I_s/1.5) + I_b + 2I_c]/3$.

$$\text{mg Histamine/100 g fish} = (10)(F)(I/m)(I_s)$$

$$\mu\text{g Histamine/g fish} = 10 \times (\text{mg histamine/100 g})$$

where *I_s*, *I_a*, *I_b*, and *I_c* = fluorescence from sample, 1.5, 1.0, and 0.5 µg histamine standards, respectively; and *F* = dilution factor = (mL eluate + mL 0.1N HCl)/mL eluate. *F* = 1 for undiluted eluate.

If calibration plot is not linear, use standard curve directly for quantitation. Each subdivision on abscissa should be ≤0.1 µg histamine/5 mL solution. Read all values from curve to nearest 0.05 µg histamine/5 mL solution.

$$\text{mg Histamine/100 g fish} = (10)(F)(W)$$

$$\mu\text{g Histamine/g fish} = 10 \times (\text{mg histamine/100 g})$$

where *W* = µg histamine/5 mL solution as determined from standard curve.

Reference: *JAOC* 60, 1125, 1131(1977);

J. AOAC Int. (future issue)

CAS-51-45-6 (histamine)

Revised: March 1997

AOAC Official Method 954.04
Histamine in Seafood
Biological Method
Final Action

A. Apparatus

(a) *Kymograph*.—With horizontal muscle lever arm having friction or gravity writing point.

(b) *Muscle bath*.—At least 50 mL capacity, in 37° constant temperature bath. See Figure 954.04. May be conveniently filled and emptied through 3-way stopcock; 1 tube connected to reservoir of Ringer-Locke solution through bulb or coil immersed in bath; other tube connected to vacuum through suction flask as waste receiver. Bubble air, filtered through cotton, slowly and continuously around intestine from fine capillary tube.

B. Reagents

(a) *Sodium chloride stock solution*.—180 g/L.

(b) *Potassium chloride stock solution*.—42 g/500 mL.

(c) *Sodium bicarbonate stock solution*.—15 g/500 mL.

(d) *Atropine sulfate stock solution*.—1.0 g/500 mL.

(e) *Calcium chloride stock solution*.—24 g anhydrous salt/500 mL.

(f) *Ringer-Locke solution*.—NaCl, 0.9%; KCl, 0.042%; CaCl₂, 0.024%; NaHCO₃, 0.015%; glucose, 0.1%; and atropine sulfate, 0.001%. Add H₂O to volume of ca 1800 mL and then 10 mL (e) while swirling. Add 2 g anhydrous glucose before use. Dilute to volume with H₂O. Keep solution containing glucose in refrigerator when not in use, discarding when it becomes moldy.

(g) *Histamine diphosphate standard solutions*.—0.1 mg histamine diphosphate/mL boiled H₂O. If stored in refrigerator when not in use, it will keep ≥3 months. Prepare diluted standards of 0.01 mg/mL and 0.005 mg/mL as required. If bath <50 mL is used, prepare dilutions of (g) with (f) to avoid dilution of bath when standards are added.

(h) *Guinea pig intestine*.—Use guinea pigs weighing 300–400 g. Starve pig 24 h, kill by blow on head, and remove intestine, severing at point proximal to ileocecal junction, retaining ca 12 cm for first

series of assays. Place remainder of intestine on cotton in Petri dish, just covering with solution (f). Prop lid to admit air and store in refrigerator at ca 4–7° (40–45°F). (Below 4° intestine loses its activity.) Use additional portions of intestine as required as long as material shows enough response to histamine stimulus (usually 8 days). These additional portions of intestine are not as sensitive as ileum but give uniform response with barely noticeable pendulum movements after storage.

C. Preparation of Sample

See 937.07 (see 35.1.01). Freeze ground sample for storage, if desired.

D. Assay

Weigh 10 g prepared sample into small mortar. Add enough H₂O to make smooth paste while grinding with pestle. Transfer paste with little additional H₂O to 100 mL Kohlrausch flask and add 1 mL HCl (1 + 1). Add H₂O to total volume of ca 70 mL, mix well, and heat flask ca 20 min in boiling H₂O bath. Remove from bath, cool, dilute to volume with H₂O, mix, and filter on Whatman No. 12 folded paper (or equivalent). (Extract filters slowly but only ca 5 mL need be collected for analysis.) Filtrate may be stored in refrigerator 10 days without diminished activity. Neutralize 1 mL filtrate with 2 mL 1% NaHCO₃ solution. Dilute to 10 mL with Ringer-Locke solution (without glucose).

Attach intestine to muscle lever and let stand at least 0.5 h in 50 mL Ringer-Locke solution, (f), in constant temperature bath at 37°. With fresh ileum, contractions and relaxations may be nonrhythmic for ca 2–3 h with extreme and not always uniform responses to histamine stimuli. Determinations may be performed during this period, but it is necessary to add small and increasing amounts of diluted standards to stabilize intestine response, and to check responses several times until readings are reproducible.

Add known amount of dilute standard solution, (g), to bath, record response, and remove writing lever from contact with drum. Drain inner bath, add fresh 37° solution (f) to wash chamber and intestine, remove, and refill with fresh solution. Let intestine rest 3 min. Estimate amount and dilution of neutralized fish extract that will give approximately equal response, and add to bath. Repeat recording of response, washing muscle chamber, and resting 3 min. During this interval, measure step heights with mm scale and calculate amount standard necessary to match assay step height. Alternately add extract and standard as above until exact match is obtained.

References: JAOAC 37, 568(1954); 39, 91, 609(1956).

CAS-51-45-6 (histamine)

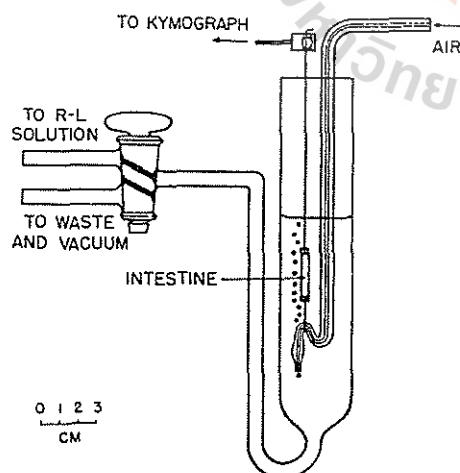


Figure 954.04—Muscle bath

35.1.31

AOAC Official Method 957.07
Histamine in Seafood
 Chemical Method
 Final Action 1968

(Use H₂O redistilled from glass for preparation of reagents and for determinations. Do not clean glassware with soap; use fresh chromic acid cleaning solution, rinsing well with tap H₂O, then 3 times with distilled H₂O, and 3 times with redistilled H₂O. Alcohol may be used to soak or rinse glassware.)

A. Reagents

- (a) *Benzene-*n*-butanol mixture*.—(3 + 2) volume/volume.
- (b) *Cotton acid succinate*.—Dissolve 5 g anhydrous NaCH₃COO, fused just before use, and 40 g succinic anhydride in 300 mL CH₃COOH in 500 mL Erlenmeyer. Immerse 10 g absorbent cotton, cut into strips, in solution; attach drying tube containing drying agent, and heat 48 h at 100°. (Flask may be immersed to neck in active steam bath.) Filter; wash well with H₂O, HCl (1 + 9), H₂O, and finally with alcohol. Dry in vacuum oven at 100°.
- (c) *Diazonium reagent*.—Dissolve 0.1 g *p*-nitroaniline, recrystallized from hot H₂O, and dilute to 100 mL with 0.1*N* HCl. Store in refrigerator. Dissolve 4 g NaNO₂ in H₂O and dilute to 100 mL. Store in refrigerator. Just before use, place 10 mL *p*-nitroaniline solution in ice bath 5 min, add 1 mL NaNO₂ solution, mix, and let stand in bath ≥5 min before use.
- (d) *Coupling buffer*.—Dissolve 7.15 g sodium metaborate (NaBO₂) and 5.7 g Na₂CO₃ in H₂O, and dilute to 100 mL. Store in polyethylene bottle.
- (e) *Barbital buffer*.—Dissolve 10 g sodium barbital in 1 L H₂O and adjust to pH 7.7 with CH₃COOH (1 + 15) (ca 25–30 mL), using pH meter. Store in refrigerator to prevent mold growth. Dissolve any precipitate by warming before use. (50–250 mL bottle of the buffer may be kept at room temperature and replenished from main supply when mold growth is apparent.)
- (f) *Histamine standard solutions*.—Dry histamine-2HCl (USP Reference Standard or material checked against Standard as in 957.07C) 2 h over H₂SO₄. Dissolve 0.1656 g dried histamine-2HCl in H₂O and dilute to 100 mL (1 mL = 1 mg histamine). Dilute 10 mL of this stock solution to 100 mL with H₂O (1 mL = 100 µg histamine). Dilute 5 mL of this dilute standard solution and 5 mL methanol to 100 mL with H₂O (1 mL = 5 µg histamine). Store in cold. Prepare fresh standards weekly.
- (g) *4-Methyl-2-pentanone (methyl isobutyl ketone)*.—Commercially purified grade (Eastman Kodak Co. No. 416 has been found satisfactory). To recover used ketone, wash once with saturated NaHCO₃ solution and 3 times with H₂O, distil, retaining fraction boiling at 115–118°, and check *A* at 475 nm.
- (h) *Benzaldehyde*.—Cl-free.
- (i) *Dilute sulfuric acid*.—0.40 ± 0.02*N*, accurately standardized.

B. Preparation of CAS Column

Prepare column by firmly placing small plug of cotton acid succinate (CAS) (ca 50 mg) in column prepared by cutting off or blowing out bottom of 15 mL centrifuge tube. Wash plug with three 15 mL portions H₂O and two 3 mL portions alcohol. Let solvents drip through CAS, syringing out column by blowing out last portion of each solvent, using 10 mL syringe with needle inserted through rubber stopper. CAS plugs may be reused for months by washing

shortly after use with H₂O and alcohol as above, and protecting from dust with inverted beaker.

C. Determination

Transfer 10 g prepared sample, 954.04C (see 35.1.30), to semimicro container of high-speed blender, add ca 50 mL methanol, and blend ca 2 min. Transfer to 100 mL glass-stoppered volumetric flask, rinsing lid and blender jar with methanol and adding rinsings to flask. Heat in H₂O bath to 60° and let stand 15 min at this temperature. Cool to 25°, dilute to volume with methanol, and filter through folded paper. Alcohol filtrate may be stored in refrigerator several weeks. (Light powdery precipitate separating on storage may be ignored.)

Dilute 5 mL filtrate to 100 mL with H₂O (disregard turbidity). Pipet 5 mL aliquot into 16 × 150 mm glass-stoppered test tube, and add 1 drop benzaldehyde (Cl-free) and 0.2 mL 20% NaOH. (pH after adding alkali should be ca 12.4–12.5.) Shake vigorously ca 25 times. Let stand 2 min and add 5 mL benzene-*n*-butanol mixture. Shake vigorously ca 25 times and let stand 5 min to separate. If emulsion forms, centrifuge.

Transfer upper layer with fine-tip tube equipped with rubber bulb to previously prepared CAS column, avoiding transfer of any aqueous phase. Re-extract aqueous solution with 5 mL benzene-butanol mixture as before, shaking, letting stand 5 min, and transferring upper layer to column. Rinse lip and sides of column with fine stream of alcohol from wash bottle, syringing out CAS. Wash column with 3 mL alcohol; syringe out; wash with two 3 mL portions H₂O, and syringe out. Discard solvents and washings.

Elute histamine from CAS into 25 mL glass-stoppered Erlenmeyer by washing down sides of tube with 2.0 mL 0.40 ± 0.02*N* H₂SO₄ (volume and concentration of acid are critical) followed by 3 mL H₂O. Syringe out after dripping ceases.

Cool eluate in ice bath, weighting flask with lead ring or clamp to prevent tipping, and let stand 5–10 min. Add 0.5 mL cooled diazonium reagent and let stand 5 min in ice bath. Add 0.50 mL coupling buffer (volume is critical; Ostwald pipet is convenient) with continuous shaking or swirling to avoid localized alkalinity (pH after addition of coupling buffer, 5–6). Let stand 5 min in ice bath. Saturated solution with ca 0.25 g powdered Na₂B₄O₇ · 10H₂O added in one portion. Shake solution immediately and continuously ca 30 s to ensure rapid and complete saturation (final pH ca 8.6). Let stand 15 min in ice bath.

Pipet in 5.0 mL methyl isobutyl ketone and shake vigorously 25 times. Immediately transfer both layers to 16 × 150 mm test tube (do not rinse) and let stand 10 min at room temperature to separate and to warm up. Transfer upper layer with fine-tip dropper to second 16 × 150 mm glass-stoppered test tube containing 5.0 mL barbital buffer. Avoid transferring aqueous and solid phases (if present) (transfer need not be quantitative). Shake vigorously ca 25 times (pH of barbital buffer after washing, ca 8.3–8.4). Let stand 10 min to separate.

Transfer upper layer with fine-tip dropper to 1 cm cell and determine *A* at 475 nm against methyl isobutyl ketone. Repeat determination on samples yielding *A* values >25 µg standard by diluting 1 mL methanol filtrate to 100 mL with H₂O. Alternatively, aqueous dilution may be diluted 1 + 4 (or more) with H₂O.

Conduct standard and blank through determination as follows: Pipet 5 mL 5 µg/mL histamine standard solution into 16 × 150 mm glass-stoppered test tube and pipet 5 mL 5% methanol into similar tube for blank. Proceed as in determination, beginning, paragraph 2, line 2,

“... add 1 drop benzaldehyde . . .”

Subtract blank A from A of standard (A') and of sample (A) and calculate histamine in sample aliquot:

$$\text{mg Histamine} = \Delta A \times 25 / \Delta A'$$

Reference: JAOAC **40**, 892(1957).

CAS-51-45-6 (histamine)



35.1.17

AOAC Official Method 971.14
Trimethylamine Nitrogen
in Seafood

Colorimetric Method

First Action 1971

Final Action 1972

(Do not use stopcock grease; mixture of sugar and glycerol ground together may be used if necessary. Do not wash tubes with soap or detergent; rinse with H₂O and occasionally clean thoroughly with HNO₃.)

A. Reagents

(a) *Trichloroacetic acid solution*.—7.5% aqueous solution. (Caution: See Appendix B, safety notes on di- and trichloroacetic and trifluoroacetic acids.)

(b) *Toluene*.—Dried over anhydrous Na₂SO₄. To remove interferences, shake 500 mL toluene with 100 mL 1N H₂SO₄, distil, and dry with anhydrous Na₂SO₄. (Caution: See Appendix B, safety notes on distillation and flammable solvents.)

(c) *Picric acid solutions*.—(1) *Stock solution*.—Dissolve 2 g picric acid (Caution: See Appendix B, safety notes on picric acid) in 100 mL H₂O-free toluene. (2) *Working solution*.—Dilute 1 mL stock solution to 100 mL with H₂O-free toluene.

(d) *Potassium carbonate solution*.—Dissolve 100 g K₂CO₃ in 100 mL H₂O.

(e) *Formaldehyde*.—20%. Shake 1 L commercial formalin (40%) with 100 g MgCO₃ until nearly colorless and filter. Dilute 100 mL to 200 mL with H₂O. (Caution: See Appendix B, safety notes on formaldehyde.)

(f) *Indicator solution*.—(1) *Methyl red-methylene blue*.—Mix 2 parts 0.2% alcoholic methyl red solution with 1 part 0.2% alcoholic methylene blue solution; or (2) *Methyl red-bromocresol green solution*.—Mix 1 part 0.2% alcoholic methyl red solution with 5 parts 0.2% alcoholic bromocresol green solution.

(g) *Trimethylamine (TMA) standard solutions*.—(1) *Stock solution*.—Add 0.682 g (CH₃)₃N·HCl to 1 mL HCl (1 + 3) and dilute to 100 mL with H₂O. Check basic N content of 5 mL aliquots by adding 6 mL 10% NaOH solution, distilling into 10 mL 4% boric acid in micro-Kjeldahl distillation apparatus, and titrating with 0.1N H₂SO₄, using indicator, (f). This solution is stable. (2) *Working solution*.—0.01 mg TMA-N/mL. Add 1 mL stock solution to 1 mL HCl (1 + 3) and dilute to 100 mL with H₂O.

B. Apparatus

(a) *Digestion rack*.—With either gas or electric heaters which will supply enough heat to 30 mL flask to cause 15 mL H₂O at 25° to come to rolling boil in ≥2 but <3 min.

(b) *Distillation apparatus*.—One-piece or Parnas-Wagner distillation apparatus recommended by Committee on Microchemical Apparatus, ACS.

(c) *Digestion flasks*.—Use 30 mL regular Kjeldahl or Soltys-type flasks [Reference: Anal. Chem. 23, 523(1951)]. For small samples, 10 mL Kjeldahl flasks may be used.

C. Preparation of Sample

Weigh 100 g minced or chopped, well-mixed sample. Add 200 mL 7.5% trichloroacetic acid and blend. Centrifuge blended solution at 2000–3000 rpm until supernate is practically clear.

D. Determination

Pipet aliquot (preferably containing 0.01–0.03 mg TMA-N) into 20 × 150 mm Pyrex glass-stoppered test tube and dilute to 4.0 mL with H₂O. For standards, use 1.0, 2.0, and 3.0 mL working standard solution, diluting to 4.0 mL with H₂O; for blank, use 4.0 mL H₂O. Add 1 mL HCHO, (e), 10 mL toluene from automatic pipet, and 3 mL K₂CO₃ solution. Stopper tube and shake vigorously by hand ca 40 times. Pipet off 7–9 mL toluene layer into small test tube containing ca 0.1 g anhydrous Na₂SO₄. Avoid removing droplets of aqueous layer. Stopper tube and shake well to dry toluene. Pipet 5 mL toluene layer into dry colorimeter tube. Add 5 mL picric acid solution and mix by swirling gently. Determine *A* at 410 nm against blank carried through determination. Color is stable. If original aliquot contains >0.03 mg TMA-N, dilute extract with trichloroacetic acid solution and repeat determination.

$$\begin{aligned} \text{mg TMA-N/100 g sample (based on 1 mL aliquot)} &= (A/A') \\ &\times (\text{mg TMA-N/mL standard solution}) \\ &\times \text{mL standard solution used} \times 300 \end{aligned}$$

Use *A'* of standard nearest to *A* of sample for calculation.

Reference: JAOAC 54, 725(1971).

2.4.03

AOAC Official Method 955.04 Nitrogen (Total) in Fertilizers Kjeldahl Method Final Action

(Provide adequate ventilation in laboratory and do not permit accumulation of exposed Hg.)

Caution: See Appendix B, safety notes on Hg.

A. Reagents

- (a) *Sulfuric acid*.—93–98% H₂SO₄, N-free.
- (b) *Mercuric oxide or metallic mercury*.—HgO or Hg, reagent grade, N-free.
- (c) *Potassium sulfate (or anhydrous sodium sulfate)*.—Reagent grade, N-free.
- (d) *Salicylic acid*.—Reagent grade, N-free.
- (e) *Sulfide or thiosulfate solution*.—Dissolve 40 g commercial K₂S in 1 L H₂O. (Solution of 40 g Na₂S or 80 g Na₂S₂O₃·5H₂O in 1 L may be used.)
- (f) *Sodium hydroxide*.—(Caution: See Appendix B, safety notes on sodium and potassium hydroxide.) Pellets or solution, nitrate-free. For solution, dissolve ca. 450 g solid NaOH in H₂O, cool, and dilute to 1 L. (Specific gravity of solution should be ≥1.36.)
- (g) *Zinc granules*.—Reagent grade.
- (h) *Zinc dust*.—Impalpable powder.
- (i) *Methyl red indicator*.—Dissolve 1 g methyl red in 200 mL alcohol.
- (j) *Hydrochloric or sulfuric acid standard solution*.—0.5N, or 0.1N when amount of N is small. Prepare as in 936.15 (see A.1.06) or 890.01A (see A.1.14).
- (k) *Sodium hydroxide standard solution*.—0.1N (or other specified concentration). Prepare as in 936.16 (see A.1.12).

Standardize each standard solution with primary standard (see Appendix A, standard solutions) and check one against the other. Test reagents before use by blank determination with 2 g sugar, which ensures partial reduction of any nitrates present.

Caution: Use freshly opened H₂SO₄ or add dry P₂O₅ to avoid hydrolysis of nitriles and cyanates. Ratio of salt to acid (weight:volume) should be ca 1:1 at end of digestion for proper temperature control. Digestion may be incomplete at lower ratio; N₂ may be lost at higher ratio. Each g fat consumes 10 mL H₂SO₄, and each g carbohydrate 4 mL H₂SO₄ during digestion.

B. Apparatus

(a) *For digestion*.—Use Kjeldahl flasks of hard, moderately thick, well-annealed glass with total capacity ca 500–800 mL. Conduct digestion over heating device adjusted to bring 250 mL H₂O at 25° to rolling boil in ca 5 min or other time as specified in method. To test heaters, preheat 10 min if gas or 30 min if electric. Add 3–4 boiling chips to prevent superheating.

(b) *For distillation*.—Use 500–800 mL Kjeldahl or other suitable flask, fitted with rubber stopper through which passes lower end of efficient scrubber bulb or trap to prevent mechanical carryover of NaOH during distillation. Connect upper end of bulb tube to condenser tube by rubber tubing. Trap outlet of condenser in such way as to ensure complete absorption of NH₃ distilling over into acid in receiver.

C. Improved Method for Nitrate-Free Samples

(Caution: See Appendix B, safety notes on sulfuric acid, sodium hydroxides, and mercury.)

Place weighed sample (0.7–2.2 g) in digestion flask. Add 0.7 g HgO or 0.65 g metallic Hg, 15 g powdered K₂SO₄ or anhydrous Na₂SO₄, and 25 mL H₂SO₄. If sample >2.2 g is used, increase H₂SO₄ by 10 mL for each g sample. Place flask in inclined position and heat gently until frothing ceases (if necessary, add small amount of paraffin to reduce frothing); boil briskly until solution clears and then ≥30 min longer (2 h for samples containing organic material).

Cool, add ca 200 mL H₂O, cool <25°, add 25 mL of the sulfide or thiosulfate solution, and mix to precipitate Hg. Add few Zn granules to prevent bumping, tilt flask, and add layer of NaOH without agitation. (For each 10 mL H₂SO₄ used, or its equivalent in diluted H₂SO₄, add 15 g solid NaOH or enough solution to make contents strongly alkaline.) (Thiosulfate or sulfide solution may be mixed with the NaOH solution before addition to flask.) Immediately connect flask to distilling bulb on condenser, and, with tip of condenser immersed in standard acid and 5–7 drops indicator in receiver, rotate flask to mix contents thoroughly; then heat until all NH₃ has distilled (≥150 mL distillate). Remove receiver, wash tip of condenser, and titrate excess standard acid in distillate with standard NaOH solution. Correct for blank determination on reagents.

$$\% \text{ N} = [(\text{mL standard acid} \times \text{normality acid})$$

$$- (\text{mL standard NaOH} \times \text{normality NaOH})] \times 1.4007/\text{g sample}$$

Reference: JAOAC 38, 56(1955).

D. Improved Kjeldahl Method for Nitrate-Containing Samples

(Not applicable to liquids or to materials with high Cl:NO₃ ratio. Caution: See Appendix B, safety notes on sulfuric acid and mercury.)

Place weighed sample (0.7–2.2 g) in digestion flask. Add 40 mL H₂SO₄ containing 2 g salicylic acid. Shake until thoroughly mixed and let stand, with occasional shaking, ≥30 min; then add (1) 5 g Na₂S₂O₃·5H₂O or (2) 2 g Zn dust (as impalpable powder, not granulated Zn or filings). Shake and let stand 5 min; then heat over low flame until frothing ceases. Turn off heat, add 0.7 g HgO (or 0.65 g metallic Hg) and 15 g powdered K₂SO₄ (or anhydrous Na₂SO₄), and boil briskly until solution clears, then ≥30 min longer (2 h for samples containing organic material).

Proceed as in second paragraph of 955.04C.

Reference: JAOAC 51, 446(1968).

CAS-7727-37-9 (nitrogen)

AOAC Official Method 938.09
Fatty Acids (Volatile) in Seafood
 Column Chromatographic Method
 Final Action 1960

A. Apparatus

(a) *Steam distillation assembly*.—Figure 938.09. Assembly consists of boiler flask (3 L) giving steam at constant rate so as to produce constant rate of distillation, distillation flask, condenser, and 200 mL volumetric flasks as receivers. Standard distillation flask with side arm (ca 9 mm od) attached near center of neck, and with steam inlet tube (ca 10 mm od), is satisfactory. Heating coil of steam generator is made by winding 1.5 m (5') 28 gage Chromel wire (or equivalent) around hollow pipe ca 6 mm (0.25") diameter and heating red hot to detemper wire. Leads into boiler flask are brass, Cu, or other nonferrous metal ca 3/32" (2 mm) diameter. Insulate and shield electric leads and contacts to avoid possible shorting and electric shocks.

Any similar distillation assembly may be used if it is of capacity to handle volumes specified in method and gives $57 \pm 2\%$ recovery of acetic acid on distillation.

(b) *Chromatographic tube*.—Approximately 15×250 mm.

(c) *Source of air pressure or compressed N_2 gas equipped with pressure regulator*.—If such source is not available, following system serves purpose: Fit 1 L side arm flask with 2-hole rubber stopper. Pass glass manometer tube 70 cm long through one hole in stopper so that it reaches bottom of flask, and through other hole pass glass tube ca 8 cm long, whose upper end is connected to top of chromatographic tube by rubber tubing. Connect rubber hand-aspirator bulb to side arm of flask. Fill flask with Hg to depth of 1.5 cm. (Height of Hg column in manometer tube indicates pressure in system; 25 cm is equivalent to ca 5 lb.) To maintain reservoir pressure when chromatographic tube is disconnected, fit stopcock into line leading from flask to chromatographic tube; and to prevent valve in hand aspirator from leaking, insert second stopcock between side arm and bulb.

(d) *Rubber bulb*.—5 mL. (Type used on dropping bottles.)

(e) *Microfunnel*.—Büchner-type, 2 mL capacity with coarse fritted disk; Corning No. 36060.

B. Reagents

(a) *Butanol in chloroform*.—1%. Remove alcohol from USP $CHCl_3$ by washing 3 times with $\frac{1}{2}$ volume H_2O . Add 10 mL *n*-butanol to 1 L washed $CHCl_3$ in separator, shake vigorously, add 25 mL H_2O , and shake again. Let stand until lower layer clears, and drain. Discard upper aqueous layer. Store in contact with granular anhydrous Na_2SO_4 .

(b) *Butanol in chloroform*.—10%. To 900 mL USP $CHCl_3$ (not previously washed) in separator add 100 mL *n*-butanol, shake vigorously, add 25 mL H_2O , and shake again. Let $CHCl_3$ stand until clear, and drain. Discard aqueous layer. Store in contact with granular anhydrous Na_2SO_4 .

(c) *Alphamine Red R indicator*.—Dissolve 50 mg mono-ammonium salt 3-(4-anilino-1-naphthylazo)-2,7-naphthalene disulfonic acid (ICN K&K Labs, Inc., PO Box 28050, Cleveland, OH 44128-0250) in 25 mL H_2O . (Red solution produced by 1 drop indicator in 20 mL H_2O must be changed to violet by 1 drop 0.01N HCl.) Prepare fresh weekly.

(d) *Cresol red indicator*.—Dissolve 50 mL *o*-cresolsulfon-

phthalein in 20 mL alcohol, add 1.3 mL 0.1N NaOH, and dilute to 50 mL with H_2O . Use 2 drops for each 25 mL aqueous solution.

(e) *Barium hydroxide standard solution*.—0.01N. (Store in polyethylene or paraffin-lined bottle and protect from CO_2 of atmosphere with soda-lime or Ascarite; dispense from 10 mL buret.) [0.01N NaOH may be used instead of $Ba(OH)_2$ except in titration of Solution B, 938.09E. NaOH solution must be used in titration of Solution A, 938.09E, since sodium salts are required for chromatography.]

(f) *Sodium acetate-sodium chloride solution*.—Dissolve 12 g NaCl and 25 g $NaCH_3COO \cdot 3H_2O$ in H_2O and dilute to 500 mL.

(g) *Silicic acid*.—Reagent grade "100-mesh" powdered, suitable for chromatography (Mallinckrodt Chemical Works No. 2847, or equivalent).

C. Standardization of Distillation Apparatus

Place apparatus, 938.09A(a), in laboratory so that it is free from drafts and sudden changes in temperature. Make mark on boiler flask at 1.5 L level, fill to this mark with H_2O , heat to boiling, and boil several min before starting distillation. Transfer 150 mL H_2O to distillation flask, add 1 drop H_2SO_4 (1 + 1), connect condenser, insert steam inlet tube into distillation flask, and bring contents of flask to incipient boiling with burner. Connect steam inlet tube with steam supply from boiler and steam distil. Regulate rate of evolution of steam and height of small flame of burner under distillation flask so that volume of liquid in distillation flask is kept constant at 150 mL and distillate collects at 200 mL/h (Period of collection may vary 5 min for 200 mL distillate. Keep volume in distillation flask at 150 ± 10 mL. Stop boiling, if necessary, to permit test of constancy of 150 mL volume by momentarily interrupting steam supply. Few trials will show conditions necessary to maintain constant volume in distillation flask and constant rate of distillation.) Determine blank on 2 successive 200 mL portions of distillate by titrating with 0.01N alkali (phenolphthalein) in CO_2 -free atmosphere.

Transfer 50 mL ca 0.1N CH_3COOH (concentration must be accurately known) to distillation flask; add 1 drop H_2SO_4 (1 + 1) (avoid contact with neck of flask) and 100 mL H_2O . Collect 200 mL distillate and titrate with 0.1N alkali. Correct for titration blanks and compute % acid distilled. Distillation technique and apparatus are satisfactory when recovery is $57 \pm 2\%$. Apparatus so adjusted gives recoveries ($\pm 2\%$) of formic, propionic, and butyric acids of 40.5, 81, and 92%, respectively [JAOAC 21, 684, 688(1938)], on 200 mL distillate.

D. Preparation of Solution

Weigh 50 g comminuted material, 937.07 (see 35.1.01), into tared 500 mL wide-mouth Erlenmeyer, add ca 150 mL H_2O , stopper flask, and shake vigorously ca 1 min to effect thorough suspension of material. Add 25 mL 1N H_2SO_4 , mix, precipitate proteins with 20% phosphotungstic acid solution (40 mL is usually enough), make to 300 g with H_2O , shake vigorously ca 1 min, and filter through 24 cm rapid folded paper.

E. Distillation and Computation of Volatile Acid Number

Pipet 150 mL prepared solution into distillation flask of apparatus and make acid to Congo red paper with H_2SO_4 (1 + 1). Steam distil as in 938.09C. Collect 200 mL distillate, titrate with 0.01N NaOH to phenolphthalein end point, and designate as A. Collect second 200 mL portion distillate, titrate with 0.01N $Ba(OH)_2$ solution to phenolphthalein end point, and designate as B. To calculate volatile acid number, multiply titration obtained on distillate A, corrected for

blank, by 4.

F. Determination of Formic Acid

(Caution: See Appendix B, safety notes on mercury salts.)

Add 2 drops saturated $\text{Ba}(\text{OH})_2$ solution to distillate B, 938.09E, and evaporate to dryness on steam bath. Add ca 5 mL H_2O to residue and 1 mL more of 1N HCl than necessary to liberate volatile acids. Filter through small paper into 125 mL Erlenmeyer with standard taper joint, and wash paper with H_2O in such manner that total filtrate equals 30–40 mL. Add 10 mL $\text{NaCH}_3\text{COO}\text{-NaCl}$ solution and 10 mL 5% HgCl_2 solution. Connect flask with standard taper air condenser and place on steam bath 2.5 h

With suction through glass siphon attached to funnel by rubber stopper, transfer precipitate of Hg_2Cl_2 to previously weighed micro-funnel, 938.09A(e) provided with glass fiber filter ca 2 mm thick. Rinse flask with H_2O followed by alcohol. Dry 30 min at 100° , cool, and weigh. Weigh funnel with another funnel, prepared with glass fiber filter and treated similarly to one containing precipitate, as counterpoise.

Weight Hg_2Cl_2 (mg) $\times 0.0975$ = mg formic acid in distillate. To calculate total formic acid originally present in aliquot of sample in distillation flask before distillation, divide mg formic acid found by 0.24 (fraction formic acid distilled in second 200 mL distillate) and multiply by 4 to obtain formic acid in 100 g sample being analyzed. [Note: Factor 4 applies only to products prepared as in 938.09D. If other sample weights and aliquots are used as for eggs, 938.07A (see 34.1.19), appropriate factor must be used.]

References: JAOAC 21, 684, 688(1938); 25, 176(1942); 28, 644(1945); 33, 848(1950). Biochemical Z. 51, 253(1913).

Revised: March 1996

CAS-64-18-6 (formic acid)

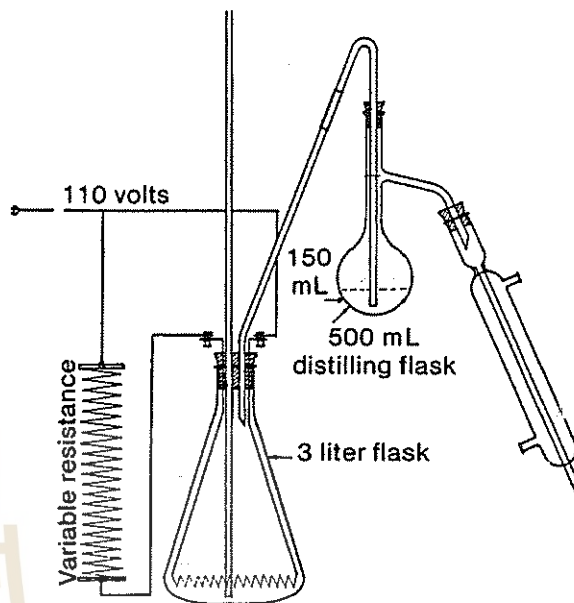
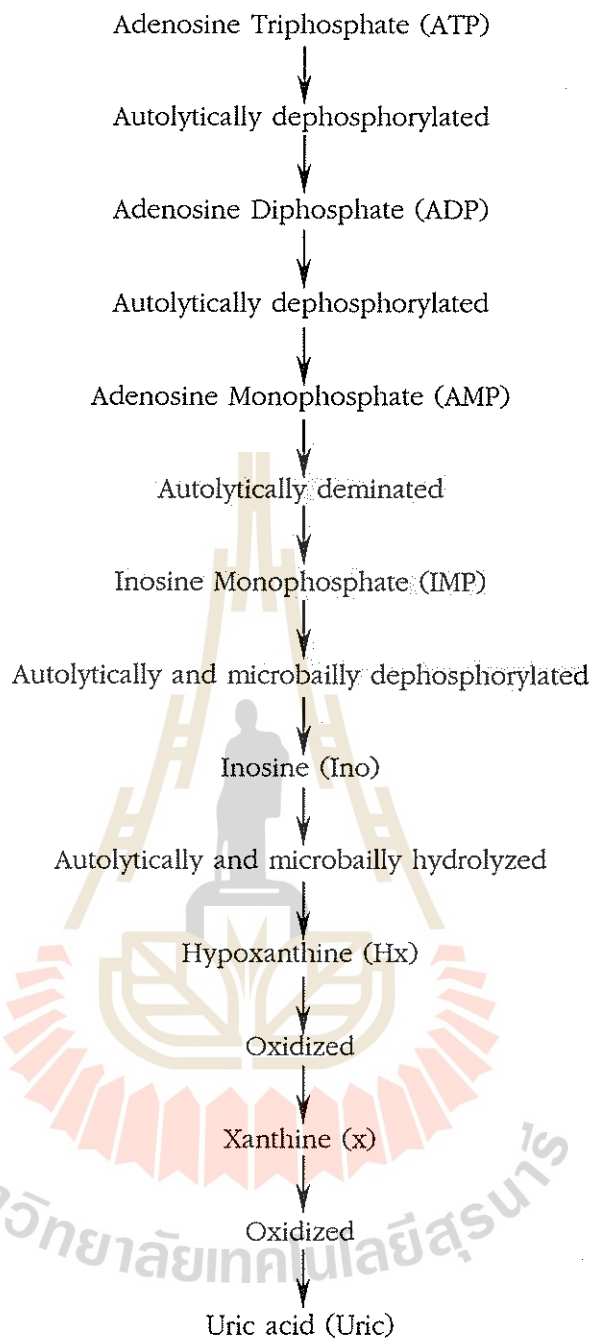


Figure 938.09—Steam distillation assembly

กลไกปฏิกิริยาของการเกิด Hypoxanthine



ภาคผนวก ข

ตารางแสดง profile และ analysis data ที่ใช้

standard 1 Profile

Time (HH:MM:SS)	Type (Temp speed)	Value (°C) or (rpm)
00:00:00	Temp	50
00:00:00	Speed	960
00:00:10	Speed	160
00:01:00	Temp	50
00:04:42	Temp	95
00:07:12	Temp	95
00:11:00	Temp	50

end of test time (HH:MM:SS) = 00:13:00

initial idle temperature (°C) 50 +/- 1

time between reading (sec) 4

standard 1 analysis data

description	formula
Peak 1	ViscAtPeak(1,7)
Trough 1	ViscAtTrough(6,12)
Breakdown	ViscAtPeak(1,7)-ViscAtTrough(6,12)
Final Visc	ViscAtEnd()
Setback	ViscAtEnd()-ViscAtTrough(6,12)
Peak Time	TimeAtViscPeak(1,7)
Pasting Temp	TempAtViscRate(1,7,,1,24)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี