# บทที่ 4
# การเตรียมสารตัวอย่าง
## (Preparation of samples)

การเตรียมสารตัวอย่างเป็นงานที่ต้องใช้เวลาและความชำนาญของผู้วิเคราะห์โดยต้องศึกษาวิธีการที่ถูกต้องและเหมาะสมกับตัวอย่างแต่ละชนิดซึ่งมีมากมายหลายรูปแบบ ถ้าการเตรียมตัวอย่างไม่ถูกต้องและไม่มีความแม่นยำก็ทำให้เกิดความเสียหายต่อการวิเคราะห์คุณภาพของสารอาหารและเกิดความบกพร่องในการรายงานผลการวิเคราะห์

จุดมุ่งหมายของการเตรียมตัวอย่างคือการผสมให้เข้ากันมากที่สุดสำหรับตัวอย่างที่มีปริมาณมาก พยายามรวมสารตัวอย่างให้เป็นเนื้อเดียวกันและลดขนาดของตัวอย่าง สารตัวอย่างที่เป็นเนื้อเดียวกันต้องทำให้ขนาดเล็กลงเพื่อความเหมาะสมในการวิเคราะห์ เช่นการอบแห้งในตู้อบลมร้อนเพื่อระเหยน้ำออกจากตัวอย่าง หรือใช้วิธีระเหิดโดยการ lyophilize เพื่อรักษาสภาวะของสารอาหารให้คงเดิมไม่เสียหายก่อนการวิเคราะห์ หรือการอบแห้งด้วย vacuum oven ถ้าสารตัวอย่างมีน้ำตาลมาก เป็นต้น ปัญหาที่เกิดขึ้นมีหลายประการเช่นการชักตัวอย่างที่เป็นตัวแทนของตัวอย่างจำนวนมากต้องทำอย่างสม่ำเสมอเพื่อเป็นตัวแทนของตัวอย่างชิ้นใหญ่ หรือการเปลี่ยนแปลงเอ็นไซม์ขณะวิเคราะห์สารอาหาร การปนเปื้อนของโลหะจากเครื่องมือขณะบดตัวอย่าง ถ้าต้องการวิเคราะห์ปริมาณโลหะจากตัวอย่างควรหลีกเลี่ยงการใช้เครื่องมือที่เป็นโลหะชนิดเดียวกับโลหะที่ต้องการวิเคราะห์ สารอาหารที่เปลี่ยนแปลงเร็วเช่นปริมาณ fatty acid, chlorophyll, vitamin ต่างๆเนื่องจากแสงหรือความร้อน การวิเคราะห์บางครั้งอาจใช้ตัวอย่างสดหรือตัวอย่างแห้ง เช่น การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน เถ้า แต่ถ้าการวิเคราะห์ค่าความชื้น เกลือแร่ในตัวอย่างอาหารควรอบตัวอย่างจนแห้ง ขนาดตัวอย่างก็มีความสำคัญต่อการวิเคราะห์ เช่นการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ความชื้น และ เกลือแร่ ขั้นตอนก่อนการวิเคราะห์ควรลดขนาดของสารตัวอย่างลงเหลือ 20 mesh ส่วนการวิเคราะห์ปริมาณไขมัน คาร์โบไฮเดรตควรให้ขนาดตัวอย่างเหลือประมาณ 40 mesh (Pomeranz et al., 1994) ถ้าสารตัวอย่างสามารถลดขนาดตัวอย่างลงจะทำให้การวิเคราะห์ถูกต้องยิ่งขึ้น

## หลักการเบื้องต้นของการเตรียมตัวอย่าง

1. การทำตัวอย่างให้แห้ง (Drying sample) จะต้องทำให้สารตัวอย่างแห้งก่อนใช้ตัวทำละลายสกัด เพราะทำละลายไม่สามารถผ่านเข้าไปในอาหารที่ชื้นและการสกัดจะไม่มีประสิทธิภาพ

2. การลดขนาดของสารตัวอย่าง (Particle size reduction) สารตัวอย่างที่แห้งต้องทำให้ขนาดเล็กลงเพื่อให้สม่ำเสมอในการสกัดและเพิ่มพื้นผิวของตัวอย่างที่จะสัมผัสกับสารละลาย การบดตัวอย่างควรทำในสภาวะที่เย็นเพื่อป้องกันการเลี่ยนแปลงคุณภาพของตัวอย่าง

3. การย่อยสลายด้วยกรด (Acid hydrolysis) สารตัวอย่างจะมีองค์ประกอบที่ซับซ้อน ถ้าไม่ย่อยให้แยกจากกันจะทำให้ตัวทำละลายเข้าไม่ถึง ดังนั้นจึงควรใช้กรดย่อยให้แยกจากกัน เช่น lipoprotein, glycolipids เป็นต้น

4. การเลือกตัวทำละลาย (Solvent selection) ทางทฤษฎีตัวทำละลายที่ดีต้องสามารถสกัดสารอาหารที่ต้องการวิเคราะห์ออกมาได้หมดแยกจากสารเจือปนอื่นๆ แต่ในทางปฏิบัติตัวทำละลายขึ้นกับขั้วของสารตัวอย่าง (polarity) ถ้าเป็นตัวอย่างที่มีขั้วต้องถูกสกัดด้วยตัวทำละลายที่มีขั้ว เช่น glycolipids, phospholipids จะละลายดีในตัวทำละลายที่มีขั้วเช่น แอลกอฮอล์ มากกว่าละลายใน Hexane แต่ถ้าเป็นกลุ่มที่ไม่มีขั้วเช่น triaylglycerols จะละลายในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว ดังนั้นการสกัดสารอาหารออกจากสารตัวอย่างอาจต้องใช้ตัวทำละลายหลายชนิด ต้องเปรียบเทียบตัวทำละลายแต่ละชนิดจนพบตัวทำละลายที่เหมาะสมจึงจะทำให้การวิเคราะห์ถูกต้อง

## การสกัดสารละลายแบ่งเป็นหลายวิธีดังนี้คือ

**1. Distillation methods**

วิธีนี้อาศัยความได้เปรียบขององค์ประกอบต่างๆ ในผลิตภัณฑ์อาหาร เช่นกลิ่นอาหารซึ่งระเหยได้ก็สามารถสกัดด้วยตัวทำละลายหลายชนิด เช่น methylene chloride (dichloro methane), hexane, ether, methanol และ ethanol หรือสารอาหารที่ไม่ระเหย ก็สามารถเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสม เช่นสกัดด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์หรือ normal saline (น้ำเกลือ) เป็นต้น

**2. Solvent Extraction**

โดยแยกสกัดด้วยตัวละลายได้หลายชนิดทั้งชนิดมีขั้วและไม่มีขั้ว เช่น chloroform, dichloro methane, methanol, hexane และ ether เป็นต้น

สารอาหารประเภทกลิ่นมักละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ อาหารประเภทที่ไม่มีไขมัน

ประกอบด้วยส่วนที่เป็นสารอาหารและส่วนที่ละลายในน้ำ ซึ่งสกัดโดยตัวทำละลายอินทรีย์ได้ ประเภทเครื่องดื่มเช่น ไวน์, น้ำผลไม้, น้ำผักชนิดต่างๆ สามารถใช้ตัวทำละลายสกัดได้หลายชนิด ขึ้นกับวิธีการสกัด

**Solvent Extraction แบ่งได้อีกหลายประเภทดังนี้คือ**

**2.1 Batch Extraction** วิธีนี้เป็นการผสมสารตัวอย่างกับตัวทำละลายที่เหมาะสมในภาชนะที่ใช้สกัด เช่น separatory funnel เมื่อเขย่าจะทำให้เกิดการแยกตัวของตัวทำละลายและชั้นน้ำ เมื่อแยกกันชัดเจนก็ทิ้งชั้นน้ำไป วิเคราะห์ความเข้มข้นของสารอาหารในชั้นตัวทำละลายโดยระเหยด้วยความร้อน ประสิทธิภาพของการสกัดขึ้นกับค่าสมดุลย์ (K, equilibrium partition coefficient ) ซึ่ง $K = C_{solvent} / C_{aqueous}$ เมื่อ $C_{solvent}$ และ $C_{aqueous}$ คือค่าความเข้มข้นของไขมันในชั้นน้ำและชั้นตัวทำละลาย ถ้าค่า K สูงแสดงว่าการสกัดสารมีประสิทธิภาพสูง

**การคำนวน % Lipid = 100 { $M_{lipid}/M_{sample}$**

ปัญหาที่เกิดขึ้นสำหรับการสกัดวิธีนี้คือ การเกิด emulsion ขณะการสกัด ซึ่งมีวิธีแก้ไขโดยการปั่นแยกในเครื่องแยกเหวี่ยงแรงสูง การเติมสารละลายเกลือ การกวนสารละลายอย่างช้าๆ และการปรับสภาวะความเป็นกรดด่างของสารละลาย

**2.2 Continous Liquid/liquid Extraction** การสกัดสารตัวอย่างด้วยตัวทำละลายอินทรีย์อย่างต่อเนื่อง ซึ่งสารอาหารต่างๆที่ต้องการวิเคราะห์จะละลายอยู่ในชั้นตัวทำละลาย เมื่อต้องการนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือชนิดต่างๆ ก็นำไประเหยตัวทำละลายออกจนเกือบหมด ในโอกาสเดียวกันก็เพิ่มความเข้มข้นของสารตัวอย่างด้วย

**2.3 Semi-Continuous Solvent Extractions** วิธีนี้เป็นวิธีที่เพิ่มประสิทธิภาพของการสกัดสารอาหารจากตัวอย่างอาหารที่ต้องการวิเคราะห์ เช่นวิธี Soxhlet method ถ้าใช้วิธี Soxhlet ต้องเตรียมสารตัวอย่างให้แห้ง ใส่สารตัวอย่างในภาชนที่ใช้สกัด และใส่ตัวทำละลายและให้ความร้อนเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการสกัด เมื่อการสกัดเสร็จในภาชนะเหลือสารอาหารที่ถูกสกัดออกมาและมีตัวทำละลาย ระเหยตัวทำละลายออกไป ชั่งน้ำหนักสารอาหารที่สกัดได้

นำผลการวิเคราะห์มาคำนวน

% Lipid = 100 { $M_{lipid} / M_{sample}$ )

**2.4 Supercritical Fluid Extraction (SFE)** โดยใช้ก๊าซชนิดต่างๆ ในการสกัดสาร ตัวอย่าง carbondioxide, nitrous oxide, tetrahydrofuran, alcohols, ammonia, ethyl acetate เป็นต้น **โดยที่ก๊าซชนิดต่างๆ ที่ใช้ต้องมีความบริสุทธิ์มาก วิธีนี้ใช้มาตั้งแต่ปีค.ศ.1800** วิธีนี้เป็นวิธีการสกัดสารที่รวดเร็วและมีสารปนเปื้อนน้อยที่สุด ใช้อุณหภูมิและความดันต่ำค่อนข้างมีประสิทธิภาพสูง วิธีนี้เหมาะสมกับสารตัวอย่างที่ไม่คุ้นเคย ซึ่งจะสูญเสียตัวทำละลายน้อยที่สุด แต่ราคาของก๊าซบริสุทธิ์ค่อนข้างสูง

Supercritical fluid หรือของไหลเหนือวิกฤต หมายถึงสารที่อยู่ในสภาวะซึ่งไม่สามารถจำแนกได้ว่าเป็นก๊าซหรือของเหลวซึ่งสามารถอธิบายได้จากเฟสไดอะแกรมของความดันและอุณหภูมิ (Pressure-Temperature phase diagram) ของสารบริสุทธิ์ใดๆ (Reverchon et al., 1995) ของไหลเหนือวิกฤตมีคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ (physiochemical properties) อยู่ระหว่างก๊าซกับของเหลว ความหนาแน่นของของไหลเหนือวิกฤตมีค่าใกล้เคียงกับของเหลวเมื่อนำมาใช้เป็นตัวทำละลาย โมเลกุลของสารที่ต้องการจะถูกล้อมรอบด้วยโมเลกุลของไหลเหนือวิกฤตเกิดอัตรกิริยากัน (interaction) ทำให้พลังงานหรือ เอนทาลปี (enthalpy) ลดลงเกิดการละลายได้ดีขึ้น ในขณะเดียวกันของไหลเหนือวิกฤตยังมีความหนืด (viscosity) และการแพร่กระจาย (diffusivity) ใกล้เคียงกับก๊าซทำให้สามารถแทรกเข้าไปในโครงสร้างของตัวถูกละลายได้ดีมากกว่าของเหลว (Rivi et al,1986) คุณสมบัติเหล่านี้จึงนิยมนำของไหลเหนือวิกฤตมาใช้เป็นตัวทำละลาย เนื่องจากมีข้อดีกว่าตัวทำละลายที่อยู่ในสถานะของเหลวคืออัตราการถ่ายเทมวล (mass transfer) เร็วกว่าและมีความสามารถในการ ทำละลายได้ดีกว่า จากการศึกษาเปรียบเทียบการสกัดระหว่างคาร์บอนไดออกไซด์ที่เป็นของเหลวกัคาร์บอนออกไซด์ชนิดเหนือวิกฤต จะได้อัตราการสกัดสูงกว่าประมาณ 2.5 เท่า (Mayer, 1993)

**Solvent Selection**

1. เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ นิยมสกัดด้วยสารละลายอินทรีย์ที่ไม่มีขั้ว (nonplar solvent)

2. สารที่ให้กลิ่น สกัดด้วยสารละลายที่มีจุดเดือดต่ำเช่น Freon 11, $CO_2$ หรือ Freon 12

3. สารอาหารที่มีไขมันสูง สามารถแยกกลิ่นและไขมันโดยใช้ระบบสุญญากาศจะเหมาะสมกว่า

## การบดตัวอย่างอาหารแห้ง

ถ้าเป็นปริมาณน้อยสามารถใช้โกร่งบดให้ละเอียด ถ้าจำนวนมากขึ้นควรใช้ hammer mills และผ่านการร่อนให้ขนาดเล็กลง บางครั้งต้องใส่ตัวอย่างในโถอบความชื้นเพื่อให้แห้งสนิทก่อนการวิเคราะห์

## การบดตัวอย่างอาหารชื้น

ตัวอย่างอาหารจะสูญเสียความชื้นจากความร้อนของเครื่องมือและสารเคมีบางชนิด ถ้าตัวอย่างค่อนข้างแข็งจะเกิดการปนเปื้อนจากโลหะในเครื่องบด วิธีแก้ไขถ้าในกรณีที่จะวิเคราะห์ปริมาณโลหะในอาหารควรใช้เครื่องบดที่ทำจากแก้วหรือเซรามิค ถ้าหลีกเลี่ยงเครื่องที่ทำจากโลหะไม่ได้ควรใช้เครื่องที่ทำจากโลหะคนละชนิดกับที่จะวิเคราะห์ การเตรียมตัวอย่างที่มีความชื้นโดยเริ่มต้นตัดเป็นชิ้นๆ เช่นผักสดหรือผลไม้สด ถ้าต้องการชิ้นเล็กละเอียดควรใช้เครื่อง blender ปั่นซึ่งมีแรงเหวี่ยงประมาณ 2,500 รอบต่อนาที ทั้งนี้ blender ไม่สามารถตัดตัวอย่างที่ค่อนข้างหนา แต่ต้องระวังความร้อนจากเครื่องจะทำลายเอ็นไซม์ในผักผลไม้

## การบดอาหารที่แช่แข็ง

ควรใช้เครื่อง chilled ball mills ซึ่งป้องกันการสูญเสียสารอาหารหรือการเปลี่ยนแปลงทางเคมีในอาหาร เช่นปฏิกิริยา maillard reaction ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาของน้ำตาลและกรดอะมิโนที่อุณหภูมิห้อง ถ้าสารตัวอย่างมีขนาดใหญ่ควรใช้ centrifugal mill

## การใช้เอ็นไซม์และสารเคมีช่วยในการเตรียมตัวอย่าง

การเตรียมตัวอย่างอาหารสามารถใช้เอ็นไซม์และสารเคมีช่วยย่อยขนาดให้เล็กลงเพื่อสะดวกต่อการวิเคราะห์ เช่น cellulases ใช้ย่อยพวกผักผลไม้ ส่วน proteases และ carbohydrases ใช้ย่อยอาหารที่มีขนาดใหญ่ amyloglucosidase ใช้ย่อยแป้ง เอ็นไซม์ที่ใช้ในเชิงพาณิชย์เช่น การใช้เอ็นไซม์ protease ร่วมกับเอ็นไซม์ lipase ในการย่อยเนื้อปลา, ไข่ไก่

ดับ เอ็นไซม์ protease สามารถผลิตจากวัตถุดิบหลายชนิดเช่นจุลินทรีย์ซึ่งสามารถผลิตได้เป็นจำนวนมากคือ *Streptomyces griseus* สำหรับ lipase สามารถผลิตจาก *Candida*

*cylindraceae* ซึ่งมีประสิทธิภาพในการย่อยดีมาก สารเคมีต่างๆ เช่น Dimethylformamide, urea, pyridine, phenol, dimethylsulfoxide และ synthetic detergents

## การยับยั้งปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ (Enzyme Inactivation)

นักวิเคราะห์ต้องพบปัญหาเกี่ยวกับปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ขณะวิเคราะห์อาหาร เนื่องจากเอ็นไซม์มีความสามารถในการย่อยสลายอาหารมาก ถ้าเป็นการวิเคราะห์สารอาหารทั่วๆไป เช่น เกลือแร่ คาร์โบไฮเดรต ปริมาณไนโตรเจน ไม่จำเป็นต้องยับยั้งปฏิกิริยาเอ็นไซม์ใน ตัวอย่างอาหาร แต่ถ้าวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล ไขมันอิสระ ต้องยับยั้งปฏิกิริยาเอ็นไซม์ มิฉะนั้นค่าที่ได้จะต่ำกว่าความเป็นจริง ถ้าวิเคราะห์วัสดุสดต้องยับยั้งเอ็นไซม์เพื่อให้อาหารอยู่ในสภาพเดิม

**หลักเกณฑ์ในการเลือกใช้ตัวทำละลาย**

1. เป็นตัวทำละลายที่สามารถละลายสารที่ต้องการได้มากที่สุดและละลายสารที่ไม่ต้องการได้น้อยที่สุด
2. ตัวทำละลายต้องไม่เป็นพิษ (non-toxic) และไม่ติดไฟ (nonflammable)
3. ต้องไม่ระเหยง่ายหรือยากเกินไป ควรมี boiling point ต่ำ
4. ต้องไม่ทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่างที่ต้องการสกัด
5. ราคาไม่สูงเกินไป

**ตัวแปรที่มีอิทธิพลต่อการสกัด** (ประเทืองศรี., 2543)

1. ตัวทำละลาย (solvent) ควรมีขั้วที่เหมาะสมกับตัวถูกละลาย และมีความหนืดต่ำ
2. อุณหภูมิของตัวทำละลาย เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจะทำให้อัตราการสกัดสูงขึ้น เนื่องจากประสิทธิ์ภาพการแพร่กระจายมีค่ามากขึ้น
3. เวลาในการสกัด ถ้าใช้เวลาในการสกัดน้อย สารที่ต้องการจะออกมาน้อย ดังนั้น ต้องใช้เวลาในการสกัดที่เหมาะสมเพื่อให้ได้ปริมาณสารสกัดออกมากที่สุด
4. ขนาดอนุภาค ถ้ามีขนาดเล็กจะทำให้พื้นผิวในการถ่ายเทมวลสารมากขึ้น