บทที่ 3

การดำเนินงานทดลอง

3.1 รูปแบบการศึกษา

งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยเชิงทดลองในห้องปฏิบัติการ เพื่อศึกษาหาภาวะการสกัดสารที่เหมาะสมโดยศึกษาตัวแปร อุณหภูมิ ระยะเวลา อัตราส่วนเกล็ดปลาต่อปริมาณตัวทำละลาย และ ชนิดของตัวทำละลาย จากการทดลองศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเกล็ดปลาโดยใช้ตัวทำละลาย เมทานอล DMF THF และคลอโรฟอร์ม โดยข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้สามารถนำไปเป็นข้อมูลพื้นฐานในการขยายส่วนของเครื่องปฏิกรณ์ ที่จะผลิตในเชิงอุตสาหกรรมต่อไป

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

3.2.1 เครื่องบดละเอียด

3.2.2 เครื่องชั่ง

3.2.3 กระดาษกรอง

3.2.4 ชุดเครื่องแก้วที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

3.2.5 เครื่องดูดสุญญากาศ

3.2.6 ขวดก้นกลม 3 คอ

3.2.7 เทอร์โมมิเตอร์

3.2.8 เครื่องระเหยแบบหมุน (Rotary Evaporator)

3.2.9 เตาไฟฟ้า (Hot plate)

3.2.10 มอเตอร์พร้อมใบพัดกวน

3.2.11 ชุดสกัดซ็อกเล็ต (Soxhlet)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3 วัสดุและสารเคมี

3.3.1 เกล็ดปลา

3.3.2 THF

3.3.3 DMF

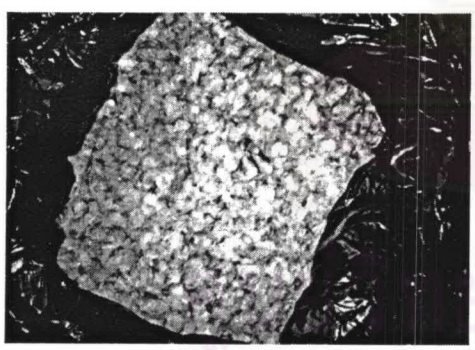
3.3.4 คลอโรฟอร์ม

3.3.5 เมทานอล

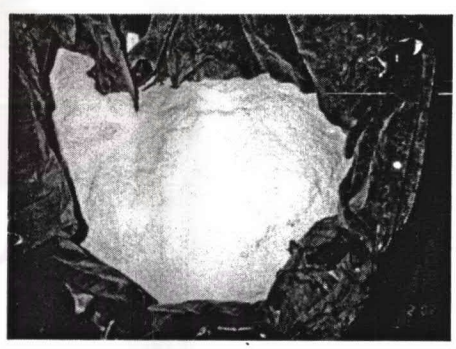
3.4 วิธีทำการทดลอง

3.4.1 ค้นคว้าทฤษฎีและรวบรวมผลงานที่เกี่ยวข้องที่มีผู้ทำการศึกษาไว้ เพื่อใช้เป็นข้อมูลและวางแผนการดำเนินงานการศึกษาทดลอง

3.4.2 เตรียมเกล็ดปลาที่จะใช้โดยนำไปตากแห้งก่อน แล้วจึงนำมาบดด้วยเครื่องบด 2 ครั้ง ครั้งแรกบดจนได้เกล็ดปลาที่มีขนาดเล็กลง แล้วจึงนำมาบดอีกครั้งจนเกล็ดปลามีขนาดละเอียด ดังรูปที่ 3.1 และ 3.2



รูปที่ 3.1 เกล็ดปลากระพงขาวก่อนบด

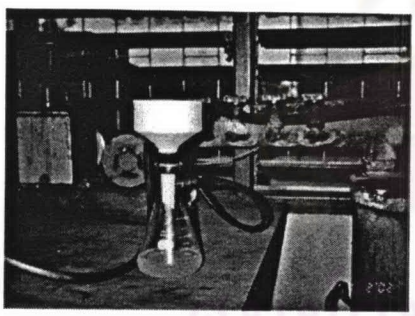


รูปที่ 3.2 เกล็ดปลากระพงขาวหลังบดครั้งที่2

3.4.2.1 ผสมเกล็ดปลาบดละเอียด 50 กรัมกับสารละลาย methanol (จุดเดือด 65 °C) 250 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดก้นกลม และกวนให้เข้ากันเป็นเวลา 7 วัน โดยใช้อุณหภูมิ ณ ที่จุดเดือดของตัวทำละลาย แต่เปลี่ยนชนิดของตัวทำละลายที่ใช้เป็น คลอโรฟอร์ม (จุดเดือด 61 °C) THF (จุดเดือด 66 °C) DMF (จุดเดือด 153 °C) ตามลำดับ เฉพาะสารละลาย DMF จะใช้อุณหภูมิสกัดที่ 60-70 องศาเซลเซียส (เพราะสารเรืองแสงที่คาดว่าจะประกอบด้วยโปรตีนจะถูกทำลายที่ อุณหภูมิสูงกว่า 70 °C) ดังรูปที่ 3.3

รูปที่3.3 มอเตอร์สำหรับกวนและขวดก้นกลมขณะสกัดสาร

3.4.2.2 นำผลิตภัณฑ์ที่ได้มากรองเอาสารที่สกัดได้ออกมาเอาตัวทำละลายออกโดยผ่านเครื่องระเหยแบบหมุน เพื่อหาปริมาณน้ำหนักของผลิตภัณฑ์ต่อการสกัดดังรูปที่ 3.4 และรูปที่ 3.5



รูปที่ 3.4 การกรองเอาสารที่สกัดได้ออกจากตัวทำละลาย

รูปที่ 3.5 เครื่องระเหยแบบหมุนในระบบสุญญากาศ

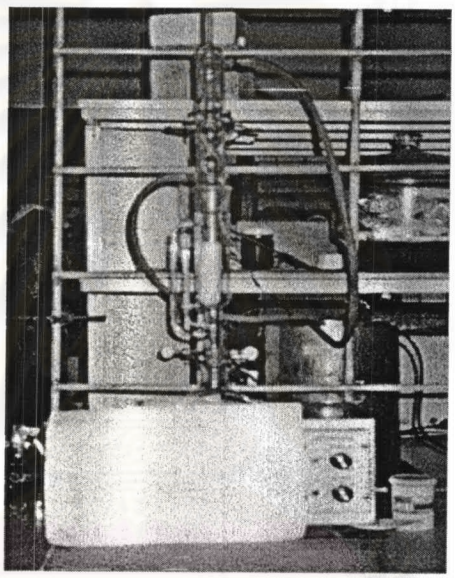
3.4.2.3 ทำการทดลองเช่นเดียวกันกับข้อ 3.4.2.1 แต่เปลี่ยนอุณหภูมิที่ใช้สกัดเป็นอุณหภูมิห้อง เพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการสกัด

3.4.2.4 ทำการทดลองเช่นเดียวกัน กับข้อ 3.4.2.1 โดยเปลี่ยนเวลา ที่ใช้ในการสกัดเป็น 1 ,1.5 , 2 และ 7 วัน เพื่อทำการศึกษาเปรียบเทียบผลของเวลาที่มีต่อการสกัด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4.2.5 ทำการทดลองเช่นเดียวกันกับข้อ 3.4.2.1 โดย เปลี่ยนอัตราส่วนของเกล็ดปลาต่อตัวทำละลายเป็น 1:5 , 1:10, 1:20 ,1:30 โดยปริมาตร ตามลำดับ เพื่อศึกษาถึงอัตราส่วนของเกล็ดปลาต่อตัวทำละลายตามลำดับ

3.4.2.6 ทำการทดลองเช่นเดียวกันกับข้อ 3.4.2.1 เพื่อทำการเปรียบเทียบวิธีการสกัดระหว่างการสกัดแบบใช้ใบพัดกวนขณะสกัดในขวดก้นกลม กับ วิธีการสกัดด้วยซ็อกเล็ต (Soxhlet) ในการสกัดที่อัตราส่วนเกล็ดปลาต่อตัวทำละลาย 1:20 โดยปริมาตร ที่เวลา 1.5 วัน ใช้ตัวทำละลาย DMF ที่อุณหภูมิประมาณ 60-70 องศาเซลเซียส (เลือกทำเฉพาะตัวทำละลาย DMF เพราะให้ปริมาณสารสกัดมากที่สุด) ดังรูปที่ 3.6



รูปที่ 3.6 การสกัดสารด้วยวิธี ซ็อกเล็ต (Soxhlet)

3.4.2.7 วิเคราะห์ปริมาณสารเรืองแสงที่ได้จากการหาปริมาณของโปรตีนโดยวิธี The Kjeldahl Method นำสารละลายไปย่อยโดยปิเปตมา 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเติมตัวเร่งปฏิกิริยา(โพแทสเซียมซัลเฟต-ซีลีเนียม) จำนวน 2 เม็ด และเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นปริมาตร 15 มิลลิลิตร นำไปย่อยด้วยเครื่องย่อยสาร (digestion unit) จนกระทั่งได้สารละลายใส แล้วย่อยต่อไปอีก 15 นาทีตั้งทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นนำไปกลั่นโดยเครื่องกลั่น เติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร และเติมเมทิลเรด อินดิเคเตอร์ 1 หยด ใส่กรดบอริกเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 25 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปกรวย ขนาด 250 มิลลิลิตร ตามปริมาณไนโตรเจนที่มีมากน้อยในตัวอย่าง เติมสารละลาย อินดิเคเตอร์ผสม 4 หยด เขย่าให้เข้ากัน และวางขวดไว้บนตำแหน่งรับสารละลายที่กลั้นได้ของเครื่องกลั่น นำไปเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์จนเป็นด่างเกินพอ (สารละลายเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลือง) ต่อจากนั้นทำการกลั่นและเก็บของเหลวที่

ได้ในขวดรูปกรวยที่มีกรดบอริกอยู่ให้ได้ปริมาตรประมาณ 200 มิลลิลิตร หลังจากนั้นทำการไทเทรตของเหลวที่กลั่นได้ด้วยสารละลายมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 นอร์มอล ที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนจนถึงจุดยุติ (สารละลายเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเทา) ต่อจากนั้นทำการทดสอบกับแบลงค์โดยใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง นำตัวอย่างที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณไนโตรเจนตามภาคผนวก ก

3.4.2.8 สารที่สกัดได้ไปหาค่าความยาวคลื่นของการดูดซับโดยใช้เครื่อง UV - Spectrometer

3.4.2.9 นำสารที่สกัดได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Spectrofluorometer(RF-520) เพื่อหาความยาวคลื่นที่เปล่งแสง

3.4.2.10 วิเคราะห์ผลหาเปอร์เซ็นต์ของสารเรืองแสงที่ได้

3.4.3 สรุปผลการศึกษา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย