บทที่ 3
อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบ

1. เนื้อเยื่อส่วนพุง (belly flap) และเนื้อเยื่อไขมัน (adipose tissue) ของปลาเผาะแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จากโรงงานแล่ปลาเผาะ อ.ท่าอุเทน จ.นครพนม

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องระเหย (Rotary evaporator : R-200 model, BUCHI, Switzerland)
2. เครื่องปั่นแบบมือจับ (MR 430 HC model, 300 Watt, BRAUN®, Spain)
3. เครื่องกวนสารที่ควบคุมอุณหภูมิได้ (Stirrer : ARE model, VELP Scientifica, Italy)
4. เครื่องวัดอุณหภูมิ (Digital thermometer : DTM 305 model, TECPEL, Taiwan)
5. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath : WB14 model, Memmert, Germany)
6. เครื่องบดเนื้อ (Porkert)
7. เครื่องนวดและสับเนื้อ (Meissner maschinen, Wallan)
8. เครื่องวัดสี (Color meter : CR-300, MINOLTA®, Japan)
9. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven : Termaks, England)
10. เตาเผาเถ้า (Muffle Furnace : Gallenkamp, model FSE 520, England)
11. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Analytical balance : Sartorius, CP 224S, Germany)
12. เครื่อง Dry Nitrogen
13. กระดาษกรองเบอร์ 1 และ 4 (Whatman, England)
14. เครื่อง Gas Chromatography (Model GC2014 : SHIMADZU, Japan)
15. GC column (DB-WAX 30M : Durabond, U.S.A)
16. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath : WB14 model, Memmert, Germany)
17. เครื่องผสม (vortex mixer : G-560E model, VORTEX-GENIE®, Scientific Industries, USA)
18. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter “Sartorius”, series PB10)
19. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Analytical balance “Sartorius”, CP 224S, Germany)
20. เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Percisa ; BJ610C, Switzerland)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3 สารเคมี

1. เฮกเซน (Hexane : commercial grade , Etalmar ,Thailand)
2. เฮกเซน (Hexane : HPLC grade 99.5%, LAB-SCAN, Ireland)
3. เอทานอล (Ethanol : AR grade >95%, Merck, Germany)
4. เอทานอล (Ethanol 95%, Imported denatured ethyl alcohol 95%)
5. เอทานอล (Ethanol : absolute, Merck, Germany)
6. เมทานอล (Methanol : AR grade >99.9%, Merck, Germany)
7. คลอโรฟอร์ม (Chloroform : AR grade 99.8%, LAB-SCAN, Ireland)
8. ไดเอทิลอีเทอร์ (Diethyl Ether : AR grade 95.5%, LAB-SCAN, Ireland)
9. ฟีนอล์ฟทาลีน (Phenolphthalein : AR grade, Sigma, U.S.A)
10. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide : commercial grade 98%, THASCO Chemical, Thailand)
11. โซเดียมซัลเฟต (Sodium sulfate : AR grade >99.0%, Merck, Germany)
12. กรดไตรคลอโรอะซิติก (Trichloroacetic acid : AR grade >99.5%, Merck, Germany)
13. โพแทสเซียมไอโอไดด์ (Potassium iodide : AR grade, Baker, U.S.A)
14. โพแทสเซียมไอโอไดด์ (Potassium iodide : AR grade, Merk, Germany)
15. โซเดียมไทโอซัลเฟต (Sodium thiosulfate : AR grade, Fluka, U.S.A)
16. โซเดียมไทโอซัลเฟต (Sodium thiosulphate : AR grade, Finechem, New Zealand)
17. น้ำแป้ง (Soluble starch : AR grade, Baker, U.S.A)
18. กรดฟอสฟอริก (Phosphoric acid : AR grade, Merk, Germany)
19. กรดลิโนเลอิก (Linoleic acid : GC grade > 99.0%, Fluka, Germany)
20. กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid : AR grade 37.0-38.0%, Merck, Germany)
21. บีเอชเอ (Butylated hydroxyanisole : AR grade, Sigma-aldrich, Germany)
22. บีเอชที (2,6-Di-tert-butyl-4-methyphenol : AR grade, Sigma-aldrich, Germany)
23. ยูเรีย (Urea : AR grade, Ajax Finechem)
24. กรดอะซิติก (Acetic acid glacial : AR grade, LAB-SCAN, Ireland)
25. โทลูอีน (Toluene : AR grade >99.5%, LAB-SCAN, Ireland)
26. ปิโตรเลียมอีเทอร์ (Petroleum ether : AR grade, LAB-SCAN, Ireland)
27. กรดปาล์มิติก (Palmitic acid : GC grade, Fluka, Germany)
28. กรดโอเลอิก (Oleic acid : GC grade, Fluka, Germany)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

29. กรดเพนทาดีคาโนอิก (Pentadecanoic acid : GC grade, Fluka, Germany)
30. ดีเอชเอ (*cis*-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoicacid : GC grade, Sigma-aldrich, U.S.A)
31. อีพีเอ (*cis*-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic acid : GC grade, Sigma-aldrich, U.S.A)
32. ไนโตรเจน (Nitrogen 99.99% : Lanna Industrial Gasses, Thailand)

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การสกัดน้ำมันดิบ (Crude oil) จากปลาเผาะ

เนื้อเยื่อของปลาเผาะที่ผ่านการบดแล้ว นำมาสกัดน้ำมันด้วยตัวทำละลายผสมคลอโรฟอร์มและเมทานอลที่อัตราส่วน 2:1(v/v) ตามวิธีของ Bligh and Dyer (Sunarya *et al*., 1996) และคำนวณร้อยละของผลผลิตของน้ำมันดิบที่สกัดได้ รายงานผลเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

1. การสกัดด้วยตัวทำละลาย

ขั้นตอนการสกัดด้วยตัวทำละลายใช้สารละลายผสมคลอโรฟอร์มและเมทานอลที่อัตราส่วน (2:1 v/v) โดยใช้ตัวอย่าง 200 กรัม ผสมสารละลายคลอโรฟอร์มและเมทานอลปริมาณ 600 มิลลิลิตร ทำการปั่นผสมเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเติมคลอโรฟอร์มลงไป 200 มิลลิลิตร แล้วทำการปั่นผสมอีก 30 วินาที

2. การกรองน้ำมัน

นำตัวอย่างที่สกัดได้ในข้อ 1 ไปทำการกรองด้วยระบบสุญญากาศ โดยกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 110 มิลลิเมตร และทำการวางสำลีไว้บนกระดาษกรองเพื่อป้องกันไม่ให้รูของกระดาษกรองอุดตันเร็วเกินไป

3. การแยกเฟสของน้ำมัน

นำสารละลายที่กรองได้จากข้อ 2 มาทำการแยกเฟสของน้ำและน้ำมันออกจากกัน โดยการถ่ายลงใน separating funnel เติมน้ำกลั่นลงไป 100 มิลลิลิตร ทำให้การแยกเฟสระหว่างน้ำและน้ำมันทำได้ง่ายขึ้น ปล่อยชั้นของน้ำทิ้งไป เติมโซเดียมซัลเฟต จำนวน 3 กรัม เพื่อกำจัดน้ำส่วนที่เหลือ และนำไปกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 110 มิลลิเมตรอีกรอบ

4. การระเหยเอาตัวทำละลายออก

นำสารละลายที่ได้จากข้อ 3 ไปทำการระเหยตัวทำละลายออกด้วยระบบสุญญากาศ ที่ความดัน 250 มิลลิบาร์ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และเติมเอทานอลปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำการระเหยต่อที่ความดัน 72 มิลลิบาร์ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เพื่อกำจัดน้ำที่เหลือออก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4.2 การปรับปรุงคุณภาพโดยการกำจัดกัมและฟอกสี

นำน้ำมันดิบที่ได้จากข้อ 3.4.1 มาทำการปรับปรุงคุณภาพของน้ำมัน โดยทำการกำจัดกัม (สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม , 2516) และฟอกสีของน้ำมันที่ได้ (สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, 2516)

1. การกำจัดกัม (Degummimng)

1.1 ให้ความร้อนกับ น้ำมันดิบให้มีอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และเติมกรดฟอสฟอริกเข้มข้น 80%ในปริมาณ 0.025% (v/v) ของน้ำมันดิบ

1.2 กวนเป็นเวลา 10 นาที

1.3 กรองด้วยระบบสุญญากาศ โดยใช้กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 ขนาด 110 มิลลิเมตร โดยวางสำลีไว้ด้านบนกระดาษกรอง เพื่อป้องกันการอุดตันของกระดาษกรอง

2. การฟอกสี (Bleaching)

2.1 ให้ความร้อนกับน้ำมันดิบให้มีอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส และเติมถ่านฟอกสี (activated charcoal) ในปริมาณ 0.5%(w/v) ของน้ำมัน

2.2 กวนเป็นเวลา 10 นาที โดยใช้เครื่องกวนสาร (magnetic stirrer)

2.3 กรองด้วยระบบสุญญากาศ โดยใช้กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 ขนาด 110 มิลลิเมตร โดยวางสำลีไว้ด้านบนกระดาษกรอง เพื่อป้องกันการอุดตันของกระดาษกรอง

2.4 เก็บตัวอย่างในขวดสีชา ไล่อากาศด้วยก๊าซไนโตรเจน และเก็บที่อุณหภูมิ -25 องศาเซลเซียส

3.4.3 การศึกษาคุณภาพของน้ำมัน

นำน้ำมันที่ผ่านการกำจัดกัมและฟอกสีมาศึกษาถึงคุณภาพของน้ำมันเปรียบเทียบกับน้ำมันดิบที่ได้ โดยทำการศึกษาในด้านต่างๆ ดังนี้ ค่าเปอร์ออกไซด์ (AOAC, 2002) ค่ากรดไขมันอิสระ (AOAC, 2000) ค่าของกรด (AOAC, 2000) และค่าสี (Hunter : L a* b*)

ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomize Design จากนั้นหาค่าเฉลี่ยและวิเคราะห์ความแปรปรวนข้อมูลโดยใช้ ANOVA (analysis of variance) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New multiple Range Test

3.4.4 การศึกษาองค์ประกอบของกรดไขมันในน้ำมันปลาเผาะ

นำตัวอย่างจากเนื้อเยื่อส่วนพุงและเนื้อเยื่อไขมันของปลาเผาะ มาบดให้ละเอียดจนเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำไปสกัดน้ำมันเพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบและปริมาณของกรดไขมันด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตรกราฟี (Wanasundara and Shahidi, 1998)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1. การสกัดน้ำมันจากเนื้อเยื่อในแต่ละส่วนของปลาเผาะ (Sunarya *et al*., 1996)

1.1 ชั่งตัวอย่างมา 10 กรัม ใส่ในขวดสีชา แล้วเติมคลอโรฟอร์มและเมทานอล (C:M) 2:1 (v/v) ที่มีบีเอชที 50 ppm 100 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง

1.2 กรองผ่านกระดาษกรองลงในกรวยแยก แล้วนำตัวอย่างที่เหลือจากการกรองมาสกัดด้วย C:M 40 มิลลิลิตร อีก 2 รอบ ล้างขวดตัวอย่างด้วย C:M 20 มิลลิลิตร

1.3 ถ่ายตัวอย่างลงในกรวยแยกแล้วเติม โซเดียมคลอไรด์ 0.85% 20 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้จนสารละลายแยกชั้น

1.4 แยกเอาสารส่วนล่างจากกรวยแยกไประเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง Evaporator ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

1.5 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -25 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้

2. การเปลี่ยนกรดไขมันให้อยู่ในรูปเมทิลเอสเทอร์ (methylation)

2.1 ชั่งตัวอย่างมา 100 มิลลิกรัม ใส่ลงในหลอดฝาเกลียว

2.2 เติม Internal standard (C15:0 ; 10 ppm) 1 มิลลิลิตร

2.3 เติมซัลฟิวริก 0.9M ในเมทานอล 3 มิลลิลิตร และโทลูอีน 1 มิลลิลิตร แล้วทำการปิดฝาหลอดทดลองให้สนิท

2.4 ใส่ลงใน water bath 70 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง (เขย่าทุกๆ 45 นาที)

2.5 เติมเฮกเซน 2 มิลลิลิตร และโซเดียมคลอไรด์ 0.85% 1 มิลลิลิตร

2.6 ดูดส่วนบนใส่หลอดทดลองที่มีน้ำอยู่ประมาณ 1 ใน 3 ของหลอดแล้วปั่นทำให้ผสมกัน

2.7 ดูดสารละลายส่วนบนกรองผ่านโซเดียมซัลเฟตใส่ในหลอดทดลองที่สะอาด

2.8 นำตัวอย่างในข้อ 2.7 ไปสกัดสารรบกวน

2.9 นำของเหลวที่ได้หลังจากสกัดสารรบกวน ไปเป่าไล่ตัวทำละลายออกโดยใช้ไนโตรเจน

2.10 นำตัวอย่างไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตรกราฟี

3. การสกัดสารรบกวน

3.1 ต่อไซลิ่งขนาด 10 มิลลิลิตรเข้ากับ Sep-pak (C18)

3.2 ล้างไซลิ่งด้วย C:M (คลอโรฟอร์ม:เมทานอล; 2:1v/v) 3 มิลลิลิตร 3 รอบ โดยใช้ก้านกดกด C:M ให้ผ่าน Sep-pak ด้วยความเร็วปานกลางลงในขวดใส่ของเสีย

3.3 ล้างไซลิ่งด้วย P (ปิโตรเลียมอีเทอร์) 2 มิลลิลิตร ใช้ก้านกดกด P ผ่าน Sep-pak ด้วยความเร็วปานกลางลงในขวดใส่ของเสีย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4 ดูดตัวอย่างในหลอดทดลองทั้งหมดลงในไซลิ่ง และล้างหลอดทดลองด้วย P ปริมาณเล็กน้อยแล้วดูดลงในไซลิ่งใช้ก้านกดกดให้ผ่านSep-pak อย่างรวดเร็วลงในขวดใส่ของเสีย

3.5 ดูด PE (อีเทอร์ 5% ในปิโตรเลียมอีเทอร์) ลงในไซลิ่ง 3.5 มิลลิลิตร ใช้ก้านกดกด PE ให้ผ่าน Sep-pak ที่มีตัวอย่างอยู่อย่างช้าๆ โดยให้หยดต่อเนื่องกันทีละหยดลงในหล อดทดลองที่สะอาด

3.6 ล้างไซลิ่งด้วย C:M 3 มิลลิลิตร ใช้ก้านกดกดให้ผ่านSep-pak ด้วยความเร็วปานกลางลงในขวดใส่ของเสีย

3.7 นำตัวอย่างจากข้อ 3.6 ไปเป่าไล่ตัวทำละลายออกโดยใช้ไนโตรเจน

ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomize Design จากนั้นหาค่าเฉลี่ยและวิเคราะห์ความแปรปรวนข้อมูลโดยใช้ ANOVA (analysis of variance) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New multiple Range Test

3.4.5 การศึกษาการเพิ่มความเข้มข้นของ EPA และ DHA จากน้ำมันปลาเผาะโดยการตกผลึกกับยูเรีย

นำตัวอย่างน้ำมันที่ผ่านกระบวนการปรับปรุงคุณภาพแล้วจากข้อ 3.4.2 มาเปลี่ยนให้อยู่ในรูปกรดไขมันอิสระ ด้วยการ reflux กับสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ หลังจากนั้นนำมาตกผลึกกับยูเรีย (Wanasundara and Shahidi, 1998) โดยทำการศึกษาพารามิเตอร์ 3 ปัจจัย ได้แก่ อัตราส่วนของยูเรียต่อกรดไขมัน อุณหภูมิในการตกผลึก และเวลาในการตกผลึก

1. การเปลี่ยนน้ำมันให้อยู่ในรูปกรดไขมันอิสระ (Wanasundara and Shahidi, 1998)

1.1 ชั่งน้ำมัน 175 กรัม ลงในขวดก้นกลมขนาด 1000 มิลลิลิตร ที่มีบีเอชที 200 ppm

1.2 ละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 40.25 กรัมในน้ำกลั่น 77 มิลลิลิตร แล้วเติมลงในขวดก้นกลม

1.3 เติมเอทานอล 95% ปริมาณ 462 มิลลิลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากัน

1.4 นำไปเป่าด้วยแก๊สไนโตรเจน แล้วนำไป reflux ที่อุณหภูมิ 62±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

1.5 ถ่ายตัวอย่างลงในกรวยแยก แล้วเติมน้ำกลั่น 350 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

1.6 ทำการสกัดด้วยเฮกเซน 200 มิลลิลิตร 2 ครั้ง แล้วแยกชั้นเฮกเซนทิ้งไป

1.7 นำชั้นน้ำไปปรับ pH = 1 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 3N

1.8 ถ่ายลงในกรวยแยกแล้วสกัดด้วยเฮกเซน 350 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.9 แยกชั้นเฮกเซนออกไปเติมโซเดียมซัลเฟต แล้วทำการกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4

1.10 นำส่วนที่กรองได้ไประเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง Evaporator ที่ 40 องศาเซลเซียส

1.11 กรดไขมันอิสระที่ได้นำไปเป่าด้วย แก๊สไนโตรเจน แล้วทำการเก็บที่ -25 องศาเซลเซียสก่อนนำไปใช้

2. การตกผลึกกรดไขมันด้วยยูเรีย

2.1 ละลายยูเรียในเอทานอล 95% ที่ความเข้มข้น 20% (W/V) และให้ความร้อนที่ 60 องศาเซลเซียส จนยูเรียละลายหมด

2.2 ชั่งน้ำมันมา 300 กรัม แล้วเติมยูเรียที่อัตราส่วน 2:1, 3:1 และ 4:1

2.3 นำไปปั่นผสมให้เข้ากัน แล้วเป่าด้วยไนโตรเจน

2.4 นำไปลดอุณหภูมิลงที่ -5, -10, -15 และ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6, 12 และ 18 ชั่วโมง

2.5 กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4

2.6 นำสารที่กรองได้เติมน้ำกลั่นลงไป 150 มิลลิลิตร

2.7 ปรับ pH = 4-5 ด้วยไฮโดรคลอริก 6N

2.8 เติมเฮกเซน 150 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นผสมเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

2.9 ถ่ายตัวอย่างลงในกรวยแยก เขย่าให้เข้ากัน แล้วตั้งให้เกิดการแยกชั้น

2.10 ปล่อยชั้นน้ำทิ้ง แล้วเติมน้ำกลั่น 150 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เกิดการแยกชั้น

2.11 ปล่อยชั้นน้ำทิ้งแล้วนำชั้นของเฮกเซนไปเติมโซเดียมซัลเฟต กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4

2.12 นำส่วนที่กรองได้ไประเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง Evaporator ที่ 40 องศาเซลเซียส

2.13 นำตัวอย่างไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี โดยทำการเปลี่ยน อยู่ในรูปเมทิลเอสเทอร์และสกัดสารรบกวนก่อน

ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วางแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD จากนั้นหาค่าเฉลี่ยและวิเคราะห์ความแปรปรวนข้อมูลโดยใช้ ANOVA (analysis of variance) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New multiple Range Test

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved