

บทที่ 3

อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการทดลอง

วัสดุ อุปกรณ์ สารเคมี และอุปกรณ์

3.1 วัสดุ

1. ไขมันปลาสดจากฟาร์มเลี้ยงปลา อ.เมือง จ.นครพนม

3.2 สารเคมี

1. โซเดียมซัลเฟต (Sodium sulfate: AR grade > 99.0%, Merck, Germany)
2. เมทานอล (Methanol: AR grade > 95%, Merck, Germany)
3. ไฮโดรเจนซัลเฟต (Hydrogen Sulfate: Merck, Germany)
4. เฮกเซน (Hexane: commercial grade, Merck, Germany)
5. โซเดียมคลอไรด์ (Sodium Chloride: Laboratory, Ajax Finechem, Australai)
6. คลอโรฟอร์ม (Chloroform: AR grade >99.9%, Merck Germany)
7. ปีโตเลียมอีเทอร์ (Petroleumeter: AR grade, IAB-SCAN, Ireland)
8. อีเทอร์ (Eter: lab scan, Thailand)
9. น้ำกลั่น
10. ไซโคลเฮกเซน (Cyclohexane: RCIIlab scan, Thailand)
11. กรดอะซิติก (Acetic acid: RCIIlab scan, Thailand)
12. สารละลายวิกซ์ (Wijs solution, Merck, Germany)
13. โพแทสเซียมไอโอดีน (Potassium Iodine: Laboratory, Ajax Finechem Australai)
14. โซเดียมไทโอซัลเฟต (Sodium Thiosulfate: AR grade, Fluka, U.S.A)
15. น้ำแป้ง (Soluble Starch; AR grade, Baker, U.S.A)
16. ดีเอชเอ (cis-4, 7, 10, 13, 16, 19- docosaheaxenoic acid: GC grade, Sigma-aldrich, U.S.A)
17. อีพีเอ (cis-5, 8, 11, 14, 17- eciosapentaenoic acid: GC grade, Sigma-aldrich, U.S.A)
18. กรดลิโนเลอิก (Linoleic acid: GC grade > 99.0%, Fluka, Germany)
19. ฟีนอล์ฟทาลีน (Phenolphthalein: AR grade, Sigma, U.S.A)

20. เอทานอล (Ethanol: absolute, Merck Germany)
21. โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (Potassium hydroxide: Merck, Germany)
22. กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid: Vechavit, Chaingmai)
23. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide: Merck, Germany)
24. ไคโตซาน (Chitosan: Chemical and Supply, Thailand)
25. มอลโตเดกซ์ตริน (Moltrrodextrin DE11: Biochemika grade: Fluka, Germany)
26. Tween-80® (Srijun Co LTD., Thailand)
27. ไอโซโพรพานอล (Isopropanol: Merck, Germany)

3.3 เครื่องมืออุปกรณ์

1. ชุดกลั่นแยกสาร
2. เครื่องวิเคราะห์เชิงความร้อน Differential Scanning Calorimeter (DSC: Diamond DSC Perkin Elmer instrument, UK)
3. เครื่อง Gas Chromatography (GC: Model GC2014, SHIMADZU, Japan)
4. บีกเกอร์ขนาด 100, 500, 1000 ml
5. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath: WB14 model, Memmert, Germany)
6. เครื่องเหวี่ยงแยกอนุภาค (Hermle, Germany)
7. ฟ้าขาวบาง
8. ชุดหลอดทดลอง
9. กระดาษกรองเบอร์ 4 (Whatman, England)
10. ชุดกรองสุญญากาศ (Vacuum filtration apparatus)
11. เครื่องตั้งไฟฟ้าสถิตย์ 4 ตำแหน่ง (CP 224S, Germany)
12. กระบอกตวง
13. กรวยแยก
14. นาฬิกาจับเวลา
15. เครื่องผสม
16. Vortex (Fisher Vertex Genie 2, Scientific Industries, Inc., Bohemia)
17. ตู้อบลมร้อน (Termaks, England)
18. ตู้อบสุญญากาศ (Binder VD23, USA)
19. เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Labconco, USA)

20. เครื่องอบแห้งแบบพ่นฝอย (JMC Group Engineering Concept., Ltd., Thailand)
21. เครื่องวัดค่าวอเตอร์แอกทีวิตี (Aqua Lab, TE3, Decagon Devices, Inc Pullman, USA)
22. เครื่องวัดสี (CR-300, MINOLTA®, Japan)
23. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด Scanning Electron Microscope (SEM: JEOL JSM-5910, Japan)
24. ขวดวัดความถ่วงจำเพาะ ขนาด 25 ml (Pycnometer)
25. โถดูดความชื้น (Desiccator)

3.4 วิธีการทดลอง

ตอนที่ 3.4.1 การวิเคราะห์จุดหลอมเหลวและการเปลี่ยนรูปไขมันให้อยู่ในรูปของเหลว

นำไขมันปลาสดที่ได้มาจากส่วนกระเพาะของปลาสด มาวิเคราะห์จุดหลอมเหลวของไขมันปลาสดด้วยวิธีวิเคราะห์เชิงความร้อน โดยใช้เครื่อง Differential Scanning Calorimeter (DSC) calibrate ตามวิธีของ Boonyai (2005) ใช้ indium เป็นตัวสอบเทียบ สำหรับการ calibrate จำนวนพื้นที่ที่ได้กราฟโดย indium จะมี ΔH เท่ากับ 28.450 จูลต่อกรัมและมี อุณหภูมิ 156.6 องศาเซลเซียส ค่าที่คำนวณได้ไม่ควรต่างจากมาตรฐานเกิน 1 เปอร์เซ็นต์ (ถ้าเกินให้ทำการ calibrate ซ้ำ) หลังจากทำการสอบเทียบแล้ว นำไขมันปลาสด 4 มิลลิกรัม ใส่ลงใน pan ขนาด 40 ไมโครลิตรทำการตั้งโปรแกรมโดยเริ่มที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วเพิ่มความร้อนเป็น 110 องศาเซลเซียส ที่อัตราเร็ว 10 องศาเซลเซียสต่อนาที แล้ววิเคราะห์จุดหลอมเหลวจากเทอร์โมแกรมโดยใช้โปรแกรม Pyris 1 Data software

นำไขมันปลาสดมาหลอมละลายที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดหลอมเหลวซึ่งวิเคราะห์ได้จาก การใช้เครื่อง DSC เมื่อไขมันละลายหมดนำไปแยกกากด้วยผ้ากรอง หลังจากนั้นนำน้ำมันปลาไป หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกตะกอนของโปรตีนปลาและนำ ออกจากน้ำมัน จากนั้นนำน้ำมันที่ได้ไปกลั่น (distillation) เพื่อแยกกลิ่นและกรดไขมันที่ระเหยง่าย ออก ทำให้ได้น้ำมันบริสุทธิ์และมีความคงตัวมากขึ้นเก็บน้ำมันในขวดที่บดแสงในสถานะ อุณหภูมิห้อง

ตอนที่ 3.4.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบกรดไขมันของน้ำมันปลาสด

นำตัวอย่างน้ำมันปลาสดที่ได้มาเปลี่ยนน้ำมันให้อยู่ในรูปเมทิลเอสเทอร์ (methylation) โดยชั่งน้ำมันปลาสดมา 100 มิลลิกรัม เติม Internal standard (C15: 0; 10 ppm) และเติม H_2SO_4 0.9 M ใส่ลงใน water bath อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เติม

เฮกเซนและ 0.85 เปอร์เซ็นต์ NaCl คูดสารละลายส่วนบนกรองผ่าน Na_2SO_4 ใสในหลอดทดลองที่สะอาดนำตัวอย่างไปสกัดสารรบกวนที่อยู่ในน้ำมัน เมื่อได้สารละลายที่ผ่านการสกัดสารรบกวนเติมเฮกเซนลงในหลอดตัวอย่างปั่นผสมให้เข้ากันคูดตัวอย่างมา 2 ไมโครลิตรแล้วฉีดลงในเครื่อง Gas Chromatography ที่พร้อมวิเคราะห์ตัวอย่างนำผลที่แสดงออกมาเป็นโครมาโตแกรม มาหาองค์ประกอบและปริมาณของกรดไขมัน โดยคำนวณเปอร์เซ็นต์พื้นที่ใต้กราฟของกรดไขมันต่อพื้นที่ใต้กราฟทั้งหมดของกรดไขมัน (Shahidi and Wanasundara, 1998)

ตอนที่ 3.4.3 การศึกษาคุณภาพของน้ำมันปลาสายเคาะ

ศึกษาคุณภาพของน้ำมันปลาสายเคาะ โดยทำการศึกษาดังนี้

1. ค่าเปอร์ออกไซด์ (AOAC, 2000) เป็นปฏิกิริยาของสารละลายโปแตสเซียมไอโอไดด์ในสารละลายของกรดกับพันธะออกซิเจนที่เกิดจากเปอร์ออกไซด์ได้เป็นไอโอดีน ซึ่งจะหาปริมาณไอโอดีนที่เกิดขึ้นได้ โดยนำไปไตเตรทกับสารละลายมาตรฐาน โซเดียมไรโอซัลเฟตโดยใช้น้ำแป้งเป็นอินดิเคเตอร์
2. ค่ากรดไขมันอิสระ (AOAC, 2000) โดยการหาจำนวนมิลลิกรัมของโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการทำให้กรดไขมันอิสระที่มีอยู่ในไขมันหรือน้ำมันจำนวน 1 กรัมโดยการไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐาน โซเดียมไฮดรอกไซด์โดยใช้ฟีนอล์ฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์
3. ค่าไอโอดีน (AOAC, 2000) โดยการหาจำนวนกรัมของไอโอดีนที่เข้าทำปฏิกิริยากับพันธะคู่ของกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวที่เป็นส่วนประกอบในโมเลกุลของไขมันหรือน้ำมัน การทำปฏิกิริยาต้องเติมสารละลายไอโอดีนมากเกินพอ ปริมาณไอโอดีนที่เหลือหาได้โดยการไตเตรทกับสารละลายมาตรฐาน โซเดียมไรโอซัลเฟตโดยใช้น้ำแป้งเป็นอินดิเคเตอร์
4. ค่าสปอนนิฟิเคชัน (AOAC, 2000) โดยการหาจำนวนมิลลิกรัมของโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไฮโดรไลซ์ไขมันหรือน้ำมันจำนวน 1 กรัม ได้เป็นสบู่และกลีเซอรอลโดยการไตเตรทกับสารละลายไฮโดรคลอริกโดยใช้ฟีนอล์ฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์
5. ค่าความถ่วงจำเพาะ โดยเปรียบเทียบอัตราส่วนระหว่างน้ำหนักของน้ำและน้ำหนักของน้ำมัน โดยการใช้ขวดวัดความถ่วงจำเพาะ (Pycnometer)
6. ค่าสี วิเคราะห์ค่าสีโดยใช้เครื่องวิเคราะห์สี "Colorimeter" โดยใช้ระบบ Hunter แสดงผลออกมาเป็นค่า $L^* a^* b^*$ โดยค่า L แสดงถึงค่าความสว่าง (Lightness) ถ้ามีค่าสูงแสดงว่าตัวอย่างมีค่าความสว่างมาก ค่า a แสดงถึงค่าสีระหว่างแดง (+a) และเขียว (-a) ค่า b แสดงค่าสีระหว่างน้ำเงิน (-b) และเหลือง (+b)

ตอนที่ 3.4.4 การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไมโครแคปซูลน้ำมันปลาสวายเพาะด้วยวิธีการอบแห้งแบบพ่นฝอยและการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

การเตรียมอิมัลชัน

เตรียมส่วนผสมของสารห่อหุ้มแคปซูลประกอบด้วยมอลโตเดกซ์ตริน (DE 11) 10 กรัม และโคโคซาน 1 กรัม เป็นสารห่อหุ้ม ใช้ tween-80® 12.5 มิลลิลิตร เป็นอิมัลซิไฟเออร์ น้ำมันปลาสวายเพาะ 6 กรัม เป็นสารแก่น น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร กรดอะซิติก 1.25 มิลลิลิตร ทำการผสมโดยนำโคโคซานมาละลายในสารละลายกรดอะซิติกที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นกวนให้โคโคซานละลาย นำมอลโตเดกซ์ตรินค่อยๆ เทใส่ลงไปผสมให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกันหลังจากนั้นใส่น้ำมันปลาสวายเพาะที่ผสม tween-80® ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้เครื่อง blender จะทำให้ได้อิมัลชันที่เสถียรนานประมาณ 15 นาที (Klaypradit และ Huang, 2007)

การอบแห้งแบบพ่นฝอย

นำอิมัลชันที่ได้จากการผสมระหว่างมอลโตเดกซ์ตรินกับน้ำมันปลาสวายเพาะไป ทำแห้งด้วยเครื่องอบแห้งแบบพ่นฝอยขนาดกำลังการผลิต 12 ลิตรต่อชั่วโมงใช้ atomizer แบบ rotary ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที โดยแปรผันอุณหภูมิลมร้อนเข้า 170, 180 และ 190 องศาเซลเซียส อุณหภูมิลมร้อนออก 100 องศาเซลเซียส อัตราการป้อนที่ระดับ 1 ลิตรต่อชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วางแผนทดลองแบบ completely randomized design (CRD) จากนั้นนำไมโครแคปซูลน้ำมันปลาสวายเพาะที่ได้เก็บในขวดโหลทึบแสงแล้วนำมาวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพและทางเคมี จากนั้นหาค่าเฉลี่ยและวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลโดยใช้ ANOVA (analysis of variance) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New multiple Range Test

การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

นำอิมัลชันที่ได้จากการผสมระหว่างมอลโตเดกซ์ตรินกับน้ำมันปลาสวายเพาะไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งด้วยเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ใช้ระยะเวลาในการทำแห้งนาน 48 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นนำไมโครแคปซูลน้ำมันปลาสวายเพาะที่ได้เก็บในขวดโหลทึบแสงแล้วนำมาวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพและทางเคมี จากนั้นหาค่าเฉลี่ย

นำตัวอย่างแคปซูลของน้ำมันปลาสายเพาะทั้ง 2 วิธี มาวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพและเคมี

การวิเคราะห์ทางกายภาพ

- วิเคราะห์ลักษณะ โครงสร้างพื้นผิวภายนอกด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด กำลังขยาย 500 เท่า และ 2,500 เท่า ใช้พลังงานเร่งอิเล็กตรอน 15 Kv ภายใต้ระบบสุญญากาศ 4.5 Psi. (Klinkesorn et al., 2006) โดยนำไมโครแคปซูลตัดขวางบนแท่นตัวอย่าง (Specimen stubs) ด้วยเทปคาร์บอนสองหน้าจากนั้นเคลือบตัวอย่างด้วยทอง แล้วนำไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

- วัดค่าสีโดยใช้เครื่องวิเคราะห์ค่าสี ระบบ Hunter แสดงผลออกมาเป็น $L^* a^* b^*$ โดยนำตัวอย่างของไมโครแคปซูลผงจากวิธีการอบแห้ง แบบพ่นฝอยทั้งอุณหภูมิ 3 ระดับและการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง หาค่าเฉลี่ยและวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล

- วิเคราะห์อุณหภูมิการเกิดกลาสทรานซิชัน โดยใช้ เครื่อง Differential Scanning Calorimeter (DSC) โดยทำการสอบเทียบอุณหภูมิ (calibrate) โดยใช้ indium เป็นตัวปรับมาตรฐาน คำนวณพื้นที่ใต้กราฟโดย indium จะมี ΔH เท่ากับ 28.450 จูลต่อกรัมและมีอุณหภูมิ 156.6 องศาเซลเซียส ค่าที่คำนวณได้ไม่ควรต่างจากมาตรฐานเกิน 1 เปอร์เซ็นต์ สภาวะที่ต้องควบคุมตามวิธีการของ Anna Millqvist-Fureby (2002) โดยนำตัวอย่าง 4 มิลลิกรัม ใส่ลงไปใน pan ขนาด 40 ไมโครลิตร ตั้งโปรแกรมโดยเริ่มที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วเพิ่มความร้อนเป็น 90 องศาเซลเซียส ที่ระดับอัตราการความเร็ว 5 องศาเซลเซียสต่อนาทีแล้วคงที่ระดับอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที หลังจากนั้นทำให้เย็นลง 0 องศาเซลเซียส ที่ระดับอัตราการความเร็ว 20 องศาเซลเซียสต่อนาทีแล้ววิเคราะห์จุดหลอมเหลวจาก เทอร์โมแกรมโดยใช้โปรแกรม Pyris 1 Data software เช่นเดียวกับตอนที่ 3.4.1

การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี

- ปริมาณความชื้นตามวิธีการของ Baik *et al.* (2004)
- ค่าวอเตอร์แอกทิวิตี (a_w) โดยใช้ Water Activity meter
- ประสิทธิภาพของการกักเก็บน้ำมันปลาในแคปซูล (Encapsulation Efficiency) ตามวิธีการของ Klinkesorn *et al.* (2006) โดยวิเคราะห์ดังต่อไปนี้

Extraction of free oil (FO)

ซั่งแคปซูลผงน้ำมันปลาสวายเฝาะ 2.5 กรัม เติมเฮกเซน 15 มิลลิลิตร ด้วยเครื่อง Vortex เป็นเวลา 2 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงแยกสารที่ระดับความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที กรองเอาส่วนข้างบนออกด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 ล้างกระดาษกรองด้วยเฮกเซน นำของเหลวที่ได้ไปทำการระเหยที่ระดับ 70 องศาเซลเซียส สังเกตจนเฮกเซนระเหยหมดจากนั้นนำเข้าไปเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 100 เซลเซียส จนน้ำหนักคงที่แล้วทำการบันทึกผล คำนวณเปอร์เซ็นต์น้ำมันอิสระตามสูตร

$$\text{Free oil (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{[(\text{น้ำหนักเริ่มต้น} - \text{น้ำหนักสุดท้าย}) \times 100]}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}}$$

Extraction of encapsulated oil (EO)

ซั่งแคปซูลผงน้ำมันปลาสวายเฝาะ ที่ผ่านการสกัดน้ำมันอิสระด้วยเฮกเซน 2.5 กรัม เติม acetate buffer (pH 3.0) 2 มิลลิลิตร ผสมด้วยเครื่องเป็นเวลา 1 นาที เตรียม hexane/isopropanol (3:1 v/v) 25 ml เทใส่ลงในตัวอย่างทำการผสมด้วยเครื่อง Vortex เป็นเวลา 7 นาที นำไปเหวี่ยงที่ระดับความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที กรองเอาส่วนข้างบนออกด้วยกระดาษกรองและสารดูดน้ำ ล้างกระดาษกรองด้วยเฮกเซนนำของเหลวที่ได้ไปทำการระเหยที่ระดับอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส จนเฮกเซนระเหยหมดจากนั้นนำไปเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่แล้วทำการบันทึกผลคำนวณเปอร์เซ็นต์น้ำมันอิสระตามสูตร

$$\text{Encapsulated oil (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{[(\text{น้ำหนักเริ่มต้น} - \text{น้ำหนักสุดท้าย}) \times 100]}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}}$$

Total oil (TO)

เป็นผลรวมของ Free oil (เปอร์เซ็นต์) และ Encapsulated oil (เปอร์เซ็นต์)

Microencapsulation Efficiency (EE)

นำปริมาณของน้ำมันที่ผิวและน้ำมันทั้งหมดมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของประสิทธิภาพการกักเก็บตามสูตร

$$\text{EE (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{[\text{Encapsulated oil (กรัม/100 กรัม powder)}]}{[\text{Total oil (กรัม/100 กรัม powder)}]} \times 100$$

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพระหว่างการรักษา

นำแคปซูลผงน้ำมันปลาสวายเผาที่ดีที่สุดจากวิธีการอบแห้งแบบพ่นฝอยหรือการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งมาเก็บรักษาในโถแก้วที่แห้งสะอาดและหุ้มกระดาษฟลอยด์มีฝาปิดที่สนิทเก็บไว้ในอุณหภูมิห้อง (ประมาณ 25-35 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 60 วัน โดยมีการสุ่มตัวอย่างมาตรวจทุก 15 วัน โดยทำการวิเคราะห์ดังนี้

1. วิเคราะห์ปริมาณน้ำมันอิสระ
2. วิเคราะห์น้ำมันที่ถูกห่อหุ้ม
3. วิเคราะห์ประสิทธิภาพการกักเก็บ
4. วิเคราะห์ลักษณะโครงสร้างพื้นผิวภายนอก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
 Copyright© by Chiang Mai University
 All rights reserved