

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

วัตถุดิบ

1. เปลือกกุ้งขาว (*Penaeus merguensis*) จากโรงงานแปรรูปกุ้ง อ. ศรีราชา จ. ชลบุรี นำมาล้างทำความสะอาดและคัดแยกเอาเนื้อกุ้ง ส่วนหัว ส่วนขา รวมทั้งสิ่งสกปรกต่าง ๆ ออก แล้วอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บในถุงพลาสติกมัดปากถุงที่อุณหภูมิห้อง
2. น้ำมันถั่วเหลือง (ตราอรุณ, บริษัท น้ำมันพืชไทย จำกัด (มหาชน) จ. นครปฐม)
3. สีสังเคราะห์ในรูปผง Brilliant Blue FCF ($C_{37}H_{34}N_2Na_2O_9S_3$) (AR Grade, Fluka, Switzerland)

วัสดุอุปกรณ์

1. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectronic, Spectronic Genesys 5, U.S.A.)
2. เครื่องชั่งชนิดละเอียด (Sartorius, AC 2115-00MA, Germany)
3. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (Hermle, Z 323 K, Germany)
4. เครื่องบดขนาด (Dietz, Retsch Muhle, Germany)
5. เครื่องบดละเอียด (Centrifugal Mill) (Retsch Ultra, ZM 1000, Germany)
6. เครื่องวัดพีเอช (Eutech Cybernetics, Cyberscan pH1000, Singapore)
7. เครื่องนึ่งความดันไอน้ำ (Hiramaya, Hiclave HV-85, Japan)
8. ตู้อบลมร้อนแบบถาด (Permat N003, Germany)
9. ตู้อบลมร้อน (Memmert, ULE 600, Germany)
10. เครื่องผสม (Vortex Mixer)
11. เครื่องศึกษาถังปฏิกรณ์เคมี (Chemical Reactor Teaching Equipment) (CE6/7/8, Leybold Didactic, Germany)
11. เครื่องปั่น (Homogenizer) (Polytron, PT2000, Switzerland)
12. เครื่องกวนแม่เหล็ก (m21/1, Framo-Geratetechnik, France)
13. เครื่องวิเคราะห์ความชื้น (Sartorius, MA30, Germany)
14. เครื่องวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Buchi, 323, Switzerland)

15. เครื่องวัดความหนืด (Brookfield, DV-III, U.S.A)
16. เครื่องเขย่า (Platform Shaker) (New Brunswick Scientific, Innova 2050, U.S.A.)
17. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Heto, CB-22-20-FL, Denmark)
18. เต้าเผา (Carbolite, RWF 1200, England)
19. โถดูดความชื้น (Desiccator)
20. เครื่องแก้ววัดความหนืด (Cole-Parmer Ubbelohde Viscometer ขนาด 0B)
21. หลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 50 มิลลิลิตร (Centrifuge Tube)
22. หลอดทดลองชนิดฝาเกลียวขนาด 50 มิลลิลิตร (Screw Capped Test Tube) (Kimax, U.S.A.)
23. ขวดพลาสติกปากกว้างขนาด 1000 มิลลิลิตร (Plastic Bottle Wide Mouth) (Polypropylene, LP94205, Italy)
24. ถ้วยกระเบื้อง (Crucible)
25. เครื่องแก้ว ได้แก่ ปีกเกอร์ ขวดรูปชมพู่ กระบอกตวง และขวดปรับปริมาตร เป็นต้น

สารเคมี

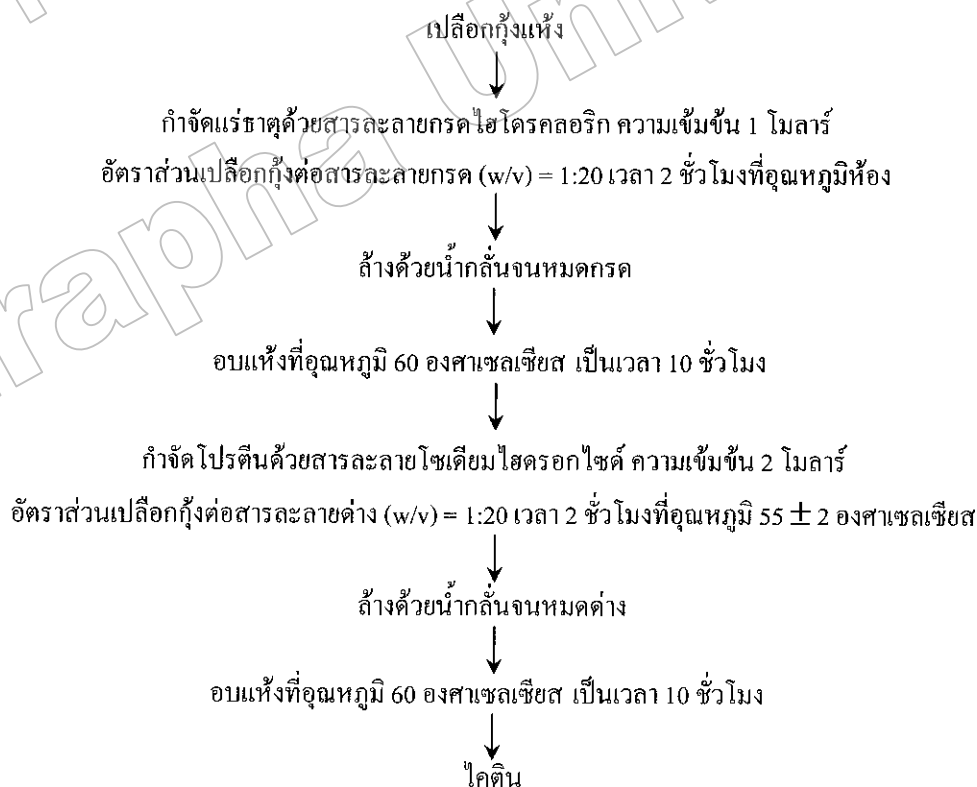
1. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) (Commercial Grade, Merck Darmstadt, Germany)
2. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) (Commercial Grade, Merck Darmstadt, Germany)
3. กรดอะซิติก (CH₃COOH) (AR Grade, Merck Darmstadt, Germany)
4. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) (AR Grade, Merck Darmstadt, Germany)
5. ตะกั่วผสม (Selenium Mixture) (AR Grade, Merck Darmstadt, Germany)
6. กรดกำมะถันเข้มข้น (H₂SO₄) (AR Grade, Merck Darmstadt, Germany)
7. เซียร์อินดิเคเตอร์ (Sher Indicator) (Buchi, Switzerland)
8. กรดบอริก (H₃BO₃) (AR Grade, Merck Darmstadt, Germany)
9. สารละลายโพแทสเซียมโพลีไวนิลซัลเฟต (N/400 Potassium Polyvinyl Sulfate, PVSK) (AR Grade, Wako, Japan)
10. โทลูไคอินบลู (Toluidine Blue) (AR Grade, Fluka, Switzerland)
11. 1-n-Hexadecylpyridinium Chloride Monohydrate (CPC) (AR Grade, Fluka, Switzerland)

วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมไคติน

เตรียมไคตินโดยวิธีของเขาวภา ไหวพริบ (2534) และเขาวภา ไหวพริบ และคณะ (2534) โดยมีขั้นตอนการเตรียมดังนี้

1. กำจัดแร่ธาตุโดยนำเปลือกกุ้งขาวตากแห้งน้ำหนัก 15 กิโลกรัม มาสกัดด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 โมลาร์ อัตราส่วนเปลือกกุ้ง ต่อสารละลายกรด (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) เป็น 1:20 กวนเป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วยน้ำกลั่นจนหมดกรด แล้วนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลาประมาณ 10 ชั่วโมง และชั่งน้ำหนัก
2. กำจัดโปรตีน โดยนำเปลือกกุ้งที่ผ่านกระบวนการกำจัดแร่ธาตุแล้วมาสกัดด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์ อัตราส่วนเปลือกกุ้งต่อสารละลายด่าง (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) เป็น 1:20 กวนเป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 55 ± 2 องศาเซลเซียส ล้างด้วยน้ำกลั่นจนหมดด่าง แล้วนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลาประมาณ 10 ชั่วโมง และชั่งน้ำหนัก สรุปขั้นตอนการเตรียมไคตินแสดงได้ดังภาพที่ 3-1



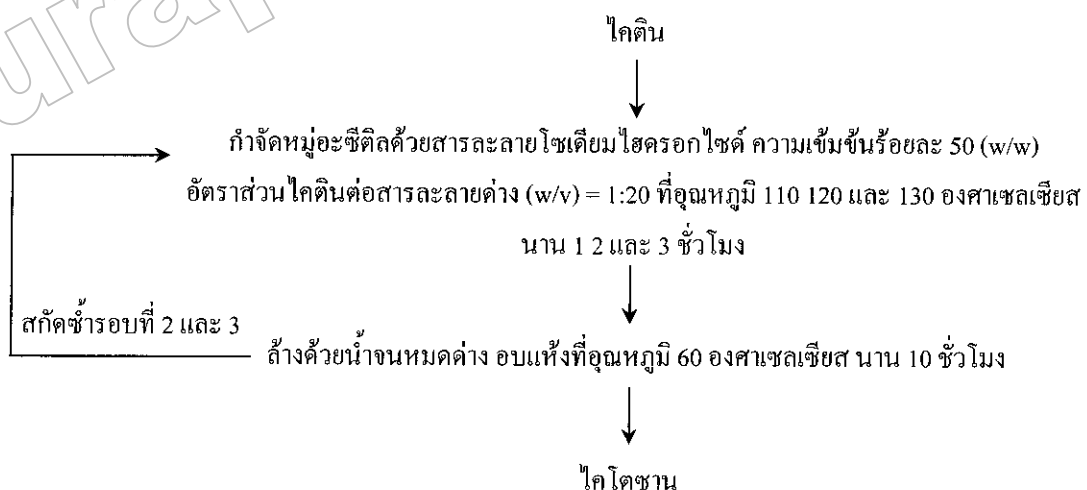
ภาพที่ 3-1 ขั้นตอนการเตรียมไคติน (เขาวภา ไหวพริบ, 2534; เขาวภา ไหวพริบ และคณะ, 2534)

การเตรียมไคโตซาน

กระบวนการเตรียมไคโตซานมีขั้นตอนดังนี้

1. ชั่งไคตินน้ำหนัก 20 กรัม ใส่ลงในขวดพลาสติกขนาด 1 ลิตร เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 50 โดยน้ำหนัก อัตราส่วนไคตินต่อสารละลาย 1:20 ปิดฝาขวด โดยคลายเกลียวเล็กน้อย
2. ใส่ขวดพลาสติกลงในเครื่องนึ่งความดัน ใส่น้ำตั้งอุณหภูมิที่ 110 120 และ 130 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 2 และ 3 ชั่วโมง
3. นำไคโตซานที่ได้มาล้างด้วยน้ำจนหมดค้าง อบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 ชั่วโมง แล้วชั่งน้ำหนักไคโตซานที่เตรียมได้
4. นำไคโตซานที่ล้างและอบแห้งแล้วมาทำจัดหมู่อะซิติลซัลเฟอร์ที่ 2 และ 3 ที่อุณหภูมิ 110 120 และ 130 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 2 และ 3 ชั่วโมง นำไคโตซานที่ได้จากการสกัดซัลเฟอร์ล้างด้วยน้ำจนหมดค้าง อบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 ชั่วโมง แล้วชั่งน้ำหนักไคโตซานที่เตรียมได้ สรุปขั้นตอนการเตรียมไคโตซานแสดงได้ดังภาพที่ 3-2
5. คำนวณหาค่าปริมาณไคโตซานที่ผลิตได้ (%Yield) โดยวิธีการคำนวณแสดงได้ดังสมการที่ (3-1)

$$\text{ปริมาณไคโตซานที่ผลิตได้ (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักของไคโตซานที่ได้}}{\text{น้ำหนักของไคตินที่ใช้}} \times 100 \quad (3-1)$$



ภาพที่ 3-2 ขั้นตอนการเตรียมไคโตซาน

การวิเคราะห์สมบัติทางเคมีกายภาพของโคโตซาน

1. ระดับการกำจัดหมู่อะซีทิล (Degree of Deacetylation, %DD)

วิเคราะห์ระดับการกำจัดหมู่อะซีทิลโดยวิธี Colloid Titration ของ มงคล สุขวัฒนาสินธิ์ (2544) รายละเอียดแสดงได้ดังภาคผนวก ก-1

2. ความหนืด (Viscosity)

วิเคราะห์ความหนืดโดยวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ No et al. (2000) รายละเอียดแสดงได้ดังภาคผนวก ก-2

3. น้ำหนักโมเลกุล (Molecular Weight)

วิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโดยวิธี Intrinsic Viscosity ของ วิภาวี โสเว่น (2544) และ Maghami and Robert (1988) รายละเอียดแสดงได้ดัง ภาคผนวก ก-3

4. ความเป็นกรดต่าง (pH)

วิเคราะห์ความเป็นกรดต่างโดยวิธีของ สุวบุญ จิรชาอุชัย และคณะ (2544) ดังนี้ เตรียมสารละลายโคโตซานความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรในน้ำกลั่นแล้ว ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง ก่อนวัดค่าความเป็นกรดต่างด้วยเครื่องวัดพีเอช

5. ความหนาแน่น (Bulk Density)

วิเคราะห์ความหนาแน่นโดยวิธีของ Cho et al. (1998) ดังนี้ ชั่งโคโตซานที่ผ่านการบดให้ได้ขนาด 0.2 มิลลิเมตร น้ำหนัก 1 กรัม ใส่ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 15 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่องผสมเป็นเวลา 1 นาที แล้วคาที่ปากหลอด 10 ครั้ง บันทึกปริมาตรของโคโตซาน รายงานผลเป็นหน่วยกรัมต่อมิลลิลิตรของตัวอย่าง

6. ปริมาณความชื้น (%Moisture)

วิเคราะห์ปริมาณความชื้นโดยวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ AOAC ข้อ 930.15 (AOAC, 1990) ดังนี้

ชั่งใช้ตัวอย่างโคโตซาน ประมาณ 2 กรัม ลงบนถาดของเครื่องวิเคราะห์ความชื้น ตั้งอุณหภูมิเครื่องที่ 105 องศาเซลเซียส อ่านค่าความชื้นในตัวอย่างเป็นร้อยละ

7. ปริมาณเถ้า (%Ash)

วิเคราะห์ปริมาณเถ้าโดยวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ AOAC ข้อ 942.05 (AOAC, 1990) รายละเอียดแสดงได้ดังภาคผนวก ก-4

8. ปริมาณไนโตรเจน (%N)

วิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนโดยวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ AOAC ข้อ 976.05 (AOAC, 1990) รายละเอียดแสดงได้ดังภาคผนวก ก-5

การวิเคราะห์สมบัติการใช้งานของไคโตซาน

1. ความสามารถในการจับสีย้อม (Dye Binding Capacity)

วิเคราะห์ความสามารถการจับสีย้อม โดยการวิเคราะห์ไอโซเทอร์มของการดูดซับ (Adsorption Isotherm) ตามแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของแลงเมอว์ (Langmuir Isotherm Equation) เพื่อหาค่าปริมาณการดูดซับสูงสุด (q_{max}) และค่าคงที่สมดุลของการดูดซับ (b) (Tongta, Liapis, & Siehr, 1994) รายละเอียดแสดงได้ดังภาคผนวก ข-1

2. ความสามารถในการจับไขมัน (Fat Binding Capacity)

วิเคราะห์ความสามารถการจับไขมัน โดยวิธีของ No et al. (2000) รายละเอียดแสดงได้ดังภาคผนวก ข-2

3. ความสามารถในการจับน้ำ (Water Binding Capacity)

วิเคราะห์ความสามารถการจับน้ำโดยวิธีของ No et al. (2000) รายละเอียดแสดงได้ดังภาคผนวก ข-3

4. ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ (Emulsifying Capacity)

วิเคราะห์ความสามารถการเป็นอิมัลซิไฟเออร์โดยวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Del Blanco et al. (1999) โดยการวัดการเปลี่ยนแปลงของค่าการนำไฟฟ้าชั้นบนของสารละลายอิมัลชันตามเวลา รายละเอียดแสดงได้ดังภาคผนวก ข-4

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

1. แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ Factorial Design $3 \times 3 \times 3$ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยมีปัจจัยที่ใช้ในการทำปฏิกิริยากำจัดหมู่อะซีทิลของไคติน 3 ปัจจัย ได้แก่

- 1.1 อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด 3 ระดับ คือ 110 120 และ 130 องศาเซลเซียส
- 1.2 จำนวนรอบในการสกัด 3 ระดับ คือ 1 2 และ 3 รอบ
- 1.3 เวลาที่ใช้ในการสกัด 3 ระดับ คือ 1 2 และ 3 ชั่วโมง

2. วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance; ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (Walpole & Myers, 1993)

3. วิเคราะห์สหสัมพันธ์ (Correlation) ของสมบัติทางเคมีกายภาพ และสหสัมพันธ์ระหว่างสมบัติทางเคมีกายภาพกับสมบัติการใช้งาน โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS (Statistical Analysis System) Version 6.12 (SAS Institute Cary, North Carolina USA)