บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้เป็นการวิจัยเชิงทดลอง มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการสังเคราะห์กลีเซอรอล โมโนลอเรทจากปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีสของน้ำมันมะพร้าวกับกลีเซอรอลดิบ โดยการเร่งปฏิกิริยาของไลเปสจากยางมะละกอ และเพื่อเปรียบเทียบร้อยละผลผลิตของกลีเซอรอล โมโนลอเรท ที่สังเคราะห์ได้จากกลีเซอโรไลซีสของน้ำมันมะพร้าวกับกลีเซอรอลดิบ และที่ได้จากกลีเซอโรไลซีสของน้ำมันมะพร้าวกับกลีเซอรอลบริสุทธิ์ ซึ่งผู้วิจัยได้ดำเนินการตามขั้นตอนดังนี้

1. การเก็บยางมะละกอ
2. การเตรียมเอนไซม์ไลเปสจากยางมะละกอ
3. การตรวจสอบคุณสมบัติของไลเปสจากยางมะละกอ
4. การสกัดน้ำมันจากมะพร้าวโดยวิธีบีบเย็น
5. การวิเคราะห์องค์ประกอบและคุณสมบัติทางเคมีบางประการของน้ำมันมะพร้าว
6. การทำกลีเซอรอลดิบให้บริสุทธิ์
7. การตรวจสอบองค์ประกอบของกลีเซอรอลดิบที่รวบรวมได้ก่อน และ หลังทำให้บริสุทธิ์
8. ตรวจสอบกลีเซอโรไลซีสของน้ำมันมะพร้าวกับกลีเซอรอลดิบที่เตรียมได้
9. การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อกลีเซอโรไลซีสของกลีเซอรอลดิบ
10. การแยกองค์ประกอบของสารผลิตภัณฑ์ด้วยวิธีทินแลเออร์โครมาโตกราฟี
11. การวิเคราะห์ปริมาณของผลิตภัณฑ์โดย colorimetric method
12. การวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมันมะพร้าวและผลิตภัณฑ์ด้วยวิธี GC-MS
13. เปรียบเทียบผลผลิตของกลีเซอรอล โมโนลอเรทจากกลีเซอโรไลซีสของน้ำมันมะพร้าวและกลีเซอรอลดิบ กับ ผลผลิตของกลีเซอรอล โมโนลอเรทจากกลีเซอโรไลซีสของน้ำมันมะพร้าวและกลีเซอรอลบริสุทธิ์

การเก็บยางมะละกอ

การเก็บน้ำยางมะละกอทำได้โดยกรีดผลมะละกอดิบจากขั้วผลจนถึงปลายผล โดยกรีดจากผลที่ติดอยู่บนต้น ผลละประมาณ 4-6 แผล ลึกประมาณ 1-2 มิลลิเมตร รองรับน้ำยางด้วยผ้ายางพลาสติกที่ปูรอบต้นยาง และกวาดน้ำยางทุกส่วน (ที่แห้งติดอยู่ที่ผลและที่อยู่บนผ้ายางพลาสติก) ลงในกระปุกพลาสติก ปิดฝาให้แน่น นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °ซ จนกว่าจะใช้งาน

การเตรียมเอนไซม์ไลเปสจากยางมะละกอ

นำยางมะละกอ 500 กรัม ซึ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °ซ มาตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้ยางละลาย แล้วกรองน้ำยางด้วยตะแกรงร่อน เพื่อกำจัดสิ่งปนเปื้อนที่เกิดขึ้นจากขั้นตอนการเก็บ นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ (Centrifuge) ด้วยแรงเหวี่ยง 9,500×g ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 15 นาที แยกส่วนของสารละลายทิ้งไป ส่วนตะกอนที่ได้ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้งๆ ละ 100 มิลลิลิตร เทตะกอนลงบนถาดพลาสติกแล้วเกลี่ยตะกอนให้กระจายอย่างบางๆ ไปทั่วถาด จากนั้นนำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 50 °ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำถาดพลาสติกออกจากตู้อบปล่อยให้ถาดเย็น ขูดตะกอนแห้งที่ได้แล้วเก็บไว้ในขวดพลาสติกที่แห้งแล้วปิดฝาให้สนิท บันทึกน้ำหนักของตะกอนแห้งที่ได้ และเก็บไว้ใช้เป็นเอนไซม์ไลเปส ที่อุณหภูมิ -20 °ซ จนกว่าจะใช้งาน

การตรวจสอบคุณสมบัติของไลเปสจากยางมะละกอ

การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีกายภาพเบื้องต้นของเอนไซม์ไลเปสจากยางมะละกอ ผู้วิจัยได้ดำเนินการดังนี้

1. การหาค่าปริมาณความจุน้ำ

การหาค่าปริมาณความจุน้ำ (Water Content, C_W) ของไลเปสทำได้โดยใช้เครื่อง Karl-Fischer Coulometer (684 KF, Metrohm) โดยเปิดสวิทซ์ตู้อบของเครื่องและตั้งอุณหภูมิเตาอบไว้ที่ 150 °ซ และเวลาในการไตเตรท 30 นาที ปรับอัตราการไหลของแก๊สไนโตรเจนบริสุทธิ์ในระบบให้เห็นฟองแก๊สเกิดขึ้นในขวดสารละลาย Karl-Fischer (Hydranal Coulomat AG, Riedel 3483 และ Hydranal Coulometer CG, Riedel 3484, Metrohm) ให้อยู่ในช่วง 10-15 ฟองต่อวินาที ชั่งไลเปสแห้งจากยางมะละกอ 0.20 กรัม ลงในถ้วยใส่สารตัวอย่าง แล้วนำเข้าไปไว้ในตู้อบของ Karl-Fischer Coulometer ที่ 150 °ซ น้ำที่มีอยู่ในเอนไซม์ไลเปสจะระเหยกลายเป็นไอน้ำแก๊สไนโตรเจนจะนำไอน้ำนี้ออกจากเตาอบไปยังภาชนะที่มีสารละลาย Karl-Fischer และไตเตรทหาปริมาณน้ำ ซึ่งจะปรากฏผลบนหน้าปัดของเครื่องควบคุมในหน่วยไมโครกรัม ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้งในแต่ละตัวอย่าง แล้วนำไปคำนวณหาปริมาณความจุน้ำในหน่วยร้อยละของน้ำหนักเอนไซม์โดยใช้ความสัมพันธ์ดังนี้ คือ

$$\text{ปริมาณความจุน้ำ หรือ } C_w\ (\%) = \frac{\text{น้ำหนักน้ำที่อ่านได้จากเครื่อง (ไมโครกรัม)} \times 10^{-4}}{\text{น้ำหนักของเอนไซม์ที่ใช้ (กรัม)}}$$

2. การหาค่าปริมาณน้ำอิสระ

การหาค่าปริมาณน้ำอิสระของเอนไซม์ (Water Activity, a_w) ทำได้โดยใช้เครื่องวัดความชื้น (Thermoconstanter Humidat TH2, Novasina) ปรับมาตรฐานของเครื่องวัดความชื้นด้วยเกลือมาตรฐานที่มีค่าปริมาณน้ำอิสระใกล้เคียงกับสารตัวอย่าง ซึ่งในการทดลองนี้ได้ใช้สารมาตรฐานเกลือลิเธียมคลอไรด์ (LiCl, a_w = 0.11) การปรับมาตรฐานของเครื่องทำได้โดยปรับอุณหภูมิของเครื่องให้เท่ากับ 25 °ซ นำถ้วยบรรจุลิเธียมคลอไรด์ใส่ลงในช่องใส่สารตัวอย่าง ปิดฝาเครื่อง ปรับเครื่องให้อ่านค่าความชื้นสัมพัทธ์ให้ได้ 11.3 แล้วนำเอาถ้วยลิเธียมคลอไรด์ออกจากเครื่อง ใส่ถ้วยที่บรรจุไลเปส (ประมาณ 100 มิลลิกรัม) ใส่ลงในช่องใส่สารตัวอย่าง ปิดฝาเครื่อง อ่านค่าความชื้นสัมพัทธ์ทุก ๆ 10 นาที จนค่าที่ได้คงที่ ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้งในแต่ละตัวอย่าง คำนวณค่าปริมาณน้ำอิสระของไลเปสแห้งได้โดยใช้ความสัมพันธ์ดังนี้

ปริมาณน้ำอิสระ = ความชื้นสัมพัทธ์/ 100

3. การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากยางมะละกอ

การศึกษากิจกรรม (Activity) ในการเร่งปฏิกิริยาการสลายน้ำมันของไลเปสจากยางมะละกอทำได้โดยผสมน้ำมันมะพร้าว 0.20 มิลลิลิตร เข้ากับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.10 โมลาร์ ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.15 โมลาร์อยู่ด้วย พีเอช 7.4 ปริมาตร 4.00 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดแต่ละใบ จำนวน 2 ใบๆ แรกนำมาเติมไลเปสจากยางมะละกอ 3 มิลลิกรัม ส่วนใบที่สองไม่ต้องเติมเอนไซม์ซึ่งใช้เป็นสารละลายเปรียบเทียบ นำสารละลายผสมในขวดทั้งสองใบไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 °ซ โดยเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นปรับพีเอชของสารละลายให้เท่ากับ 1-2 ด้วย 6 โมลาร์ กรดไฮโดรคลอริก แล้วเติมไลเปสจากยางมะละกอ 3 มิลลิกรัม ลงในขวดใบที่สอง จากนั้นเติมไอโซออกเทน 5 มิลลิลิตร ลงในขวดแต่ละใบ ผสมสารด้วยเครื่องผสมสารละลาย (Vortex Mixer) นำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที แยกสารละลายชั้นบนซึ่งเป็นชั้นของไอโซออกเทนออกไปผสมกับ 1 มิลลิลิตร ของสารละลายคอปเปอร์ (สารละลายของคิวปริคอะซีเตท 12.50 กรัม ในน้ำ 200 มิลลิลิตร และปรับพีเอชให้เท่ากับ 6.1 ด้วยไพริดิน แล้วเติมน้ำให้ครบ 250 มิลลิลิตร) แยกสารละลายชั้นบนไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 715 นาโนเมตร (A_{715}) โดยใช้สารละลายในขวดใบที่ 2 เป็นตัวเปรียบเทียบ นำค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้จากเครื่องไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดลอริก ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้งในแต่ละตัวอย่าง แล้วนำปริมาณกรดลอริกที่ได้ไปคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสโดยกำหนดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเป็นหน่วยต่อมิลลิกรัม (Unit/mg; U/mg) ซึ่ง 1 U/mg หมายถึง ปริมาณของกรดลอริกที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสจำนวน 1 ไมโครโมล ภายในเวลา 1 นาที เมื่อใช้เอนไซม์ไลเปสปริมาณ 1 มิลลิกรัม ภายใต้สภาวะที่ทำการศึกษา

การเตรียมกราฟมาตรฐานของกรดไขมันทำโดยผสมกรดลอริก 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตรต่างๆกันเข้ากับไอโซออกเทน ให้ได้ปริมาตรรวม 2.50 มิลลิลิตร เติมสารละลายคอปเปอร์ 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วดูดสารละลายชั้นบนไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 715 นาโนเมตร โดยใช้ไอโซออกเทนเป็นตัวเปรียบเทียบ นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟมาตรฐานของกรดลอริก โดยกำหนดให้ความเข้มข้นของกรดลอริกเป็นแกนนอน และ A_{715} กำหนดให้เป็นแกนตั้ง

4. การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาย่อยสลายน้ำมันมะพร้าว

การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาย่อยสลายน้ำมันมะพร้าวของไลเปสจากยางมะละกอทำได้โดยเตรียมสารละลายผสมที่ประกอบด้วยน้ำมันมะพร้าว 0.20 มิลลิลิตร และสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.10 โมลาร์ ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.15 โมลาร์อยู่ด้วย พีเอช 7.4 ปริมาตร 4.0 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ 2 ใบ นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 55 °ซ เป็นเวลา 10 นาที เติมไลเปสจากยางมะละกอ 3 มิลลิกรัม ลงไปในขวดรูปชมพู่ใบแรก บ่มขวดรูปชมพู่ทั้งสองใบต่อไปที่อุณหภูมิเดิมเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ พร้อมทั้งเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที จากนั้นปรับพีเอชของสารละลายให้เท่ากับ 1-2 ด้วย 6 โมลาร์ กรดไฮโดรคลอริก แล้วเติมไลเปสจากยางมะละกอ 3 มิลลิกรัม ลงในขวดรูปชมพู่ใบที่สอง จากนั้นเติมไอโซออกเทน 5 มิลลิลิตร ลงในขวดแต่ละใบ ผสมสารด้วยเครื่องผสมสารละลาย นำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที แยกสารละลายชั้นบนซึ่งเป็นชั้นของไอโซออกเทนออกไปผสมกับ 1 มิลลิลิตรของสารละลายคอปเปอร์ แยกสารละลายชั้นบนไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 715 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายจากขวดรูปชมพู่ใบที่สองเป็นตัวเปรียบเทียบ นำค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้จากเครื่องไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดไขมัน แล้วนำปริมาณกรดไขมันที่ได้ไปคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส ทำการทดลองซ้ำอีก 2 ครั้ง ในขณะเดียวกันทำการศึกษาที่อุณหภูมิอื่นๆควบคู่กันไป ได้แก่ อุณหภูมิ 30, 37, 40, 45, 50 และ 60 °ซ

5. การศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาย่อยสลายน้ำมันมะพร้าว

การศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาย่อยสลายน้ำมันมะพร้าว ทำได้โดยเตรียมขวดรูปชมพู่ 2 ใบ แต่ละใบประกอบด้วยสารละลายผสมของน้ำมันมะพร้าว 0.20 มิลลิลิตรกับสารละลายอะซีเตตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.10 โมลาร์ ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.15 โมลาร์อยู่ด้วย ที่พีเอช 5 ปริมาตร 4.0 มิลลิลิตร เติมไลเปสจากยางมะละกอ 3 มิลลิกรัม ลงในขวดใบแรกเพื่อเริ่มปฏิกิริยา นำสารละลายทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 °ซ ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ พร้อมทั้งเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นปรับพีเอชของสารละลายให้เท่ากับ 1-2 ด้วย 6 โมลาร์ ของกรดไฮโดรคลอริก แล้วเติมไลเปสจากยางมะละกอ 3 มิลลิกรัม ลงในขวดใบที่สอง จากนั้นเติมไอโซออกเทน 5 มิลลิลิตร ลงในขวดแต่ละใบ ผสมสารด้วยเครื่องผสมสารละลาย นำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที แยกสารละลายชั้นบนซึ่งเป็นชั้นของไอโซออกเทนออกไปผสมกับ 1 มิลลิลิตรของสารละลายคอปเปอร์ แยกสารละลายชั้นบนไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 715 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายจากขวดใบที่สองเป็นตัวเปรียบเทียบ นำค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้จากเครื่องไป

เทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดลอริก แล้วนำปริมาณกรดไขมันที่ได้ไปคำนวณหาความสามารถของเอนไซม์ไลเปส ทำการทดลองซ้ำอีก 2 ครั้ง ในขณะเดียวกันทำการศึกษาที่พีเอชอื่นควบคู่กันไป โดยใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.10 โมลาร์ ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0.15 โมลาร์ อยู่ด้วย พีเอช 6, 7 ทรีส-ไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์พีเอช 8, 9 และ 10 ปริมาตร 4.0 มิลลิลิตร แทนสารละลายอะซีเตตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.10โมลาร์ ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0.15 โมลาร์ อยู่ด้วย ที่พีเอช 5

6. การตรวจสอบปริมาณโปรตีนของเอนไซม์ด้วยวิธีเจลดาล์

เนื่องจากเอนไซม์ไลเปสจากยางมะละกอไม่ละลายน้ำ จึงมีลักษณะคล้ายกับเอนไซม์ตรึง ดังนั้นจึงทำการตรวจสอบปริมาณโปรตีนด้วยวิธีเจลดาล์ (Kjeldahl) ทำได้ดังนี้คือ ชั่งตัวอย่างเอนไซม์ไลเปสจากยางมะละกอ 0.25 กรัม ใส่หลอดย่อยขนาด 250 มิลลิลิตร ใส่ตัวเร่งปฏิกิริยา (Kjelblet) จำนวน 1 เม็ด และกรดซัลฟูริกเข้มข้น 10 มิลลิลิตร นำตัวอย่างไปย่อยด้วยเครื่อง 2020 Digestion System ที่อุณหภูมิ 420 °ซ นาน 45 นาที ตั้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำตัวอย่างที่ผ่านการย่อยเข้าเครื่องกลั่น Kjeltec System 1026 Distilling Unit ใช้กรดบอริกที่เข้มข้นร้อยละ 2 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร และหยดอินดิเคเตอร์ 2- 3 หยด ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร กลั่นด้วยระบบอัตโนมัติซึ่งใช้เวลาประมาณ 3.5 นาที นำตัวอย่างที่ผ่านการกลั่นมาไตเตรตด้วยสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล ทำการทดลองซ้ำอีก 2 ครั้ง นำปริมาณสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกที่ใช้ในการไตเตรทไปคำนวณหาปริมาณไนโตรเจน แล้วคูณกับค่าคงที่ (Kjeldahl Factor) เพื่อแปลงเป็นค่าโปรตีนโดยใช้สมการ

$$\%\text{ไนโตรเจน (Total Nitrogen)} = \frac{(A-B) \times C \times 0.014 \times 100}{D}$$

$$\%\text{โปรตีน (Crude Protein)} = \%N \times 6.25$$

A = มิลลิลิตรของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก 0.1 นอร์มอล ที่ใช้ไตเตรทกับตัวอย่าง

B = มิลลิลิตรของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก 0.1 นอร์มอล ที่ใช้ไตเตรทกับตัวเปรียบเทียบ

C = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก

D = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

การสกัดน้ำมันจากมะพร้าวโดยวิธีบีบเย็น

การสกัดน้ำมันออกจากมะพร้าวโดยวิธีบีบเย็นทำโดย ใช้มะพร้าวขูด 1 กิโลกรัม ทำการคั้นเหมือนคั้นน้ำกะทิโดยไม่เติมน้ำ นำน้ำกะทิใส่ถุงพลาสติก นำไปแช่ในตู้เย็นช่องธรรมดา เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำออกมาจากตู้เย็นจะพบว่ากะทิแยกออกเป็น 2 ชั้น ชั้นบนเป็นครีม ส่วนชั้นล่างเป็นน้ำเปรี้ยว ทำการเจาะถุงเอาน้ำเปรี้ยวออก แล้วมัดรูที่เจาะด้วยยางรัดของ แล้วนำเข้าไปแช่ตู้เย็นในช่องแช่แข็ง แช่ไว้ประมาณ 2 วัน แล้วนำมาตั้งพักไว้ข้างนอกรอจนกระทั่งกะทิละลายจนหมด นำไปใส่ในกรวยแยก จะมองเห็นการแยกชั้นเป็น 3 ชั้น คือ 1) ชั้นบนสุดเป็นครีม 2) ชั้นกลางเป็นน้ำมันมะพร้าว และ 3) ชั้นล่างเป็นน้ำเปรี้ยว ทำการแยกสารละลายชั้นล่างทิ้งไป แล้วเก็บเฉพาะสารละลายในชั้นกลาง ซึ่งเป็นน้ำมันใสออกมา แล้วกรองด้วยผ้าขาวบางหลายๆชั้น จะได้น้ำมันมะพร้าวเก็บใส่ขวดที่แห้งแล้ว ปิดฝาให้สนิทเพื่อเก็บไว้ใช้งานต่อไป

การวิเคราะห์องค์ประกอบและคุณสมบัติทางเคมีบางประการของน้ำมันมะพร้าว

การวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมันมะพร้าวทำโดย ชั่งน้ำมันมะพร้าว 40 มิลลิกรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมสารละลายเมทานอลิกโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ให้ความร้อนแก่สารละลายผสมโดยใช้อ่างน้ำร้อนจนกระทั่งสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เติมโบรอนไตรฟลูโอไรด์-เมทานอล (BF_3-methanol) ปริมาตร 5 มิลลิลิตรลงไปในสารละลายผสมข้างต้น ต้มต่อไปประมาณ 2-3 นาที หยุดให้ความร้อน ตั้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเทสารละลายผสมทั้งหมดลงในกรวยแยกที่มีสารละลายผสมของเฮกเซน 25 มิลลิลิตร และสารละลายอิ่มตัวของโซเดียมคลอไรด์ 20 มิลลิลิตร เขย่าสารละลายผสมในกรวยแยกเบาๆ แล้วตั้งไว้ให้แยกเป็น 2 ชั้น แยกสารละลายในชั้นของเฮกเซนซึ่งเป็นชั้นบนและมีเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันอยู่ใส่ลงในบีกเกอร์ เติมแมกนีเซียมซัลเฟตแอนไฮดรัส 1 กรัม ลงไป เพื่อดูดน้ำที่เหลือออกจากสารละลาย กรองสารละลายด้วยกระดาษกรองเพื่อแยกแมกนีเซียมซัลเฟตออกไป นำสารละลายที่ได้ไประเหยเฮกเซนออกโดยใช้อ่างน้ำร้อน จนกระทั่งเหลือปริมาตรสารละลาย 0.50 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์หาชนิดของกรดไขมันด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี-แมสสเปคโตรมิเตอร์ ทำการทดลองซ้ำอีก 2 ครั้ง

การวิเคราะห์ค่าสปอนิฟิเคชันของน้ำมันมะพร้าวทำได้โดยชั่งน้ำมันมะพร้าว 2 กรัม ใส่ในขวดกลั่นที่แห้งและสะอาด เติมสารละลายแอลกอฮอลิกโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 0.5 นอร์มอล ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ทำการรีฟลักซ์สารละลายให้เดือดเบาๆนาน 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการไตเตรท

สารละลายด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.5 นอร์มอล โดยใช้ฟีนอฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ ทำการทดลองซ้ำอีก 2 ครั้ง นำไปคำนวณค่าสปอนิฟิเคชันดังนี้

$$\text{ค่าสปอนิฟิเคชัน} = \frac{(B-A) \times N \times 56.1}{W}$$

โดย B = ปริมาตรสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไตเตรทกับแบลงค์ (มิลลิลิตร)
A = ปริมาตรสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไตเตรทกับตัวอย่าง (มิลลิลิตร)
N = ความเข้มข้นของสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (นอร์มอล)
W = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

ค่าไอโอดีนในน้ำมันมะพร้าววิเคราะห์โดย ชั่งน้ำมันมะพร้าว 1 กรัม เติมคาร์บอนเตตระ-คลอไรด์ 15 มิลลิลิตร เขย่าให้น้ำมันละลาย เติมสารละลายวิจส์ 25 มิลลิลิตร เขย่าขวดให้สารละลายเข้ากัน นำไปเก็บไว้ในที่มืด 1-2 ชั่วโมง แล้วเติมสารละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์ปริมาณ 20 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 150 มิลลิลิตร นำไปไตเตรทด้วยสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต เข้มข้น 0.1 นอร์มอล จนได้สารละลายสีเหลืองอ่อน เติมน้ำแป้งลงไป 2-3 หยด สารละลายกลายเป็นสีน้ำเงิน นำไปไตเตรทต่อจนสีน้ำเงินหมดไป ทำการทดลองซ้ำอีก 2 ครั้ง นำไปคำนวณค่าไอโอดีน ดังสมการ

$$\text{ค่าไอโอดีน} = \frac{(B-A) \times N \times 12.69}{W}$$

โดย A = ปริมาตรของสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟตที่ใช้ไตเตรทกับตัวอย่าง (มิลลิลิตร)
B = ปริมาตรของสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟตที่ใช้ไตเตรทกับแบลงก์ (มิลลิลิตร)
N = ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต (นอร์มอล)
W = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

การทำกลีเซอรอลดิบให้บริสุทธิ์

ชั่งกลีเซอรอลดิบ 1 กิโลกรัม ซึ่งมีค่าพีเอชเริ่มต้น 11.85 ปรับค่าพีเอชของกลีเซอรอลดิบให้มีค่าเท่ากับ 2 ด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 1.19 โมลาร์ นำสารละลายทั้งหมดใส่ในกรวยแยก ตั้งไว้ให้สารละลายแยกออกเป็น 3 ชั้น คือ (1) ชั้นบนเป็นกรดไขมัน (2) ชั้นกลางเป็นชั้นของกลีเซอรอล และ (3) ชั้นล่างเป็นชั้นของสารอนินทรีย์ แยกสารละลายในชั้นล่างทิ้งไปแล้วแยกชั้นของกลีเซอรอลออกมาแล้วนำไปกรองด้วยกระดาษกรองโดยใช้ปั๊มสุญญากาศ จากนั้นปรับพีเอชของสารละลายที่ได้ให้

เท่ากับ 7 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 12.5 โมลาร์ นำไปต้มที่อุณหภูมิ 105 °ซ นาน 2 ชั่วโมง เพื่อระเหยน้ำที่เหลือออกไป แล้วกรองกลีเซอรอลที่ได้อีกครั้ง จากนั้นเติมเอทานอล 95 เปอร์เซนต์ ลงไปในกลีเซอรอลที่เตรียมได้ในอัตราส่วน 1 : 1 คนสารละลายให้เข้ากัน ตั้งไว้ให้แยกชั้น แล้วทำการแยกสารละลายกลีเซอรอลซึ่งอยู่ชั้นล่างออกมา นำไประเหยเอทานอลออกที่อุณหภูมิ 80 °ซ เป็นเวลา 20 นาที เก็บสารละลายกลีเซอรอลดิบหลังทำให้บริสุทธิ์ที่เตรียมได้ไว้ใช้งานในขั้นตอนต่อไป

การตรวจสอบองค์ประกอบของกลีเซอรอลดิบที่รวบรวมได้ก่อน และ หลังทำให้บริสุทธิ์

กลีเซอรอลดิบที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ได้จากการผลิตไบโอดีเซลโดยกระบวนการทรานส์-เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันที่ใช้แล้วซึ่งเร่งด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ของห้องปฏิบัติการเคมี มหาวิทยาลัยราชภัฏอุตรดิตถ์ ทำการตรวจสอบคุณสมบัติเบื้องต้น เช่น วัดค่าพีเอช วิเคราะห์ปริมาณกลีเซอรีนโดยวิธีไตเตรท วิเคราะห์เถ้า วิเคราะห์ปริมาณน้ำโดยวิธี Karl Fischer วิเคราะห์ความหนาแน่น และวิเคราะห์ความหนืด จากนั้นนำไปทำให้บริสุทธิ์แล้วตรวจสอบคุณสมบัติเบื้องต้นดังกล่าวอีกครั้งหนึ่ง

ตรวจสอบกลีเซอโรไลซีสของน้ำมันมะพร้าวกับกลีเซอรอลดิบที่เตรียมได้

สารละลายของปฏิกิริยาประกอบด้วยน้ำมันมะพร้าวที่กำจัดน้ำโดยใช้ molecular sieve 4A° ปริมาณ 20 กรัม ผสมกับกลีเซอรอลดิบที่เตรียมได้ปริมาณ 15 กรัม นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 40 °ซ ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ พร้อมกับเขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เริ่มปฏิกิริยาโดยการเติมเอนไซม์ไลเปสจากยางมะละกอปริมาณ 3 กรัม ทำปฏิกิริยาต่อไปเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างครั้งละ 0.3 มิลลิลิตร ที่เวลา 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ แล้วแยกองค์ประกอบของสารละลายตัวอย่างด้วย TLC แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณโดย colorimetric methods

การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อกลีเซอโรไลซีสของกลีเซอรอลดิบ

การศึกษาปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการเร่งปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีสของน้ำมันมะพร้าวกับกลีเซอรอลดิบซึ่งเร่งด้วยเอนไซม์ไลเปสจากยางมะละกอ ผู้วิจัยได้ดำเนินการดังนี้

1. ผลของชนิดตัวทำละลายอินทรีย์

เตรียมสารละลายปฏิกิริยาซึ่งประกอบด้วยกลีเซอรอลดิบ และ น้ำมันมะพร้าว (อัตราส่วนโดยโมลเท่ากับ 6: 1) จำนวน 8 ขวด เติมตัวทำละลายชนิดต่างๆ คือ เทอร์-บิวทานอล, นอร์มอล-เฮกเซน, 2-บิวทานอล, โทลูอีน, นอร์มอล-เฮปเทน, น้ำ, แอซีโตน และ 95% เอทานอล ลงในแต่ละขวดในปริมาณร้อยละ 25 ของน้ำมันที่ใช้ เริ่มปฏิกิริยาโดยการเติมไลเปสจากยางมะละกอร้อยละ 5 ของน้ำมันที่ใช้ นำสารละลายทั้งหมด 8 ขวดไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 °ซ พร้อมทั้งเขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บสารละลายตัวอย่างปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร แล้วนำไปแยกองค์ประกอบด้วย TLC แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณโดย colorimetric methods

2. ผลของอัตราส่วนโดยโมลของกลีเซอรอลต่อน้ำมันมะพร้าว

อัตราส่วนโดยโมลของกลีเซอรอลต่อน้ำมันมะพร้าวที่ทำการศึกษา ได้แก่ 2:1, 4:1, 6:1, 8:1, 10:1 และ 12:1 ใน 95% เอทานอล (ร้อยละ 25 ของน้ำมันที่ใช้) โดยปัจจัยควบคุมในการทำปฏิกิริยา ได้แก่ อุณหภูมิ 40 °ซ และเวลาในการทำปฏิกิริยา 24 ชั่วโมง ปริมาณไลเปสจากยางมะละกอร้อยละ 5 ของน้ำมันมะพร้าวที่ใช้ เขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เก็บสารละลายตัวอย่างปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร แล้วนำไปแยกองค์ประกอบด้วย TLC แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณโดย colorimetric methods

3. ผลของอุณหภูมิ

อุณหภูมิต่างๆ ที่ใช้ในการศึกษา คือ 40, 45, 50, 55 และ 60 °ซ โดยกำหนดปัจจัยควบคุม คือ อัตราส่วนโดยโมลของกลีเซอรอลต่อน้ำมันมะพร้าวเท่ากับ 8 : 1 ใน 95% เอทานอล (ร้อยละ 25 ของน้ำมันที่ใช้) ปริมาณไลเปสจากยางมะละกอร้อยละ 5 ของน้ำมันมะพร้าวที่ใช้ เขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เวลาในการทำปฏิกิริยา 24 ชั่วโมง เก็บสารละลายตัวอย่างปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร แล้วนำไปแยกองค์ประกอบด้วย TLC แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณโดย colorimetric methods

4. ผลของเวลา

เวลาต่าง ๆ ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีส ได้แก่ 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 และ 48 ชั่วโมง โดยกำหนดปัจจัยควบคุม คือ อัตราส่วนโดยโมลของกลีเซอรอลต่อน้ำมันมะพร้าวเท่ากับ 8 : 1 ใน 95% เอทานอล (ร้อยละ 25 ของน้ำมันที่ใช้) ปริมาณไลเปสจากยางมะละกอร้อยละ 5 ของน้ำมันที่ใช้ ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 45 °ซ เขย่าด้วยความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เก็บสารละลายตัวอย่างปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร แล้วนำไปแยกองค์ประกอบด้วย TLC แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณโดย colorimetric methods

5. ผลของปริมาณเอนไซม์

ปริมาณไลเปสจากยางมะละกอที่ใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาได้แก่ ร้อยละ 5, 10, 15, 20 และ 25 ของน้ำมันที่ใช้ โดยกำหนดปัจจัยควบคุม คือ อัตราส่วนโดยโมลของกลีเซอรอลต่อน้ำมันมะพร้าว

เท่ากับ 8: 1 ใน 95% เอทานอล (ร้อยละ 25 ของน้ำมันที่ใช้) ที่อุณหภูมิ 45 °ซ เขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง เก็บสารละลายตัวอย่างปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร แล้วนำไปแยกองค์ประกอบด้วย TLC แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณโดย colorimetric methods

6. ผลของปริมาณน้ำเริ่มต้นของเอนไซม์

เอนไซม์ไลเปสจากยางมะละกอถูกทำให้มีปริมาณน้ำเริ่มต้น (water activity, a_w) ต่างๆ คือ 0.11, 0.23, 0.33 และ 0.53 โดยวางเอนไซม์ไว้ในขวดที่อิ่มตัวด้วยไอของเกลือต่างๆ ดังนี้ เกลือลิเทียมคลอไรด์ (a_w = 0.11) เกลือโพแทสเซียมอะซีเตต (a_w = 0.23) เกลือแมกนีเซียมคลอไรด์ (a_w = 0.33) และ เกลือแมกนีเซียมไนเตรต (a_w = 0.53) ที่อุณหภูมิ 25 °ซ เป็นเวลา 5 วัน ก่อนนำไปเร่งปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีส ซึ่งปัจจัยควบคุม คือ อัตราส่วนโดยโมลของกลีเซอรอลต่อน้ำมันมะพร้าว เท่ากับ 8: 1 ใน 95% เอทานอล (ร้อยละ 25 ของน้ำมันที่ใช้) ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 20 ของน้ำมันที่ใช้ อุณหภูมิ 45 °ซ เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง เก็บสารละลายตัวอย่างปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร แล้วนำไปแยกองค์ประกอบด้วย TLC แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณโดย colorimetric methods

การแยกองค์ประกอบของสารผลิตภัณฑ์ด้วยวิธีทินแลเออร์โครมาโตกราฟี

สารละลายปฏิกิริยาที่ได้จากกลีเซอโรไลซีสของน้ำมันมะพร้าวกับกลีเซอรอลดิบประกอบด้วย โมโนกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ กรดไขมัน และ ไตรกลีเซอไรด์ของน้ำมันมะพร้าวที่เหลือ ดังนั้นต้องทำการแยกผลิตภัณฑ์เหล่านี้ออกจากกันโดยวิธีทินแลเออร์โครมาโตกราฟี (TLC) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ (1) หยดสารละลายผสมของปฏิกิริยาปริมาตร 0.2 มิลลิลิตรลงบนแผ่น TLC ที่เคลือบด้วยซิลิกาเจล (ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 120 °ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนใช้งาน) ให้เป็นแนวยาวติดต่อกัน โดยให้ห่างจากขอบล่าง 2 เซนติเมตร (2) นำแผ่น TLC ไปแช่ในอ่างที่มีไออิ่มตัวของตัวทำละลาย ที่ประกอบด้วย ปิโตรเลียม อีเธอร์ : ไดเอทิล อีเธอร์ : เมทานอล : กรดอะซีติก ในอัตราส่วน 90 : 7 : 2 : 0.5 โดยปริมาตร (Marzo, Ghirardi, Sardini & Meroni. 1971 : 145-147) ปิดฝาอ่างตั้งไว้จนกระทั่งตัวทำละลายเคลื่อนที่ขึ้นไปบนแผ่น TLC ห่างจากขอบบน 1 เซนติเมตร (3) นำแผ่น TLC ออกมาแล้วขีดแนวของตัวทำละลายไว้ ปล่อยให้ตัวทำละลายแห้ง แล้วนำไปแช่ในอ่างที่มีไออิ่มตัวของผลึกไอโอดีน เป็นเวลา 2-3 นาที นำแผ่น TLC ออกมาแล้วใช้ดินสอดำทำเครื่องหมายรอบแถบที่มีสีน้ำตาล (4) วัดระยะทางในการเคลื่อนที่ของแต่ละแถบนำไปหาความสัมพันธ์กับระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ หรือ ค่า R_f นำค่า R_f ของตัวอย่างที่ได้ไปเทียบกับสารกลีเซอไรด์มาตรฐานได้แก่ 1(3)-โมโนลอริน (R_f = 0.07), 1,3-ไดลอริน (R_f = 0.30), กรดลอริก (R_f = 0.5) และ ไตรลอริน

(R_f = 0.67) (5) ใช้มีดคัตเตอร์ขูดซิลิกาเจลบนแผ่น TLC ในส่วนต่างๆที่แยกได้ในแต่ละแถบ ระบุชื่อของสารในแต่ละแถบ แล้วเก็บไว้เพื่อนำไปวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

การวิเคราะห์ปริมาณของผลิตภัณฑ์โดย colorimetric method

ทำการสกัดสารผลิตภัณฑ์แต่ละชนิดที่แยกได้ด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้นปริมาตร 5 มิลลิลิตร ให้ความร้อนแก่สารละลายที่ได้โดยใช้ตู้อบที่อุณหภูมิ 200 °ซ เป็นเวลา 45 นาที แล้วนำไปแช่ในอ่างน้ำแข็งตั้งไว้ให้เย็น สารละลายที่ได้มีสีน้ำเงินเข้ม ดูดสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 375 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของกลีเซอไรด์แต่ละชนิดเพื่อหาปริมาณของผลิตภัณฑ์ (Marzo, Ghirardi, Sardini & Meroni. 1971 : 145-147)

การวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมันมะพร้าวและผลิตภัณฑ์ด้วยวิธี GC-MS

การวิเคราะห์ชนิดของกรดไขมันในไตรกลีเซอไรด์, โมโนกลีเซอไรด์, ไดกลีเซอไรด์ และกรดไขมัน มีขั้นตอนดังนี้ (1) นำไตรกลีเซอไรด์, โมโนกลีเซอไรด์, ไดกลีเซอไรด์ และกรดไขมัน มาทำปฏิกิริยาสปอนิฟิเคชันกับโบรอนไตรฟูลออไรด์-เมทานอล เพื่อสังเคราะห์เป็นเมทิลเอสเทอร์ของกลีเซอไรด์ที่แยกได้แต่ละชนิด และ (2) วิเคราะห์ชนิดของกรดไขมันในกลีเซอไรด์ที่แยกได้โดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ (GC 6850, Agilent Technologies) ที่มีคอลัมน์ชนิดคะปิลลารี (HP-1MS, 30 m × 0.25 mm, 0.25 μm thickness) ต่ออยู่กับเครื่องแมสสเปคโตรมีเตอร์ (MSD 5973 (EI), Agilent Technologies) สภาวะที่ใช้คือ อุณหภูมิของแหล่ง MS Quadrupole และ MS เท่ากับ 150 และ 230 °ซ ตามลำดับ ใช้ฮีเลียมเป็นแก๊สตัวพาด้วยอัตราเร็ว 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที และอุณหภูมิที่ใช้ฉีดเท่ากับ 250 °ซ อุณหภูมิในคอลัมน์ที่ใช้วิเคราะห์ คือ เริ่มต้นที่อุณหภูมิ 140 °ซ ค่อยๆเพิ่มขึ้นจนถึง 240 °ซ ด้วยอัตราเร็ว 10 °ซ ต่อ นาที และพักไว้ที่อุณหภูมิสุดท้าย 15 นาที

เปรียบเทียบผลผลิตของกลีเซอรอล โมโนลอเรทจากกลีเซอโรไลซีสของน้ำมันมะพร้าวและกลีเซอรอลดิบ กับ ผลผลิตของกลีเซอรอล โมโนลอเรทจากกลีเซอโรไลซีสของน้ำมันมะพร้าวและกลีเซอรอลบริสุทธิ์

สารละลายปฏิกิริยาปริมาตร 0.5 ลิตร ประกอบด้วยกลีเซอรอลดิบที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์และน้ำมันมะพร้าวที่ได้จากการสกัดเย็น ในอัตราส่วนโดยโมลเท่ากับ 8: 1 ซึ่งมีการเติม 95% เอทานอล ร้อยละ 25 ของน้ำมันที่ใช้ เริ่มปฏิกิริยาโดยเติมเอนไซม์ไลเปสจากยางมะละกอ (a_w = 0.53) ร้อยละ 20 ของน้ำมันที่ใช้ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 °ซ พร้อมทั้งเขย่าด้วยความเร็ว

250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง ทำการแยกส่วนของลิพิด (ไตรกลีเซอไรด์, ไดกลีเซอไรด์, โมโนกลีเซอไรด์ และ กรดไขมัน) ออกจากกลีเซอรอลที่เหลือโดยใช้คลอโรฟอร์ม สารในกลุ่มของลิพิดจะอยู่ในชั้นของคลอโรฟอร์ม ส่วนกลีเซอรอลถูกแยกให้อยู่ในชั้นของน้ำ หลังจากนั้นล้างสารละลายในชั้นของคลอโรฟอร์ม 3 ครั้ง ด้วยน้ำกลั่น แล้วนำสารละลายที่สกัดได้ในคลอโรฟอร์มไประเหยเอาคลอโรฟอร์มออกไปที่อุณหภูมิ 60 °ซ ภายใต้สุญญากาศ นำสารตัวอย่างที่ได้ไปแยกองค์ประกอบด้วย TLC แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณต่อไป

ในขณะเดียวกันทำการศึกษากลีเซอโรไลซีสของกลีเซอรอลบริสุทธิ์กับน้ำมันมะพร้าว ที่สภาวะเดียวกันกับกลีเซอโรไลซีสของกลีเซอรอลดิบกับน้ำมันมะพร้าว ควบคู่กันไป