

### บทที่ 3

#### วิธีการทดลอง

#### 3.1 การสกัดโคติน

##### 3.1.1 การเตรียมวัตถุดิบ

นำเปลือกกุ้งสดแต่ละชนิด และเปลือกดักแด้แมลง มาล้างด้วยน้ำสะอาดหลาย ๆ ครั้ง หากเป็นเปลือกกุ้งจะต้องนำเปลือกกุ้งแยกเอาส่วนเนื้อ ไขมันและอื่น ๆ ออกไป ใช้เฉพาะส่วนที่เป็นเปลือกเท่านั้น ส่วนดักแด้แมลง นำดักแด้แมลงสดมาทำความสะอาด ล้างเนื้อออก ใช้เฉพาะส่วนที่เป็นเปลือกลำตัวเท่านั้น แล้วจึงนำไปอบแห้งด้วยเครื่องอบที่อุณหภูมิ  $100 \pm 10$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

##### 3.1.2 การกำจัดแร่ธาตุ

นำเปลือกกุ้ง เปลือกดักแด้แมลง มากำจัดแร่ธาตุ ด้วยกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 2 M กวนตลอดเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ( $28 \pm 2$  องศาเซลเซียส) โดยใช้ใช้น้ำหนักต่อปริมาตร 1 ต่อ 20 ด้วย Stirring hot plate ซึ่งการใช้สารละลายกรดไฮโดรคลอริก เจือจาง เป็นตัวละลายแร่ธาตุ โดยส่วนใหญ่เป็นเกลือแคลเซียมคาร์บอเนต



หลังจากนั้น ล้างน้ำให้สะอาด แล้วจึงกรองเพื่อเอากากทั้งหมด

##### 3.1.3 การกำจัดโปรตีน

นำกากของเปลือกกุ้ง เปลือกดักแด้แมลง ที่ได้จากการกำจัดแร่ธาตุ ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 2 M กวนตลอดเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ( $28 \pm 2$  องศาเซลเซียส) โดยใช้ใช้น้ำหนักต่อปริมาตร 1 ต่อ 20 ด้วย Stirring hot plate หลังจากนั้นล้างน้ำแล้วกรองจนหมดกรด จะได้โคติน แล้วนำไปเปรียบเทียบกับร้อยละจากสารตั้งต้น

#### 3.2 การเตรียมโคโตซาน

นำโคตินที่สกัดได้มากำจัดหมู่ Acetyl (Deacetylation) ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 50% โดยใช้น้ำหนัก ในอัตราส่วน 1 ต่อ 20 คนตลอดเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ  $140 \pm 10$  องศาเซลเซียส ด้วย Stirring hot plate

หลังจากนั้นนำโคโตซานที่ได้ไปล้างน้ำ และกรองจนหมดค้าง ขั้นตอนสุดท้ายนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ  $100 \pm 10$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จะได้โคโตซาน แล้วจึงนำไปเปรียบเทียบกับร้อยละจากโคตินตั้งต้น และเปรียบเทียบกับร้อยละจากปริมาณเปลือกตั้งต้น

### 3.3 ทดสอบการละลายของไคตินและไคโตซาน

เมื่อได้ผลิตภัณฑ์ที่แยกสกัดได้มาทดสอบการละลายในตัวทำละลายชนิดต่างๆ พบว่าเมื่อใช้ไคตินและไคโตซานจำนวน 0.1 กรัม ละลายลงใน  $5\text{ cm}^3$  ของตัวทำละลายแต่ละชนิด สังเกตการละลายด้วยตา เตรียมสารละลายกรดอะซิติก ความเข้มข้น 1% (v/v) และนำไคตินที่ได้จากการทดลองข้างต้นมาทำละลายในสารละลายที่เตรียมไว้ โดยไคติน 0.1 กรัม ต่อสารละลาย  $5\text{ cm}^3$

ทำการทดลองซ้ำโดยเปลี่ยนตัวทำละลายเป็น น้ำ และ 50% (v/v)  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$

### 3.4 การเตรียมอนุพันธ์ของไคโตซาน

#### 3.4.1 การเตรียมไคโตซานบีดส์ Chitosan beads (CB)

(ก) ละลายไคโตซาน 2 กรัม ในสารละลาย 1% (v/v) Acetic acid  $100\text{ cm}^3$  ในบีกเกอร์ ปิดปากบีกเกอร์ด้วยพาราฟิล์ม ทิ้งไว้ 1 คืน

(ข) นำสารละลายไคโตซานที่ได้มาหยดด้วยเครื่องปั๊มที่มีเข็มฉีดยาติดอยู่ ลงในสารละลาย 0.2 M NaOH จำนวน  $500\text{ cm}^3$  คนด้วยเครื่อง Magnetic stirrer

(ค) ล้างเม็ดบีดส์ที่ได้ด้วยน้ำ  $100\text{ cm}^3$  4-5 ครั้ง แล้วล้างตามด้วย เอทานอล

(ง) ถ่ายเม็ดไคโตซานที่ได้ไว้ในภาชนะปิด เก็บไว้ที่เย็นเพื่อป้องกันการเสียความชื้น

#### 3.4.2 การทำ Cross-link ด้วย Glutardialdehyde (Glutardialdehyde cross-linked chitosan beads (GCB))

(ก) นำไคโตซานบีดส์ที่ได้จากข้อ 3.4.1 มา 20 กรัม ใส่ในขวดกั่นกลม เติมสารละลาย Glutardialdehyde  $82.08\text{ }\mu\text{L}$

(ข) เติม Methanol  $100\text{ cm}^3$  ทิ้งไว้ 6 ชั่วโมง

(ค) เติม Sodium borohydride 0.2 กรัม

(ง) ติดตั้งขวดกั่นกลมที่บรรจุสารเคมีที่เตรียมไว้กับเครื่อง Condenser ภายใน hood ให้ความร้อนที่  $80\text{ }^\circ\text{C}$  ทิ้งไว้ 4 ชม.

(จ) ล้างเม็ดบีดส์ที่ได้ด้วยน้ำ  $100\text{ cm}^3$  4-5 ครั้ง แล้วล้างตามด้วย เอทานอล

(ฉ) ถ่ายเม็ดไคโตซานที่ได้ไว้ในภาชนะปิด เก็บไว้ที่เย็นเพื่อป้องกันการเสียความชื้น

#### 3.4.3 ทำ Cross-link ด้วย Glutardialdehyde และติดหมู่ฟังก์ชันกับ Benzaldehyde (Benzaldehyde derivatized-glutaraldehyde cross-linked chitosan beads (BGCB))

(ก) นำไคโตซานบีดส์ที่ได้จากข้อ 3.4.2 มา 20 กรัม ใส่ในขวดกั่นกลม เติมสารละลาย Glutardialdehyde  $82.08\text{ }\mu\text{L}$

(ข) เติม Methanol  $100\text{ cm}^3$  ทิ้งไว้ 6 ชั่วโมง

(ค) เติม 0.2M NaOH  $6\text{ cm}^3$  และ Benzaldehyde  $1,000\text{ }\mu\text{L}$  ทิ้งไว้ 4 ชั่วโมง

(ง) ล้างเม็ดบีดส์ที่ได้ด้วยน้ำ  $100\text{ cm}^3$  4-5 ครั้ง แล้วล้างตามด้วย เอทานอล

(จ) ถ่ายเม็ดโคโตซานที่ได้ไว้ในภาชนะปิด เก็บไว้ที่เย็นเพื่อป้องกันการเสียความชื้น

### 3.5 ลักษณะเม็ดของอนุพันธ์ของโคโตซาน

3.5.1 นำเม็ดโคโตซานทั้งสามชนิดดูลักษณะเม็ด ด้วยกล้องจุลทรรศน์ แบบ สเตอริโอ

3.5.2 ดูลักษณะพื้นผิวของโคโตซานด้วย กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แบบส่องกราด

### 3.6 ทดสอบการละลายของอนุพันธ์ของโคโตซาน

3.6.1 ชั่ง CB 0.1 g ใส่ลงในบีกเกอร์ 5 ใบที่บรรจุ ตัวทำละลาย 5 ชนิดคือ 1% (v/v)  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , น้ำ, และ 50% (v/v) เอทานอล สังเกตการละลาย

3.6.2 ชั่ง GCB 0.1 g ใส่ลงในบีกเกอร์ 5 ใบที่บรรจุ ตัวทำละลาย 5 ชนิดคือ 1% (v/v)  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , น้ำ, และ 50% (v/v) เอทานอล สังเกตการละลาย

3.6.3 ชั่ง BGCB 0.1 g ใส่ลงในบีกเกอร์ 5 ใบที่บรรจุ ตัวทำละลาย 5 ชนิดคือ 1% (v/v)  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , น้ำ, และ 50% (v/v) เอทานอล สังเกตการละลาย

### 3.7 การทดสอบการดูดซับสารเคมี

## มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

#### 3.7.1 การทดสอบการดูดซับคอปเปอร์(II)ซัลเฟต

(ก) เตรียมสารละลาย  $\text{CuSO}_4$  เข้มข้น  $20\text{ mg/cm}^3$

(ข) นำ CB มาใส่ในขวด vial จำนวน 5 ขวด ขวดละ 0.5 กรัม แล้วติดป้ายระบุเวลา 30 วินาที , 1 นาที , 10 นาที , 30 นาที , 60 นาที ที่ขวดตามลำดับ

(ค) นำสารละลาย  $\text{CuSO}_4$  ใส่ลงในขวดที่ 1 ปริมาตร  $5\text{ cm}^3$  จับเวลา 30 วินาที แล้วดูสารละลาย  $\text{CuSO}_4$  ใส่ในบีกเกอร์ปริมาตร  $50\text{ cm}^3$  ทำซ้ำทั้ง 5 ขวด โดยจับเวลาตามที่กำหนด

(ง) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer โดยถ่ายสารละลายใส่เซลล์ขนาด  $1\text{ cm}^3$  วัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น  $794\text{ nm}$

(จ) บันทึกค่าการดูดกลืนแสง และคำนวณปริมาณคอปเปอร์(II) ที่เหลือเทียบกับกราฟมาตรฐาน

(ฉ) ทดลองตามข้อ 1- 5 โดยเปลี่ยนเม็ดบีดส์เป็น Glutardialdehyde cross-linked chitosan beads (GCB), และ Benzaldehyde derivatized-glutaraldehyde cross-linked chitosan beads (BGCB)

#### 3.7.2 การทดสอบการดูดซับนิเกิล(II) ซัลเฟต

(ก) เตรียมสารละลาย  $\text{NiSO}_4$  เข้มข้น  $20\text{ mg/cm}^3$

(ข) นำ CB มาใส่ในขวด vial จำนวน 5 ขวด ขวดละ 0.5 กรัม แล้วติดป้ายระบุเวลา 30 วินาที , 1 นาที , 10 นาที , 30 นาที , 60 นาที ที่ขวดตามลำดับ

(ค) นำสารละลาย  $\text{NiSO}_4$  ใส่ลงในขวดที่ 1 ปริมาตร  $5 \text{ cm}^3$  จับเวลา 30 วินาที แล้วดูดสารละลาย  $\text{NiSO}_4$  ใส่ในบีกเกอร์ปริมาตร  $50 \text{ cm}^3$  ทำซ้ำทั้ง 5 ขวด โดยจับเวลาตามที่กำหนด

(ง) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer โดยถ่ายสารละลายใส่เซลล์ขนาด  $1 \text{ cm}^3$  วัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น  $426 \text{ nm}$

(จ) บันทึกค่าการดูดกลืนแสง และคำนวณปริมาณนิเกิล(II) ที่เหลือเทียบกับกราฟมาตรฐาน

(ฉ) ทำการทดลองซ้ำข้อ (ก)-(จ) โดยเปลี่ยนมาใช้ Glutardialdehyde cross-linked chitosan beads (GCB), และ Benzaldehyde derivatized-glutaraldehyde cross-linked chitosan beads (BGCB) แทน CB

### 3.7.3 การทดสอบการดูดซับทอเรียมไนเตรด ( $^{232}\text{Th}(\text{NO}_3)_2$ , $^{238}\text{Th}(\text{NO}_3)_2$ )

(ก) ชั่ง CB  $2 \text{ g}$  ลงในขวดขนาด  $20 \text{ cm}^3$  จำนวน 8 ขวด

(ข) ปิเปตสารละลาย ทอเรียมไนเตรด  $1 \text{ cm}^3$  ลงในแต่ละขวด จับเวลาขวดที่ 1-8 เป็นเวลา 10 , 20 , 30 , 60 , 600 , 1800 , 3600 , และ 7200 วินาที ตามลำดับ

(ค) เมื่อครบเวลา ใช้ปิเปต ดูสารละลายที่เหลือ  $0.2 \text{ cm}^3$  ใส่ลงในขวดตัวอย่าง ขนาด  $20 \text{ cm}^3$

(ง) นำสารตัวอย่างที่ได้ไปวัดด้วยเทคนิค LSC

(จ) บันทึกผลเทียบกับปริมาณ ทอเรียมไนเตรดเริ่มต้น คำนวณหาปริมาณที่ลดลงไป

(ฉ) ทำการทดลองซ้ำข้อ (ก)-(จ) โดยเปลี่ยนมาใช้ Glutardialdehyde cross-linked chitosan beads (GCB), และ Benzaldehyde derivatized-glutaraldehyde cross-linked chitosan beads (BGCB) แทน CB

### 3.7.4 การทดสอบการดูดซับฟอสเฟต

(ก) เตรียมสารละลาย  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  เข้มข้น  $40 \text{ mg/cm}^3$  โดยนำสารละลายมาตรฐานของไอออน ฟอสเฟตมา  $80 \text{ cm}^3$  เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรเป็น  $100 \text{ cm}^3$

(ข) นำเม็ด CB มาใส่ในขวด vial จำนวน 5 ขวด ขวดละ 1 กรัม แล้วติดป้ายระบุเวลา 5 , 10 , 30 , 60 120 นาทีที่ขวดตามลำดับ

(ค) ปิเปตสารละลาย  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  จากข้อ 1 ใส่ลงในขวดที่ 1 ปริมาตร  $10 \text{ cm}^3$  จับเวลา 5 นาที แล้วดูดสารละลาย  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ใส่ในขวดปริมาตร  $100 \text{ cm}^3$  ทำซ้ำทั้ง 5 ขวด โดยจับเวลาตามที่กำหนด

(ง) เติมสารละลายแอมโมเนียมโมลิบเดต  $4 \text{ cm}^3$  ทุกขวด แล้วเขย่าให้เข้ากัน

(จ) เติมสารละลาย  $\text{SnCl}_2$   $200 \text{ }\mu\text{L}$  แล้วเติมน้ำกลั่นจนถึงขีดปริมาตร  $100 \text{ cm}^3$  ทิ้งไว้ 10 นาที

(ฉ) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer โดยถ่ายสารละลายใส่เซลล์ขนาด  $1 \text{ cm}^3$  วัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น  $700 \text{ nm}$

(ช) บันทึกค่าการดูดกลืนแสง และนำข้อมูลที่ได้ไปเขียนกราฟ และทำการทดลองซ้ำ

(ซ) ทดลองตามข้อ (ก)-(ช) โดยเปลี่ยนเม็ดบีดส์เป็น Glutardialdehyde cross-linked chitosan beads (GCB), และ Benzaldehyde derivatized-glutaraldehyde cross-linked chitosan beads (BGCB)

(ฌ) เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงกับสารละลายฟอสเฟตกับสารละลายมาตรฐาน

### 3.7.4 การทดสอบการดูดซับ Rhodamine B

- (ก) เตรียมสารละลาย Rhodamine B เข้มข้น  $1.0 \mu\text{M}$
- (ข) ชั่งไคโตซานบีดส์ (CB)  $5.0 \text{ g}$  ลงในขวดขนาดเล็ก จำนวน 6 ขวด
- (ค) เตรียมสารละลาย Rhodamine B เข้มข้น  $1.0 \mu\text{M}$  ลงในขวดที่ 1 จับเวลา 10 วินาที
- (ง) เมื่อครบเวลา ปิเปตสารละลายส่วนที่เหลือ ออกมา  $3 \text{ cm}^3$  นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น  $543 \text{ nm}$
- (จ) ทำการทดลองในขวดที่ 2- 8 แบบเดียวกันโดยเปลี่ยนเวลาการดูดซับ เป็น 20 , 30 , 60 , 600 , 1800 , 3600 , และ 7200 วินาที ตามลำดับ
- (ฉ) บันทึกค่าการดูดกลืนแสง และคำนวณปริมาณ Rhodamine B ที่เหลือเทียบกับกราฟมาตรฐาน
- (ช) ทำการทดลองซ้ำโดยเปลี่ยนเป็น Glutardialdehyde cross-linked chitosan beads (GCB),และ Benzaldehyde derivatized-glutaraldehyde cross-linked chitosan beads (BGCB)แทน Chitosan beads (CB)

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์