บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วิธีการเก็บและเตรียมตัวอย่าง

3.1.1 เลือกซื้อปีกไก่ที่สดและสะอาดหนักประมาณ 500 กรัม

3.1.2 เตรียมเครื่องปรุงรสที่จะใช้หมักปีกไก่ เครื่องปรุงรสมีส่วนผสมดังนี้ ผงปรุงรส ซ๊อสปรุงรส น้ำมันหอย น้ำปลา รากผักชีและกระเทียมผสมคลุกเคล้าให้เข้ากัน นำปีกไก่หมักในเครื่องปรุง 30 นาที

3.1.3 นำปีกไก่ที่หมักเครื่องปรุงและไม่หมักเครื่องปรุงลงทอดในน้ำมันถั่วเหลืองที่อุณหภูมิ 180 ± 5 องศาเซลเซียส หลังจากไก่สุกแล้วให้ความร้อนต่อจนครบ 2 ชั่วโมง ทำการทอดซ้ำเช่นนี้ทุกวัน

3.1.4 ทำการทดลองตั้งแต่ข้อ 3.1.1 ถึง 3.1.3 โดยเปลี่ยนจากน้ำมันถั่วเหลืองเป็นน้ำมันปาล์มและน้ำมันหมูตามลำดับ

3.1.5 เก็บตัวอย่างน้ำมันเพื่อทดสอบตัวแปรที่ทำให้เกิดการเสื่อมของน้ำมันที่เกิดจากการทอดซ้ำ หากตัวอย่างน้ำมันที่ต้องการวิเคราะห์เป็นไขให้นำไปอุ่นในน้ำร้อนที่อุณหภูมิสูงกว่าจุดหลอมเหลวเล็กน้อย (ประมาณ 60 องศาเซลเซียส) ผสมตัวอย่าง น้ำมันให้เป็นเนื้อเดียวกันและกรองแยกกากอาหารออก ผสมให้เข้ากันโดยการเขย่า

3.2 วิธีการวิเคราะห์

3.2.1 การวิเคราะห์หาปริมาณสารโพลาร์ (Total polar compounds)

1) การเตรียมคอลัมน์

(1) เติมสารละลายผสมของ light petroleum : diethyl ether (87:13) (Solvent 1) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในคอลัมน์แก้วขนาด 2.1 เซนติเมตร × 45 เซนติเมตร ใส่สำลีลงไปที่ส่วนล่างของคอลัมน์และใช้แท่งแก้วกดไล่อากาศออก

(2) ชั่งซิลิกาเจล 25 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ ละลายด้วย Solvent 1ปริมาตร 80 มิลลิลิตร เทสารละลายทั้งหมดลงในคอลัมน์โดยใช้กรวยแก้วหรือปิเปต ล้างซิลิกาเจลที่ค้างอยู่ในบีกเกอร์ด้วย Solvent 1 และเทใส่ลงในคอลัมน์

(3) เปิดก๊อกคอลัมน์ใส่สารละลายจนอยู่เหนือระดับซิลิกาเจล เคาะคอลัมน์เบาๆ เพื่อปรับระดับซิลิกาเจลส่วนบนให้เรียบและอยู่ในแนวเดียวกัน

(4) เติม sea sand น้ำหนัก 4 กรัม ในคอลัมน์โดยผ่านกรวยแก้ว เปิดก๊อกคอลัมน์ใส่สารละลายจนอยู่ระดับเดียวกับ sea sand

(5) โดยปรับอัตราการไหล (flow rate) 1.5 มิลลิลิตร/ นาที

2) การเตรียมตัวอย่างน้ำมันเพื่อวิเคราะห์

ชั่งน้ำหนักน้ำมันตัวอย่าง 2.5 ± 0.1 กรัม ลงใน volumetric flask ขนาด 50 มิลลิลิตร ละลายด้วย petroleum ether : diethyl ether (87:13) อุ่นๆ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นปรับปริมาตรด้วย petroleum ether : diethyl ether (87 : 13) ครบ 50 มิลลิลิตร ผสมจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

3) การแยกสารนอนโพลาร์ (สารประกอบไม่มีขั้ว)

(1) อบขวดก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตร จำนวน 2 ใบ (Aและ B) ในตู้อบที่อุณหภูมิ 103 ± 2 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องในโถดูดความชื้น ชั่งและบันทึกน้ำหนัก (ชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง) ขวดหลังอบแห้ง A สำหรับสารนอนโพลาร์ (W_{np}) และน้ำหนักขวดหลังอบแห้ง B สำหรับสารโพลาร์ (W_p)

(2) วางขวดก้นกลม A ใต้คอลัมน์สำหรับรองรับสารนอนโพลาร์

(3) ปิเปตสารละลาย 20 มิลลิลิตร ใส่ลงในคอลัมน์ที่เตรียมไว้ ระวังอย่าให้ผิวบนของทรายฟุ้งกระจาย เปิดก๊อกคอลัมน์ใส่สารละลายจนอยู่ระดับเดียวกับทราย

(4) เติม Solvent 1 ปริมาตร 150 มิลลิลิตร และเปิดก๊อกคอลัมน์ชะสารละลายด้วยอัตราการไหลา 1.5 มิลลิลิตร/ นาที จนกระทั่งสารละลายหยุดไหล

(5) นำสารละลายใน round bottom flask A ไปทำการระเหยที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 20 นาทีและเป่าไล่ด้วยไนโตรเจน ทิ้งไว้ให้เย็น

(6) ชั่งน้ำหนักขวดก้นกลม จดน้ำหนักเพื่อทำการคำนวณน้ำหนักของสารนอนโพลาร์ ดังนี้

การคำนวณหา nonpolar fraction

$$W_{np} = \frac{(m - m_{np}) \times 100}{m}$$

W_{np} = สารประกอบ nonpolar

m = น้ำหนักตัวอย่างในสารละลาย 5 กรัม

m_{np} = น้ำหนัก nonpolar fraction

4) การแยกสารโพลาร์ (สารประกอบมีขั้ว)

(1) นำขวดก้นกลมที่เตรียมไว้ในข้อ 3) วางขวดก้นกลม B ใต้คอลัมน์สำหรับรองรับสารโพลาร์

(2) ปิเปตสารละลาย 20 มิลลิลิตร ใส่ลงในคอลัมน์ที่เตรียมไว้ ระวังอย่าให้ผิวบนของทรายฟุ้งกระจาย เปิดก๊อกคอลัมน์ใส่สารละลายจนอยู่ระดับเดียวกับทราย

(3) เติมสารละลาย diethyl ether ปริมาตร 150 มิลลิลิตร และเปิดก๊อกคอลัมน์ชะสารละลายด้วยอัตราการไหลา 1.5 มิลลิลิตร/ นาที จนกระทั่งสารละลายหยุดไหล

(4) นำสารละลายใน round bottom flask B ไปทำการระเหยที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที และเป่าไล่ด้วยไนโตรเจน ทิ้งไว้ให้เย็น

(5) ชั่งน้ำหนักขวดก้นกลม จดน้ำหนักเพื่อทำการคำนวณน้ำหนักของสารโพลาร์ ดังนี้

การคำนวณหา polar fraction

$$W_p = \frac{(m - m_p) \times 100}{m}$$

W_p = สารประกอบ polar

m = น้ำหนักตัวอย่างในสารละลาย 1 กรัม

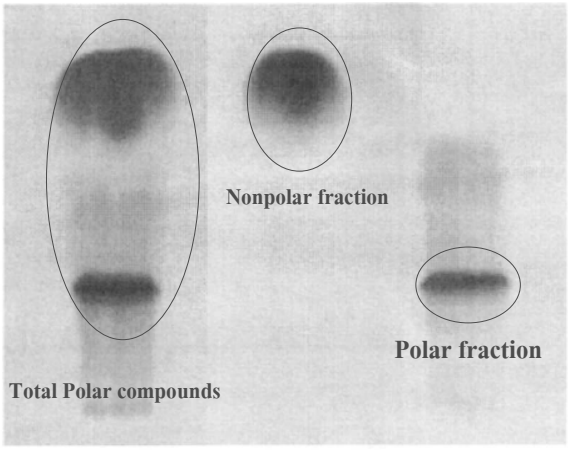
m_{np} = น้ำหนัก polar fraction

5) การตรวจสอบประสิทธิภาพการแยกสารโพลาร์และสารนอนโพลาร์ด้วยเทคนิค Thin layer chromatography (TLC)

(1) เตรียมสารละลายของสารโพลาร์และนอนโพลาร์ที่แยกได้ให้มีความเข้มข้น 10 % ใน diethyl ether

(2) เตรียม glass plate เคลือบด้วยซิลิกาเจล โดยทำเครื่องหมายแสดงจุดเริ่มต้นและตำแหน่งตัวอย่าง ใช้ capillary pipette ลงใน Developing tank และวาง glass plate ลงในด้านที่หยดสารตัวอย่างแช่อยู่ในสารละลาย ปิดฝาให้สนิท ตั้งทิ้งไว้ 35 นาที สารละลายเดินทางได้ 17 เซนติเมตร นำ glass plate มาระเหยสารละลายให้แห้ที่อุณหภูมิห้อง

(3) พ่นสารละลาย phosphomolybdic acid ในเอทานอล (100 กรัม/ลิตร) ลงบน glass plate ทิ้งให้เอทานอลระเหยแห้ง นำไปอบที่ 120 -130 องศาเซลเซียสแสดงดังภาพที่ 6



ภาพที่ 10 การแยกสารนอนโพลาร์และสารโพลาร์ในตัวอย่างน้ำมันที่ผ่านการทอดซ้ำและแบลงค์ในระบบตัวทำละลาย petroleum ether : diethyl ether 87 : 13 ด้วยเทคนิค Thin Layer Chromatography

3.2.2 การวิเคราะห์ค่าไอโอดีน (Iodine value)

วิเคราะห์หาค่าไอโอดีน (Iodine value) โดยวิธีวิจัสตาม AOCS Official Method 1d-92 (1997)

1)วิธีเตรียมสารละลายวิจส์

ชั่งไอโอดีนโมโนคลอไรด์ 16.5 กรัม ในขวดปรับปริมาตรและปรับให้เป็น 1 ลิตร ด้วยกรดเกลเชียลอะซิติก สารละลายที่เตรียมได้ควรเก็บไว้ในที่เย็น และสารเคมีที่นำมาเตรียมควรเป็นสารใหม่

2) การดำเนินการ

(1) ชั่งตัวอย่างหนัก 0.2 กรัม (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) ใส่ขวดรูปชมพู่มีฝาจุกปิดขนาด 500 มิลลิลิตร

(2) เติมสารผสมระหว่างไซโคลเฮกเซนกับกรดอะซิติกในอัตราส่วน 1:1 จำนวน 15 มิลลิลิตร เขย่าให้ตัวอย่างละลายจนหมด

(3) เติมสารละลายวิจส์ 25 มิลลิลิตร โดยใช้ไวลุมเมตริกปิเปตดูด เขย่าสารให้ผสมกัน ปิดฝาจุกให้สนิท

(4) เก็บไว้ในที่มืดทันทีที่อุณหภูมิห้อง ($25 \pm 5\ ^{0}C$) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

(5) เมื่อครบเวลาเติมโพแทสเซียมไอโอไดด์ความเข้มข้น 10% w/v จำนวน 20 มิลลิลิตร เขย่าแล้วเติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

(6) ไทเทรตทันทีด้วยสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟตความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล จนสารละลายเปลี่ยนสีเป็นสีเหลืองอ่อน แล้วเติมสารละลายแป้งเข้มข้น 1% w/v ปริมาตร 1 มิลลิลิตรไทเทรตจนสารละลายเปลี่ยนสีจากสีน้ำเงินเป็นไม่มีสี

(7) ทำแบลงค์ตามขั้นตอนโดยไม่ต้องใส่ตัวอย่างน้ำมันในขั้นแรก

3) การคำนวณหาค่าไอโอดีน

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

เมื่อ B = ปริมาตร (มิลลิลิตร) ของโซเดียมไทโอซัลเฟตที่ใช้ไทเทรตแบลงค์

S = ปริมาตร (มิลลิลิตร) ของโซเดียมไทโอซัลเฟตที่ใช้ไทเทรตตัวอย่าง

N = ความเข้มข้น (นอร์มอล) ของโซเดียมไทโอซัลเฟต

W = น้ำหนัก (กรัม) ของตัวอย่างน้ำมัน

3.2.3 การวิเคราะห์ค่าเพอรอกไซด์ (Peroxide value)

ค่าเปอร์ออกไซด์ (Peroxide value)วิเคราะห์ตาม AOCS Official Method Cd 8b-90 (1997)

1) การวิเคราะห์

(1) ชั่งตัวอย่างน้ำมัน 5.00 ± 0.05 กรัม ในขวดรูปชมพู่ 250 มิลลิลิตร เติมสารผสมกรดเกลเชียลอะซิติกกับไอโซออกเทน อัตราส่วน 3:2 จำนวน 50 มิลลิลิตร เขย่าให้น้ำมันละลายเติมสารละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์อิ่มตัว 0.5 มิลลิลิตร

(2) ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที โดยมีการเขย่าอยู่ตลอดเวลา เมื่อครบเวลาเติมน้ำกลั่น 30 มิลลิลิตร

(3) นำไปไทเทรตด้วยสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต เข้มข้น 0.01 นอร์มอล จนกระทั่งสีเหลืองจางลง จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตเข้มข้น 10% ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และน้ำแป้งเข้มข้น1% ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ไทเทรตจนสีน้ำเงินหมดไป

(4) แบลงค์ตามขั้นตอน โดยไม่ต้องใส่ตัวอย่าง

2) การคำนวณค่าเปอร์ออกไซด์

$$\text{Peroxide value (meq/kg)} = \frac{(S - B) \times N \times 1000}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}}$$

เมื่อ B = ปริมาตร (มิลลิลิตร) ของโซเดียมไทโอซัลเฟตที่ใช้ไทเทรตแบลงค์

S = ปริมาตร (มิลลิลิตร) ของโซเดียมไทโอซัลเฟตที่ใช้ไทเทรตตัวอย่าง

N = ความเข้มข้น (นอร์มอล) ของโซเดียมไทโอซัลเฟต

3.2.4 การวิเคราะห์หาค่าความหนืด (viscosity)

1) ทำการล้าง pyknometer และฝาจุกให้สะอาด ทำให้แห้งสนิทปราศจากน้ำ

2) นำ pyknometer และฝาจุกไปชั่งด้วยเครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่งทำการบันทึกน้ำหนัก จะได้ค่า M_0

3)บรรจุน้ำลงใน pyknometer ปิดฝา เช็ดน้ำที่ล้นออกมาให้แห้ง แล้วนำไปชั่งน้ำหนักอีกครั้ง จะได้ค่า M_1

4)นำค่า M_1-M_0 ได้M ของน้ำ นำค่าที่ได้มาแทนใน $\rho = \frac{m}{V}$ เพื่อหาปริมาตรของของเหลวภายใน pyknometerและฝาจุก

5)เตรียมสารละลายของน้ำมันตัวอย่าง โดยชั่งน้ำมัน ประมาณ 0.5 กรัม ละลายด้วยทูลูอีนปรับปริมาตรให้ได้ 50 มิลลิลิตร จะได้สารละลายน้ำมันเข้มข้น m x 2% (น้ำหนัก/ปริมาตร)

6)ใส่สารละลายน้ำมันลงใน pyknometer นำไปชั่ง บันทึกน้ำหนัก จะได้ค่า M_s

7) นำค่า M_s มาแทนใน $\rho = \frac{m}{V}$ จะได้ค่าความหนาแน่นของน้ำมันตัวอย่าง

8)ใช้วิสโคมิเตอร์ที่สะอาดมาทำการวัดหาค่า outflow time ของน้ำมัน โดยทำการวัด outflow time ของตัวทำละลาย คือ ทูลูอีนก่อน

9)เริ่มจากการปิเปตสารละลายลงในวิสโคมิเตอร์ ทางท่อที่เป็นกระเปาะใหญ่ จนถึงระดับที่กำหนดไว้

10) ใช้มือซ้ายบีบสายยางที่ต่อเข้าทางท่อที่ปราศจากกระเปาะ เพื่อไม่ให้อากาศเข้า

11)ใช้ลูกยางปั๊มตรงท่อที่มีกระเปาะสองกระเปาะ ให้สารละลายไหลขึ้นสูงกว่าระดับที่กำหนดเล็กน้อย

12) นำลูกยางออก ปล่อยให้สารละลายไหลมาถึงระดับที่กำหนด

13)เริ่มจับเวลาและรอจนสารละลายไหลลงมาถึงขีดระดับล่างที่กำหนดไว้ จึงหยุดจับเวลา

14)บันทึกเวลาที่สารละลายไหลจากระดับบนมาถึงระดับล่างที่กำหนดเอาไว้ เวลาที่ได้คือ outflow time

15)ทำการทดลองเช่นเดียวกันนี้กับทุกตัวอย่าง ตัวอย่างละ 3 ครั้ง

3.2.5 การวิเคราะห์หาค่าความหนาแน่น (Density)

1)ชั่งกระบอกตวงขนาด 10 มิลลิลิตร ด้วยเครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง บันทึกน้ำหนัก

2) กดปุ่มปรับน้ำหนักให้มีค่าเป็นศูนย์ แล้วใส่น้ำมันตัวอย่างให้ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร อ่านน้ำหนักที่ได้

3) นำน้ำหนักที่อ่านได้ลบด้วยน้ำหนักของกระบอกตวง เพื่อให้ได้น้ำหนักของน้ำมัน

4) คำนวณหาค่าความหนาแน่นของน้ำมัน

3.2.6 การวิเคราะห์สีของน้ำมันโดยใช้โลวิบอนด์ทินโทมิเตอร์ (Lovibond tintometer)

1) นำน้ำมันตัวอย่างใส่ลงในเซลล์บรรจุตัวอย่าง ให้ระดับของน้ำมันอยู่ห่างจากขอบบนเซลล์ประมาณ 1 เซนติเมตร แล้วนำไปวางไว้ในช่องใส่สารตัวอย่างที่อยู่ภายใต้เครื่องโลวิบอนด์ โดยวางเซลล์บรรจุตัวอย่างให้ชิดด้านที่อยู่ใกล้กับแถบสีมาตรฐานหรือกล้องเทียบสีมากที่สุด

2) ปิดฝาเครื่องให้สนิทเพื่อป้องกันแสงรบกวนจากภายนอก เปิดไฟ และมองผ่านกล้องเทียบสีหรือกล้องสำหรับดูตัวอย่าง ซึ่งภายในประกอบด้วยเลนส์ จะเห็นสีของน้ำมันตัวอย่างจากครึ่งวงกลมซ้ายมือ ครึ่งวงกลมขวามือเป็นแถบสีมาตรฐาน เลื่อนแถบสีมาตรฐาน ได้แก่ สีแดง สีเหลือง สีน้ำเงิน หรือสีผสม เพื่อให้มีการผสมของแม่สีให้ใกล้เคียงกับสีตัวอย่างมากที่สุด

3) อ่านค่าที่ได้ คือ สีแดง สีเหลืองและสีน้ำเงิน จากช่องวงกลมทางซ้ายมือของกล่องบรรจุแถบสีซึ่งมีหน่วยเป็นโลวิบอนด์สเกล (Lovibond scale)

3.3 วัสดุ-อุปกรณ์ เครื่องที่ใช้ในงานวิจัย

3.3.1 วัสดุที่ใช้ในการวิจัย

1) ปีกไก่ทั้งชนิดที่หมักและไม่หมักเครื่องปรุง

2) น้ำมันพืชที่ทำจากถั่วเหลือง

3) น้ำมันพืชที่ทำจากปาล์ม

4) น้ำมันหมู

3.3.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

1) ขวดก้นกลม (round-bottomed glass column) พร้อม groung-glass stoppers ขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร

2) บีกเกอร์ (beaker) ขนาด 100 มิลลิลิตร

3) คอลัมน์แก้ว (chromatographic glass column) เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 1 เซนติเมตร x ความยาว 30 เซนติเมตร

4) volumetric flask ขนาด 50 มิลลิลิตร

5) volumetric pipette ขนาด 5 มิลลิลิตร

6) แท่งแก้ว (glass rod)

7) stand

8) ช้อนตักสารเคมี (spoon)

9) จานกระเบื้อง (porcelain dish) เส้นผ่านศูนย์กลาง 20 เซนติเมตร

10) Thin layer chromatography

11) กรวยกรอง

12) กระดาษกรองเบอร์ 1 whatman

13) สำลี

14) sea sand

3.3.3 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1) ตู้อบ ยี่ห้อ Memmert ประเทศเยอรมันนี

2) เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง

3) เครื่องผสมยี่ห้อ VEPL Scienctific รุ่น Are 2

4) อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath)

5) เครื่องระเหยภายใต้สูญญากาศ (rotary evaporator)

6) เครื่องเขย่าสาร (shacker)

7) วิสโคมิเตอร์ (viscometer)

8) โลวิบอนด์ทินโทมิเตอร์ (Lovibond tintometer)

3.4 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1) กรดไฮโดรคลอริก AR grade, Merck

2) กรดสเตียริก AR grade, Merck

3) เอทานอล AR grade , Merck

4) เฮกเซน AR grade , Merck

5) ปิโตรเลียมอีเทอร์ AR grade , Merck

6) โซเดียมไฮดรอกไซด์ AR grade , Merck

7) โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ AR grade , Merck

8) โพแทสเซียมไอโอไดด์ AR grade, Merck

9) ไอโอดีน AR grade , Merck

10) กรดอะซิติก AR grade, Merck

11)โซเดียมไทโอไซยาเนต AR grade , Merck

12)ไอโซออกเทน AR grade , Merck

13) ซิลิกาเจล particle size 0.036 -0.2000 mm. (70 -230 mesh) MERCK N°7734

โดยปรับให้มีความชื้นร้อยละ 5 โดยอบซิลิกาเจลในจานกระเบื้องที่อุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียส

นานอย่างน้อย 4 ชั่วโมง และทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น หลังจากนั้นชั่งซิลิกาเจล 152 กรัม ใส่ในขวดก้นกลมปริมาตร 500 มิลลิลิตร ผสมน้ำ 8 กรัม ผสมให้เข้ากัน 1 ชั่วโมง โดยใช้เครื่องระเหยภายใต้สุญญากาศหรือเครื่องเขย่าสาร