บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 ขวดแก้วขนาด 2 ลิตร

3.1.2 หัวทราย

3.1.3 ตู้ปลาขนาด 10 × 18 × 12 นิ้ว

3.1.4 หลอดไฟวอมไวท์ 18 วัตต์ บริษัท จีอี ไลท์ติ้ง (ประเทศไทย) จำกัด

3.1.5 ปั๊มลมเล็ก รุ่น Magic 6600 ยี่ห้อ TWIN

3.1.6 ปั๊มลมใหญ่

3.1.7 ถังบรรจุ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ บริสุทธิ์ 99.99 % บริษัทธนบุรีวัฒนา จำกัด

3.1.8 ชุดเครื่องแก้ว

3.1.9 สายยางขนาดเล็ก

3.1.10 สายยางขนาดใหญ่

3.1.11 ตะเกียงแอลกอฮอล์

3.1.12 กระดาษลิตมัส

3.1.13 ลวดเขี่ยเชื้อปลายห่วง

3.1.14 หลอดทดลอง

3.1.15 ตะแกรง

3.2 เครื่องมือวิเคราะห์

3.2.1 เครื่อง Autoclaveบริษัท Astell Scientific ประเทศอังกฤษ

3.2.2 เครื่อง Centrifuge ยี่ห้อ Sanyo รุ่น MSE ประเทศอังกฤษ

3.2.3 เครื่อง UV-Visible Spectrophotometer ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น UV1601 ประเทศญี่ปุ่น

3.2.4 เครื่องชั่งทศนิยม 3 ตำแหน่งบริษัท Denver Instrument รุ่น TR-403 ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2.5 ตู้อบความร้อนแห้ง ยี่ห้อ Memmert รุ่น 500

3.2.6 ตู้เขี่ยเชื้อ

3.2.7 เครื่องอัลตราโซนิค Cole-Parmer 8891 บริษัท Chemosience (Thailand) Co.,Ltd.

3.2.8 เตาอบไมโครเวฟ รุ่น NW73V บริษัท ไทยซัมซุงอิเลคโทรนิกส์ จำกัด

3.2.9 เครื่องเขย่า (shaker) บริษัท Gallenkamp Made in UK

3.2.10 Vortex mixer Model 232 Made in U.S.A

3.2.11 Water bath Made in Germany

3.3 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

3.3.1 $CaCl_2$ บริษัท J.T.Baker ประเทศฝรั่งเศส

3.3.2 KNO_3 บริษัท J.T.Baker ประเทศฝรั่งเศส

3.3.3 $NaNO_3$ บริษัท Fluka Chemie ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

3.3.4 NaOH บริษัท Asia Pacific Specialty Chemicals Limited ประเทศออสเตรเลีย

3.3.5 H_3BO_3 บริษัท Asia Pacific Specialty Chemicals Limited ประเทศออสเตรเลีย

3.3.6 EDTA บริษัท J.T.Baker ประเทศฝรั่งเศส

3.3.7 Na_2CO_3 บริษัท Carlo Erba Reagent ประเทศอิตาลี

3.3.8 K_2HPO_4 บริษัท Asia Pacific Specialty Chemicals Limited ประเทศออสเตรเลีย

3.3.9 KH_2PO_4 บริษัท Asia Pacific Specialty Chemicals Limited ประเทศออสเตรเลีย

3.3.10 Fe EDTA บริษัท J.T.Baker ประเทศฝรั่งเศส

3.3.11 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ บริษัท J.T.Baker ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.3.12 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ บริษัท Asia Pacific Specialty Chemicals Limited ประเทศออสเตรเลีย

3.3.13 $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ บริษัท Asia Pacific Specialty Chemicals Limited ประเทศออสเตรเลีย

3.3.14 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ บริษัท Carlo Erba Reagent ประเทศฝรั่งเศส

3.3.15 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ บริษัท Carlo Erba Reagent ประเทศฝรั่งเศส

3.3.16 $NaMoO_4 \cdot 5H_2O$ บริษัท Carlo Erba Reagent ประเทศฝรั่งเศส

3.3.17 $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ บริษัท Asia Pacific Specialty Chemicals Limited ประเทศออสเตรเลีย

3.3.18 $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ บริษัท Asia Pacific Specialty Chemicals Limited ประเทศออสเตรเลีย

3.3.19 $Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O$ บริษัท J.T.Baker ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.3.20 Folin-Ciocalteu reagent บริษัท Merck ประเทศเยอรมัน

3.3.21 Sodium Potassium tartrate บริษัท Carlo Erba Reagent ประเทศฝรั่งเศส

3.3.22 Bovine Serum Albumin (BSA) บริษัท Fluka ประเทศเยอรมัน

3.3.23 Monosodium phosphate, monohydrate บริษัท Carlo Erba Reagent ประเทศฝรั่งเศส

3.3.24 Disodium phosphate, heptahydrate ยี่ห้อ Panreac

3.3.25 Citric Acid บริษัท Asia Pacific Specialty Chemicals Limited ประเทศออสเตรเลีย

3.3.26 Ferric Ammonium Citrate บริษัท J.T.Baker ประเทศฝรั่งเศส

3.3.27 Chloroform บริษัท RCI Labscan Limited ประเทศไทย

3.3.28 Methanol บริษัท J.T.Baker ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.3.29 NaCl บริษัท J.T.Baker ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.3.30 น้ำกลั่น

3.3.31 เอทานอล บริษัท J.T.Baker ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.3.32 กรดไฮโดรคลอริก บริษัท VWR INTERNATIONAL ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.3.33 กรดปาล์มเมติก บริษัท MERCK - Schuchardt ประเทศเยอรมัน

3.3.34 Isooctane บริษัท Ajex Finechem Pty Ltd. ประเทศออสเตรเลีย

3.3.35 Cupric acetate บริษัท Ajex Finechem Pty Ltd. ประเทศออสเตรเลีย

3.4 สภาวะในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย

เพาะเลี้ยงสาหร่ายพันธุ์ คลอเรลลา วูกาลิส (*Chlorella vulgaris*) ในอาหาร BG11 ที่สภาวะดังนี้ ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง 7 ให้แสงวอล์มไลท์

3.5 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.5.1 นำเชื้อสาหร่าย *Chlorella sp.* และ *Chlorella vulgaris* มาเลี้ยงในอาหารแข็งให้แสงตลอดเวลา เป็นเวลา 7 วัน (Stock culture)

3.5.2 อาหารเลี้ยงเชื้อสาหร่าย คือ BG11 ซึ่งเป็นอาหารสูตรที่นิยมใช้ในการเลี้ยงจุลสาหร่าย โดยมีองค์ประกอบดังแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 สูตรอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ BG11

สต๊อค	สารละลายสต๊อค (กรัมต่อลิตร)	ปริมาตร (มิลลิลิตรต่อลิตร)	สารละลาย (Trace solution) (กรัมต่อลิตร)	
$NaNO_3$	150	10	H_3BO_3	2.86
K_2HPO_4	40	1	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	1.81
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	75	1	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.222
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	36	1	Na $MoO_4 \cdot 5H_2O$	0.390
Citric Acid combined with Ferric Ammonium Citrate	6	1	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.079
EDTA	1	1	$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	0.0494
Na_2CO_3	20	1	-	-
Trace Metal solution	See right	1	-	-

เมื่อได้อาหารเลี้ยงเชื้อตามสูตรข้างต้นแล้วต้องทำการปรับค่าความเป็นกรดด่าง เริ่มต้นให้ได้ค่าตามที่ได้ออกแบบการทดลองไว้แล้วตามหัวข้อที่ 3.4 ด้วยสารละลาย NaOH จากนั้นใส่สารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟตลงไปเพื่อควบคุมค่าความเป็นกรดด่าง ลงในอาหารเหลว ให้ได้ค่าความเป็นกรดด่าง ประมาณ 7 ซึ่งสามารถเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟตได้จาก Monosodium phosphate,monohydrate ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$) 0.2918 กรัม และ Disodium phosphate, heptahydrate ($Na_2HPO_4 7H_2O$) 0.7733 กรัม ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรแล้วเติมน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิกรัม

ตารางที่ 3.2 การเตรียมบัฟเฟอร์

ค่าความเป็นกรดด่าง	% $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	% $Na_2HPO_47H_2O$
6.7	0.4098	0.5442
6.8	0.3708	0.6199
6.9	0.3311	0.697
7	0.2918	0.7733
7.1	0.2539	0.847
7.14	0.2393	0.8753
7.2	0.2128	0.9163
7.3	0.1853	0.98
7.4	0.1558	1.0374

อาหารเลี้ยงเชื้อ และอุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเชื้อ ต้องต้มฆ่าเชื้อในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

การเตรียมเชื้อสาหร่ายก่อนทำการทดลอง โดยทำการถ่ายเชื้อเซลล์สาหร่ายจาก Stock culture ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารเหลวปริมาณ 100 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องและได้รับแสงเป็นเวลานาน 7 วัน จึงสามารถนำเชื้อไปใช้ในการทดลองได้ โดยอัตราส่วนระหว่างเชื้อกับอาหารเหลว คือ 1 หลอดทดลองต่ออาหารเหลว 100 มิลลิลิตร

3.6 วิธีการเลี้ยงสาหร่าย

3.6.1 นำเชื้อสาหร่ายที่เตรียมไว้ตามหัวข้อที่ 3.5 ถ่ายลงในขวดโหลใสที่มีอาหารเหลวอยู่ 3 ลิตร แล้วไปวางในตู้ปลาที่มีน้ำหล่อเย็นอยู่ ให้แสงจากหลอดไฟวอร์มไลท์ 18 วัตต์

3.6.2 ทำการป้อนเฉพาะอากาศเข้าสู่ตู้ปลาที่มีสารละลายสาหร่ายอยู่จำนวน 3 ลิตร ทำการเพาะเลี้ยงทั้งสิ้น 7 - 14 วัน

3.6.3 เมื่อครบ 7 - 14 วัน จึงนำสารละลายสาหร่ายไปกรองด้วยผ้ากรอง

3.6.4 จากนั้นนำสาหร่ายที่ได้ไปอบแห้งในเครื่องอบความร้อน จนน้ำหนักของสาหร่ายไม่เปลี่ยนแปลง

3.7 วิธีการวิเคราะห์ความชื้นของจุลสาหร่าย

3.7.1 นำครูซิเบิ้ลพร้อมฝาไปอบที่อุณหภูมิ 107 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้นเป็นเวลาครึ่งชั่วโมง แล้วชั่งน้ำหนัก

3.7.2 ชั่งจุลสาหร่ายน้ำหนัก 0.5 กรัม ใส่ลงในครูซิเบิ้ล นำไปอบที่อุณหภูมิ 107 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื่นเป็นเวลาครึ่งชั่วโมงแล้วนำไปชั่ง

การคำนวณเปอร์เซ็นต์ความชื้น

$$W = \frac{(M_1 - M_2)}{M_1} \times 100$$

W = เปอร์เซ็นต์ความชื้น (โดยน้ำหนักแห้ง)

M_1 = น้ำหนักจุลสาหร่ายก่อนอบ

M_2 = น้ำหนักจุลสาหร่ายหลังอบ

3.8 วิธีการสกัดไขมันจากจุลสาหร่าย

การสกัดไขมันจากจุลสาหร่ายนั้นก่อนอื่นต้องทำให้ผนังเซลล์ของจุลสาหร่ายแตกก่อน เพราะผนังเซลล์ของจุลสาหร่ายมีความเข็งแรงมาก จึงต้องทำการแตกผนังเซลล์ก่อน และการแตกผนังเซลล์ และกรรมวิธีที่ใช้คือ ไมโครเวฟ อัลตราโซนิค และออสโมติกช็อค ที่เงื่อนไขต่างๆ ส่วนตัวทำละลายที่ใช้คือ คลอโรฟอร์มและเมทานอล ในอัตราส่วน 2:1 โดยคลอโรฟอร์มจะทำหน้าที่ในการทำละลายไขมันจากจุลสาหร่าย และเมทานอลทำหน้าที่เป็นตัวทำละลายคลอโรฟิลล์

3.8.1 การสกัดไขมันจากจุลสาหร่ายด้วยเครื่องอัลตราโซนิค

การสกัดไขมันจากจุลสาหร่ายด้วยเครื่องอัลตราโซนิค โดยใช้เซลล์จุลสาหร่ายแห้ง 0.5 กรัมผสมน้ำกลั่น 30 เพื่อทำการแตกเซลล์โดยทำการปรับเครื่องอัลตราโซนิคให้มีอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ไล่ก๊าซ 1 นาที แล้วทำการแตกเซลล์ด้วยเครื่องเป็นเวลา 10 20 และ30 นาที เมื่อทำการแตกตัวเซลล์ของจุลสาหร่ายแล้วก็นำจุลสาหร่ายที่ทำการแตกเซลล์แล้วมาเติมตัวทำละลายลงไป ตัวทำละลายที่ใช้คือ คลอโรฟอร์ม และเมทานอล ในอัตราส่วน 2:1 นำไปเข้าเครื่องเขย่าเพื่อให้สารละลายผสมเข้ากัน ทำให้ความสามารถของการชะไขมันออกจากเซลล์จุลสาหร่ายดีขึ้นเป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นนำมาเทใส่กรวยแยก ไขสารละลายออกจากกรวยแยก นำไปปั่นแยกต่อ 10 นาทีเพื่อให้สารละลายและสาหร่ายแยกตัวออกจากกันอย่างชัดเจน แยกชั้นคลอโรฟอร์มที่มีน้ำมันผสมอยู่ออกมาทำการระเหยคลอโรฟอร์มออกโดยการนำเข้าเตาอบ อบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส

หลังจากการอบแห้งเสร็จ นำไปเข้าโถดูดความชื้นเป็นเวลาครึ่งชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปชั่งจะได้น้ำหนักของไขมัน

3.8.2 การสกัดไขมันจากจุลสาหร่ายด้วยวิธีออสโมติกช็อค

การสกัดไขมันจากจุลสาหร่ายด้วยวิธีออสโมติกช็อคโดยใช้เซลล์จุลสาหร่ายแห้ง 0.5 กรัมผสมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 10 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 30 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ หลังจากนั้นห่อปิดขวดรูปชมพู่ด้วยฟอล์ยให้มิดชิดเพื่อป้องกันแสงจากภายนอก หลังจากนั้นวางทิ้งไว้เพื่อให้เซลล์สาหร่ายแตกตัวเป็นเวลา 2 วัน เมื่อทำการแตกตัวเซลล์ของจุลสาหร่ายแล้วก็นำจุลสาหร่ายที่ทำการแตกเซลล์แล้วมาเติมตัวทำละลายลงไป ตัวทำละลายที่ใช้คือ คลอโรฟอร์มและเมทานอล ในอัตราส่วน 2:1 นำไปเข้าเครื่องเขย่าเพื่อให้สารละลายผสมเข้ากันเพื่อให้ความสามารถของการชะไขมันออกจากเซลล์จุลสาหร่ายดีขึ้นเป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นนำมาเทใส่กรวยแยก ไขสารละลายออกจากกรวยแยก นำไปปั่นแยกต่อ 10 นาทีเพื่อให้สารละลายและสาหร่ายแยกตัวออกจากกันอย่างชัดเจน แยกชั้นคลอโรฟอร์มที่มีน้ำมันผสมอยู่ออกมาทำการระเหยคลอโรฟอร์มออกโดยการนำเข้าเตาอบ อบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส หลังจากการอบแห้งเสร็จนำไปเข้าโถดูดความชื้นเป็นเวลาครึ่งชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปชั่งจะได้น้ำหนักของไขมัน

3.8.3 การสกัดไขมันจากจุลสาหร่ายด้วยวิธีไมโครเวฟ

การสกัดไขมันจากจุลสาหร่ายด้วยวิธีไมโครเวฟ โดยใช้เซลล์จุลสาหร่ายแห้ง 0.5 กรัม ผสมน้ำ 30 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่องไมโครเวฟที่พลังงาน 100 วัตต์ เป็นเวลา 10 20 และ 30 นาที เมื่อทำการแตกตัวเซลล์ของจุลสาหร่ายแล้วก็นำจุลสาหร่ายที่ทำการแตกเซลล์แล้วมาเติมตัวทำละลายลงไป ตัวทำละลายที่ใช้คือ คลอโรฟอร์ม และเมทานอล ในอัตราส่วน 2:1 นำไปเข้าเครื่องเขย่าเพื่อให้สารละลายผสมเข้ากันเพื่อให้ความสามารถของการชะไขมันออกจากเซลล์จุลสาหร่ายดีขึ้นเป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นน้ำมาเทใส่กรวยแยก ไขสารละลายออกจากกรวยแยก นำไปปั่นแยกต่อ 10 นาทีเพื่อให้สารละลายและสาหร่ายแยกตัวออกจากกันอย่างชัดเจน แยกชั้นคลอโรฟอร์มที่มีน้ำมันผสมอยู่ออกมาทำการระเหยคลอโรฟอร์มออกโดยการนำเข้าเตาอบ อบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส หลังจากการอบแห้งเสร็จ นำไปเข้าโถดูดความชื้นเป็นเวลาครึ่งชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปชั่งจะได้น้ำหนักของไขมัน

3.9 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดไขมันจากจุลสาหร่าย

จากการสกัดไขมันจากจุลสาหร่ายด้วยทั้งสามวิธีข้างต้น แล้วนำไขมันจากการสกัดของทั้งสามวิธีมาเปรียบเทียบ เมื่อได้วิธีที่จะสกัดไขมันจากจุลสาหร่ายที่เหมาะสมที่สุด จะใช้วิธีนั้นมาหาสภาวะที่จะสามารถสกัดไขมันจากจุลสาหร่ายได้ปริมาณมากที่สุด

3.10 การวิเคราะห์ความชื้นของไขมันที่ได้จากการสกัด

หลังจากการสกัดไขมันจากจุลสาหร่ายแล้วไขมันจากการสกัดที่ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส จนแห้งแล้วทำการวิเคราะห์หาความชื้น โดย

3.10.1 นำไขมันจากการสกัดที่อยู่ในหลอดทดลองอบจนแห้งที่เก็บในโถดูดความชื้นชั่งเพื่อหาน้ำหนักของผลได้

3.10.2 นำหลอดทดลองที่มีไขมันจากการสกัดที่ทราบน้ำหนักแน่นอนอบในเตาอบที่อุณหภูมิ 107 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้นเป็นเวลาครึ่งชั่วโมง ชั่งเพื่อหาน้ำหนักที่เหลือ

การคำนวณเปอร์เซ็นต์ความชื้น

$$W = \frac{(M_1 - M_2)}{M_1} \times 100$$

W = เปอร์เซ็นต์ความชื้น

M_1 = น้ำหนักไขมันจากการสกัดก่อนอบ

M_2 = น้ำหนักไขมันจากการสกัดหลังอบ

3.11 การวิเคราะห์หากรดไขมัน

เมื่อทำการวิเคราะห์ผลจากการสกัดไขมันจากจุลสาหร่ายด้วยวิธีต่างๆ แล้ว นำไขมันที่ได้จากการสกัดมาวิเคราะห์กรดไขมัน เพื่อยืนยันว่าผลที่ได้จากการสกัดมีองค์ประกอบของกรดไขมันจริง

3.11.1 การเตรียมสารเคมี

3.11.1.1 เตรียม 5 เปอร์เซ็นต์ cupric acetate (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยชั่ง cupric acetate (copper reagent) 25 กรัม ละลายในน้ำกลั่นประมาณ 450 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6.1 ด้วย pyridine ปรับปริมาตรให้เป็น 500 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น กรองก่อนเก็บไว้

3.11.1.2 สารละลายกรดไขมันอิสระมาตรฐาน (Stock standard) 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งกรดปาล์มเมติก 0.25 กรัม ละลายใน isooctane และปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

3.11.1.3 สารละลายกรดไขมันอิสระที่มีความเข้มข้นต่างๆ กัน (working standard) จากสารละลายกรดกรดปาล์มเมติก 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำมาเจือจางด้วย isooctane

ตารางที่ 3.3 ปริมาณของกรดปาล์มเมติกที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อใช้ในการเตรียมกราฟมาตรฐาน (standard curve)

ความเข้มข้นของกรดปาล์มเมติก (มิลลิกรัม/3 มิลลิลิตรของสารละลาย)	ปริมาตรของ Stock standard (มิลลิลิตร)	ปริมาตรของ Isooctane (มิลลิลิตร)
0.25	0.10	2.90
0.50	0.20	2.80
1.00	0.40	2.60
2.00	0.80	2.20
3.00	1.20	1.80
4.00	1.60	1.40
5.00	2.00	1.00

3.11.1.4 เอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ตวง absolute ethanol 800 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรครบ 1000 มิลลิลิตร

3.11.1.5 การเตรียม 0.5 M KOH ในเอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ชั่งโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 28.055 กรัม ละลายในเอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) แล้วทำปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร ด้วยเอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์

3.11.1.6 การเตรียม 1 M HCl ตวงกรดไฮโดรคลอริก 30 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) 121.67 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรจนครบ 1,000 มิลลิลิตร

3.11.2 การเตรียมกราฟมาตรฐานสำหรับกรดไขมันอิสระ

ปิเปตสารละลายกรดปาล์มเมติก ความเข้มข้นต่างๆกัน คือ 0.25 0.50 1.00 2.00 3.00 4.00 และ 5.00 มิลลิกรัมต่อ 3 มิลลิลิตร (ตามตารางที่ 3.3) อย่างละ 3 มิลลิลิตร ลงในจุกหลอดเกลียว เติมสารละลาย copper reagent 1.0 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลอด ปิดจุกและเขย่าด้วย vortex mixer ประมาณ 1 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้สักครู่จนสารละลายในแต่ละหลอดแยกชั้นกัน ดูดสารละลายส่วนบนไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 704 นาโนเมตร เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารละลายกรดปาล์มเมติก

3.11.3 การหาปริมาณกรดกรดไขมันจากสาหร่าย

นำไขมันที่ได้จากการสกัดมาเติม 0.5 M KOH ในเอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 4.0 มิลลิลิตร ปิดจุกให้แน่น ทำปฏิกิริยาที่ 100 องศาเซลเซียส ใน water bath เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบกำหนดเวลา ทำให้เย็นลง เติม 1 M HCl 5.0 มิลลิลิตร และ Isooctane 5.0 มิลลิลิตร เขย่าด้วย vortex mixer ประมาณ 1 นาที เพื่อสกัดให้กรดไขมันอิสระมาอยู่ในชั้นของ Isooctane ทิ้งไว้จนสารละลายแยกชั้นกัน ใช้ปิเปตดูดน้ำส่วนล่างทิ้ง แล้วเติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร เขย่าด้วย vortex mixer ประมาณ 1 นาที ตั้งทิ้งไว้สักครู่จนสารละลายแยกชั้น ดูดสารละลายส่วนบน 3.0 มิลลิลิตร มาทำปฏิกิริยากับ copper reagent ปริมาณกรดปาล์มเมติกหาได้โดยการเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้จากกราฟมาตรฐาน