

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สารเคมีและวัสดุ

สารสีเหลือง disodium 2-hydroxyl-1-(4-sulfonatophenylazo)naphthalene-6-sulfonate สารสีแดง trisodium 2-hydroxyl-1-(4-sulfonato-1-naphthylazo)naphthalene-6,8-disulfonate สารสีชมพู disodium 2-(2-,4,5,7-tetraiodo-3-oxido-6-oxoxanthen-9-yl)benzoate monohydrate สารสีฟ้า disodium alpha-(4-(N-ethyl-3-sulfonatobenzyl amino) phenyl)-alpha-(4-N-ethyl 3- sulfonatobenzylamino, cyclohexa-2,5-dienylidene)toluene-6-sulfonate จากบริษัท Roha Dyeclean ประเทศอินเดีย

สารละลายเอทานอล 10%

โปรตีนมาตรฐาน (Bovine Serum Albumin; BSA) จากบริษัท Fluka

แอลกอฮอล์บริสุทธิ์ (absolute alcohol 99%)

คอปเปอร์ซัลเฟต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)

โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เตรต (Na-K tartrate)

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

โปตัสเซียมไอโอไดด์ (KI)

น้ำกลั่น

3.2 อุปกรณ์

เครื่องแก้ว

เครื่องชั่งสาร ทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น AE-200

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงสเปกโตรโฟโตมิเตอร์รุ่น UV-1601 ยี่ห้อ Shimadzu

เครื่องคอมพิวเตอร์ที่มีโปรแกรมการใช้งานกับเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์รุ่น 1.06H ยี่ห้อ Thunderbird

โปรแกรมถ่ายภาพ Mil

โปรแกรมวัดสี Image-Pro Plus 3.0

คอมพิวเตอร์พีซี

กล้องโซนี่ PC 1

ปีเปิดต้นขนาด 100 และ 1000 ไมโครลิตร

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 ศึกษาค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารละลายสีเหลือง สีแดง สีชมพู และ สีฟ้า จากสเปกโตรโฟโตมิเตอร์กับค่าสีที่วิเคราะห์จากภาพถ่าย

3.3.1.1 การเตรียมสารละลายสีมาตรฐานนำสีมาตรฐานที่ใช้ในการศึกษา คือ สีเหลือง สีแดง สีฟ้า และสีชมพู ปริมาณ 10 มิลลิกรัม มาละลายในสารละลายเอทานอล เข้มข้น 10% เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสในที่มืด

3.3.1.2 การหาค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{max}) ของสารละลายสีมาตรฐาน นำสารละลายสีมาตรฐานที่เตรียมได้จากข้อ 3.1.1 มาสแกนหาค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของแต่ละสี ในช่วง 400-800 นาโนเมตร

3.3.1.3 ศึกษาความสัมพันธ์ของค่าสีที่วัดได้กับปริมาณของสารโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ Mil และ Image Pro Plus 3.0 โดยทำการวิเคราะห์ผลของค่าแสงสีเขียว ในระบบ แสงสีแดง สีเขียว สีน้ำเงิน วางตำแหน่งสารที่ต้องการวัดให้อยู่ในหลอดทดลองปริมาตร 10 มิลลิลิตร จับยึดไว้บนขาตั้ง สูงจากพื้น 25 เซนติเมตรในระยะห่างจากกล้องถ่ายภาพโซนี่ PC-1 เป็นระยะห่าง 80 เซนติเมตร โดยให้แหล่งกำเนิดแสงมีระยะห่างจากหลอดทดลองเป็นระยะห่าง 60 เซนติเมตร โดยให้แสงมีปริมาณโฟตอนที่คงที่หลังจากทำการปล่อยแสงนาน 10 นาทีผ่านสัญญาณภาพของหลอดทดลองจากกล้องถ่ายภาพ โซนี่ PC-1 เข้าสู่คอมพิวเตอร์ โดยแปลงสัญญาณภาพผ่านการ์ด Meteor1 จากนั้นคำนวณค่าของสีที่วัดได้

3.3.2 ศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณสารสีมาตรฐานที่วัดได้จากสเปกโตรโฟโตมิเตอร์กับการวัดปริมาณของสีจากภาพถ่าย

เตรียมสารละลายสีมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยนำสารละลายสี เหลือง สีแดง สีชมพู และสีฟ้าที่อยู่ในสารละลายเอทานอลที่ความเข้มข้น 10% ซึ่งเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสในที่มืดมาทำการเจือจางให้มีความเข้มข้นของสารในช่วง 0.04-40 นาโนโมลต่อมิลลิลิตร และวิเคราะห์เปรียบเทียบโดยวิธีสเปกโตรสโคปีกับการวิเคราะห์จากภาพถ่าย

จากนั้นหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณเนื้อสาร ความสัมพันธ์ระหว่างค่าสีจากภาพถ่ายกับปริมาณเนื้อสาร กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับค่าสีจากภาพถ่าย

3.3.3 ศึกษาความสัมพันธ์ที่จากการวิเคราะห์หาโปรตีน โดยวิธีไบยูเรต(Oser 1965) ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์กับค่าสีที่วัดจากภาพถ่าย

3.3.3.1 การเตรียมโปรตีนวิเคราะห์เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณ โดยวิธีไบยูเรต

เตรียมสารละลาย BSA ให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0-14 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเตรียมน้ำยาไบยูเรต โดยละลาย $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ปริมาณ 1.5 กรัม ผสมกับโซเดียมโปแตสเซียมทาร์เตรท 6 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 10% (w/v) ของ NaOH ปริมาตร 300 มิลลิลิตรและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1 ลิตร เติม KI จำนวน 1 กรัม ผสมให้เข้ากันและเก็บสารละลายในขวดพลาสติกที่มีมืด

3.3.3.2 วิธีการวิเคราะห์โดยวิธีไบยูเรต

ดูดสารละลายโปรตีนมาตรฐานความเข้มข้นละ 0.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายไบยูเรตจำนวน 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร และใช้น้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตรผสมกับสารละลายไบยูเรต 2 มิลลิลิตร เป็นสารเปรียบเทียบ ทำการวิเคราะห์หาปริมาณ โปรตีนโดยวิธีไบยูเรตด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์และจากภาพถ่าย นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาสร้างกราฟหาความสัมพันธ์ ดังต่อไปนี้กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณเนื้อสาร กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าสีจากภาพถ่ายกับปริมาณเนื้อสาร กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง กับ ค่าสีจากภาพถ่าย

3.4 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

การหาค่าสหสัมพันธ์ของสมการเชิงเส้น(Ott 1977)