

บทที่ 3

อุปกรณ์ และวิธีทดลอง

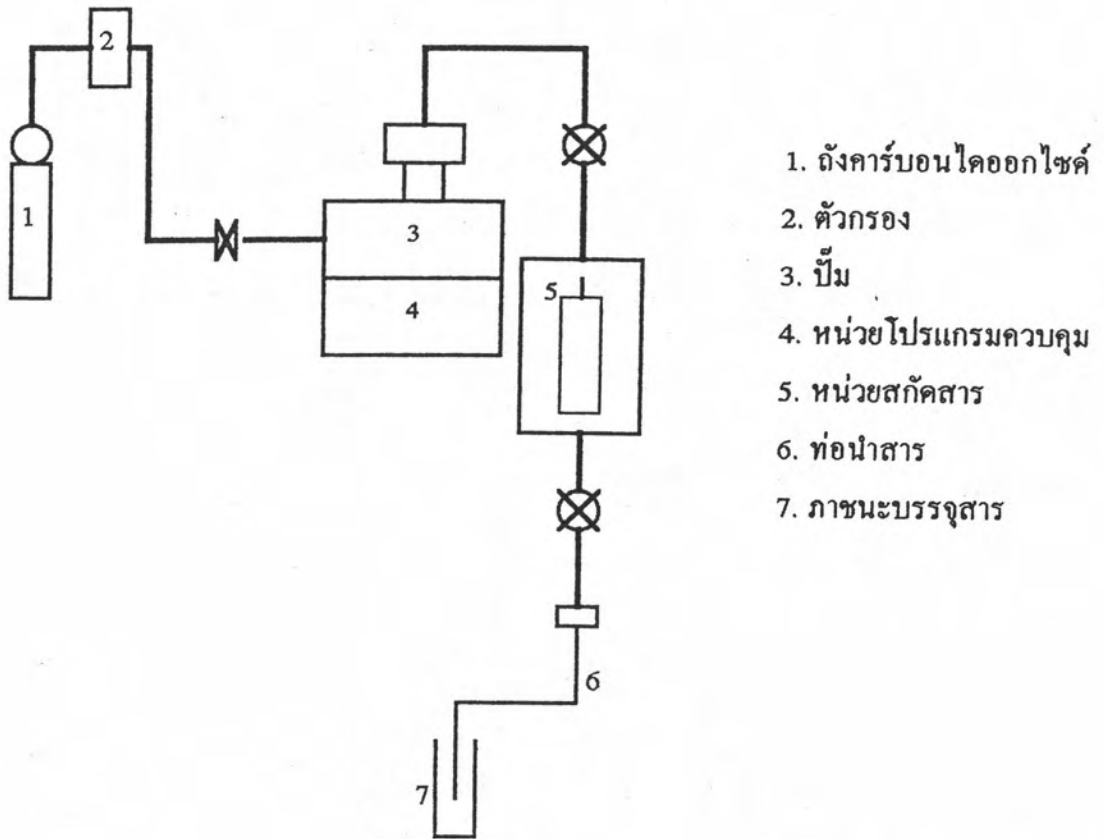
การศึกษากการสกัดอะซาดิแรคตินจากเมล็ดสะเดาด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นการศึกษาศามารถในการใช้คาร์บอนไดออกไซด์เป็นตัวทำละลาย เพื่อสกัดอะซาดิแรคตินออกจากเนื้อในเมล็ดสะเดาและใช้คาร์บอนไดออกไซด์ผสมกับตัวทำละลายร่วม อะซาดิแรคตินที่สกัดได้จะอยู่ในรูปสารละลายสามารถดูดซับไว้ในถ่านกัมมันต์และทำการชะละลายด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ในสภาพของไหลเหนือจุดวิกฤต วิเคราะห์หาปริมาณอะซาดิแรคตินด้วยเครื่อง HPLC (high performance liquid chromatography)

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องสกัดสารในสภาพของไหลเหนือจุดวิกฤต (model SFX-220, บริษัท Isco)

เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการสกัดอะซาดิแรคตินออกจากเนื้อในเมล็ดสะเดาหรือใช้ในการชะละลายอะซาดิแรคตินออกจากถ่านกัมมันต์ มีแผนผังการทำงาน ดังรูปที่ 3.1 ประกอบด้วยถังแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (carbon dioxide tank) ตัวกรอง (filter) ป้อนแรงดันสูง (syringe pump) หน่วยโปรแกรมควบคุมการทำงาน (controller) หน่วยสกัด (extractor chamber) ท่อนำสารออกจากหน่วยสกัด (restrictor) ภาชนะรองรับสาร (collection vial) ลักษณะของเครื่องดังรูปที่ 3.2

คาร์บอนไดออกไซด์จะถูกส่งไปตามท่อแก๊สขนาด 0.125 นิ้วผ่านตัวกรองแก๊ส เข้าสู่ปั๊มแรงดันสูง ซึ่งต่อเชื่อมกับหน่วยโปรแกรมควบคุมการทำงาน คาร์บอนไดออกไซด์จะเข้าสู่หน่วยสกัดสารซึ่งภายในบรรจุวัสดุคิบที่ต้องการสกัดที่ความดัน อุณหภูมิและเวลาที่กำหนด ในขณะที่สกัดอะซาดิแรคตินจะถูกสกัดออกมาและละลายอยู่ในของไหลเหนือจุดวิกฤต เคลื่อนที่ไปตามท่อนำสาร และเก็บอะซาดิแรคตินในภาชนะบรรจุสาร ซึ่งบรรจุด้วยตัวทำละลายเมทานอล สำหรับคาร์บอนไดออกไซด์เมื่อออกมาแล้วจะระเหยสู่บรรยากาศ



รูปที่ 3.1 แผนผังของเครื่องสักระยะในสภาพของไหลเหนือจุดวิกฤต

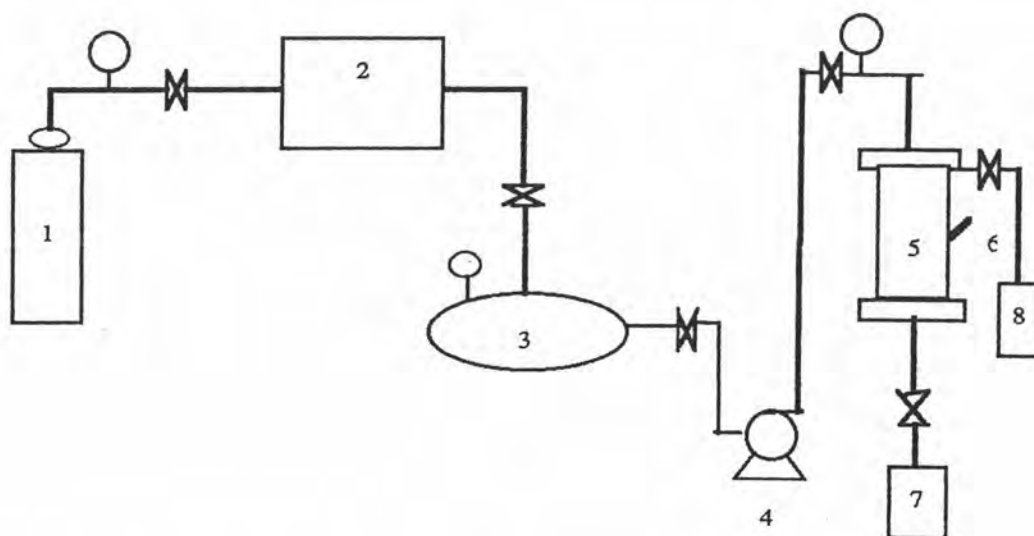


รูปที่ 3.2 เครื่องสักระยะในสภาพของไหลเหนือจุดวิกฤต

2. เครื่องมือการสักระยะชนิดเรคตินด้วยคาร์บอนไดออกไซด์และตัวทำละลายร่วม

เครื่องมือการสกัดอะซาดิแรคตินด้วยคาร์บอนไดออกไซด์และตัวทำละลายร่วม มีแผนผังการทำงานดังรูปที่ 3.3 ประกอบด้วย ท่อแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์, หน่วยทำความเย็น, ถังพักคาร์บอนไดออกไซด์เหลว(รูปที่ 3.4), เครื่องสูบลมแรงดันสูง, เครื่องปฏิกรณ์เคมีแบบถังกวน (รูปที่ 3.5), อุปกรณ์ควบคุมอุณหภูมิ และอุปกรณ์วัดปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์

แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ที่ออกจากถังแก๊ส จะผ่านตัวควบคุมความดันแล้วผ่านเข้าท่อทองแดงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.125 นิ้ว แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์จะผ่านเข้าหน่วยทำความเย็นเพื่อให้คาร์บอนไดออกไซด์ควบแน่นเป็นของเหลวและเข้าสู่ถังพักคาร์บอนไดออกไซด์เหลว โดยมีปั๊มทำหน้าที่ปั๊มแก๊สเข้าสู่เครื่องปฏิกรณ์เคมีแบบถังกวน เมื่อทำการสกัดตามเวลา อุณหภูมิและความดันที่กำหนด จากนั้นจะปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์ออกจากเครื่องปฏิกรณ์เคมีแบบถังกวนจนกระทั่งความดันภายในเครื่องปฏิกรณ์เคมีเท่ากับความดันบรรยากาศ และวัดปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ที่ปล่อยออกมา



- | | |
|----------------------------|-------------------------------------|
| 1. ถังแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ | 5. เครื่องปฏิกรณ์เคมี |
| 2. หน่วยทำความเย็น | 6. อุปกรณ์ควบคุมอุณหภูมิ |
| 3. ถังพักคาร์บอนไดออกไซด์ | 7. ภาชนะรองรับสาร |
| 4. เครื่องสูบลมแรงดันสูง | 8. อุปกรณ์วัดปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ |

รูปที่ 3.3 แผนผังการสกัดอะซาดิแรคตินด้วยคาร์บอนไดออกไซด์กับตัวทำละลายร่วม



รูปที่ 3.4 ถังพักคาร์บอนไดออกไซด์เหลว



รูปที่ 3.5 เครื่องปฏิกรณ์เคมีแบบถังกวน

3. การวิเคราะห์อะซาดิแรคตินด้วยเครื่องHPLC (model HP- 1090 with Photo-Diode-Array Detector บริษัท Hewlett-Packard)

เป็นเครื่องมือวิเคราะห์ที่ใช้ในการแยกสารผสมออกจากกัน เพื่อหาชนิดและปริมาณองค์ประกอบในสารผสม ประกอบด้วยตัวพาสารละลาย, ปัม, เครื่องฉีดสาร, คอลัมน์, เครื่องตรวจวัดปริมาณสารและเครื่องแปรสัญญาณ

การทำงานของเครื่องเริ่มจากการนำตัวทำละลายที่ใช้เป็นวัฏภาคตัวพา นำมาผ่านตัวกรองเพื่อขจัดสิ่งสกปรกต่างๆและไล่ฟองอากาศออกก่อน จากนั้นใช้ปั๊มดันตัวทำละลายให้เข้าสู่คอลัมน์ ขณะเดียวกันก็พาเอาสารผสมที่ฉีดเข้าบริเวณเครื่องฉีดสารเข้าสู่คอลัมน์ เพื่อแยกสารประกอบแต่ละชนิด โดยสารแต่ละชนิดจะเคลื่อนที่ไปด้วยความเร็วที่แตกต่างกัน เนื่องจากมีความแตกต่างของการยึดไว้ที่ stationary phase สารแต่ละชนิดที่แยกออกมา สามารถวัดความเข้มข้นของสารได้ด้วยเครื่องตรวจวัด บันทึกผลที่ได้จากเครื่องตรวจวัด ปรากฏเป็นยอดกราฟของสารต่างๆ

ตัวพาสารละลาย อาจเป็นของเหลวบริสุทธิ์หรือของเหลวผสม งานวิจัยนี้ใช้อัตราส่วนของน้ำต่ออะซีโตนไทรออยละ 60 ต่อ 40 มีแก๊สฮีเลียม (helium gas) เป็นตัวไล่ฟองอากาศโดยมีปั๊มดูดตัวทำละลายมาผสมกัน จากนั้นตัวทำละลายผสมจะถูกส่งผ่านไปยังคอลัมน์ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่สำคัญที่สุด งานวิจัยนี้ใช้คอลัมน์ชนิด Spherisorb ODS-II ความยาว 244 x 4 มิลลิเมตร และบริเวณระหว่างเครื่องฉีดสารและคอลัมน์จะมีการคอคอลัมน์ เป็นตัวกรองสารตัวอย่างอีกชั้นหนึ่ง สำหรับเครื่องฉีดสารอยู่บริเวณหัวคอลัมน์ทำหน้าที่ฉีดสารที่ต้องการแยกให้เข้าสู่ส่วนคอลัมน์ สารตัวอย่างที่นำมาฉีดต้องผ่านขั้นตอนขจัดสิ่งสกปรกต่างๆออกไปให้ได้หลายวิธี งานวิจัยนี้จะกรองสารตัวอย่างโดยผ่านตัวกรองเซลลูโลสอะซีเตท ขนาด 0.45 ไมครอน (cellulose acetate membrane filter 0.45 μm) และบริเวณระหว่างปั๊มและเครื่องฉีดสารจะมีตัวกรองที่เป็นคอลัมน์สั้นๆ (pre column) ใช้ป้องกันระบบในกรณีที่สารตัวอย่างมีค่าความเป็นกรด-ด่างสูงๆ ใช้เครื่องตรวจวัดชนิดช่วงการดูดกลืนคลื่นแสงอุลตราไวโอเลต (UV -visible detector) และมีเครื่องแปรสัญญาณทำหน้าที่แปรสัญญาณจากเครื่องตรวจวัดปรากฏออกมาเป็นยอดกราฟ

วัตถุดิบและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. เนื้อโนเมล็ดสะเดา บริษัท พฤษณ์ จำกัด
2. ถ่านกัมมันต์ชนิดเม็ด บริษัท ที.เอ็ม.ดี จำกัด
3. เฮกเซนเกรดการค้ำ บริษัท รุ่งทรัพย์ จำกัด
4. เมทานอลเกรดการค้ำ บริษัท พีแอนด์เอ็น จำกัด
5. เอทานอลเกรดการค้ำ บริษัท พีแอนด์เอ็น จำกัด
6. เมทานอลเกรดสำหรับเครื่อง HPLC บริษัท Merck
7. อะซีโตรไนไตรเกรดวิเคราะห์ บริษัท Merck
8. สารมาตรฐานอะซาดิแรคติน ความบริสุทธิ์ร้อยละ 95 บริษัท Sigma
9. แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ความบริสุทธิ์ร้อยละ 95 บริษัท เลียงฮงใต้ จำกัด

การคำนวณการวิจัย

การหาปริมาณน้ำมันสะเคาและอะซาดิแรคตินจากเนื้อในเมล็ดสะเคา

การศึกษาสมบัติเบื้องต้นของสะเคาซึ่งใช้เป็นวัตถุดิบในการทดลอง เพื่อใช้เป็นแนวทางในการดำเนินงานวิจัยในขั้นต่อไป ทำการศึกษาวิธีการต่างๆ ได้แก่

1. การหาปริมาณน้ำมันสะเคาคด้วยวิธี Soxhlet

ทำการบดเนื้อในเมล็ดสะเคาขนาดอนุภาคเฉลี่ย 875 ไมโครเมตร ชั่งน้ำหนักอย่างละเอียด 10 กรัม ใส่ในกรวยกระดาษ (soxhlet thimble) เติมหักทำละลายเฮกเซน 100 มิลลิลิตร ปรับอุณหภูมิให้ความร้อน (heating mantle) 40 องศาเซลเซียส ใช้ปั๊มดูดให้เป็นระบบสุญญากาศ เพื่อลดอุณหภูมิของจุดเดือดให้ต่ำลง เฮกเซนจะระเหยและกลั่นตัวเป็นของเหลวจนได้ระดับหนึ่งจะเกิดการไหลย้อนกลับมาที่ขวดก้นกลม สกัดจนตัวทำละลายใส ใช้เวลาในการสกัด 16 ชั่วโมง นำสารละลายที่สกัดได้ไประเหยเฮกเซนออก โดยใช้เครื่องระเหยหมุนแบบสุญญากาศ นำน้ำมันสะเคาที่ได้ อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นำมาใส่ใน desiccator ทิ้งไว้ให้เย็นชั่งน้ำหนัก ทำจนกระทั่งน้ำหนักต่างกันไม่เกิน 0.001 กรัม บันทึกน้ำหนักที่ได้

$$\text{การคำนวณ ร้อยละของปริมาณน้ำมันสะเคา} = \frac{(W_1 - W_2) \times 100}{W_3}$$

W_1 = น้ำหนักของภาชนะและน้ำมันสะเคาที่ระเหยเฮกเซนจนน้ำหนักคงที่ (กรัม)

W_2 = น้ำหนักของภาชนะ (กรัม)

W_3 = น้ำหนักของตัวอย่าง (กรัม)

2. การหาปริมาณอะซาดิแรคตินด้วยวิธี Soxhlet

สะเคาที่สกัดน้ำมันออกแล้วจากข้อ 1 นำมาสกัดต่อด้วยตัวทำละลายเมทานอล 100 มิลลิลิตร อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ใช้ปั๊มดูดให้เป็นระบบสุญญากาศ สกัดจนกระทั่งสารละลายใสใช้เวลาทั้งหมด 24 ชั่วโมง วัดปริมาตรสารละลายที่ได้ และปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์หาปริมาณอะซาดิแรคตินด้วยเครื่อง HPLC

การสกัดอะซาดิแรคตินจากเนื้อในเมล็ดสะเดาด้วยเมทานอล

ชั่งน้ำหนักเนื้อในเมล็ดสะเดาอย่างละเอียด 10 กรัม ใส่ในเครื่องปฏิกรณ์เคมีแบบถังกวนโดยมีตะแกรงรองอยู่ด้านล่างเพื่อสะดวกในการถ่ายสารออก เติมตัวทำละลายเฮกเซนปริมาตร 100 มิลลิลิตร กวนให้เข้ากันที่ความเร็วรอบใบพัด 500 รอบต่อนาที เวลา 10 นาที ไขตัวอย่างออกนำไปหาปริมาณน้ำมันสะเดา ทำในลักษณะดังกล่าวที่เวลา 20, 30, 60 นาทีเป็นต้นจนกระทั่งปริมาณน้ำมันสะเดาออกมาจนหมดแล้วจึงนำกากเมล็ดสะเดาไปสกัดอะซาดิแรคตินต่อไป

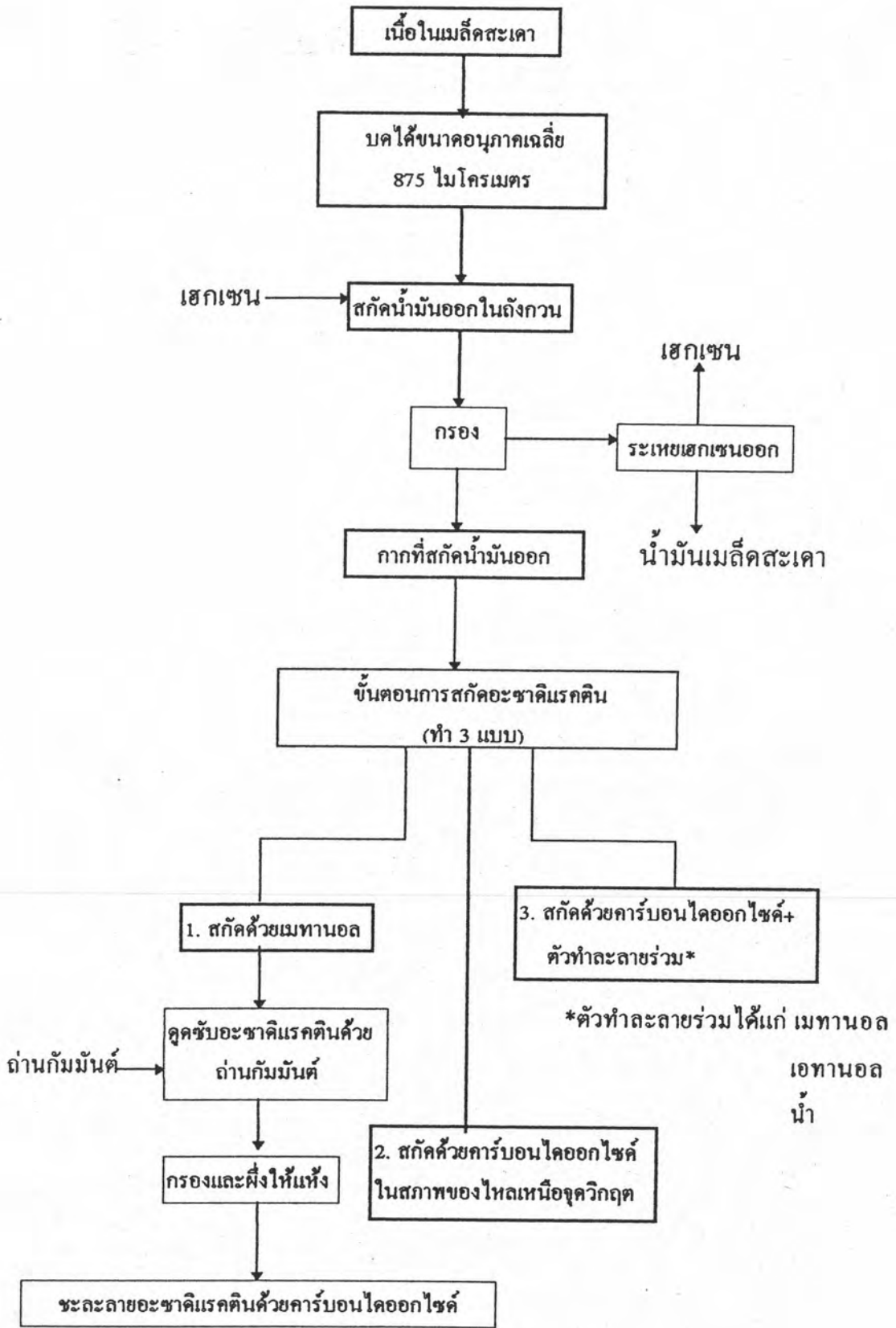
การสกัดอะซาดิแรคตินโดยเมทานอลทำโดยนำกากสะเดาซึ่งผ่านการสกัดน้ำมันออกมาเติมตัวทำละลายเมทานอล 100 มิลลิลิตร กวนด้วยใบพัดความเร็ว 500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที ไขสารละลายที่ได้ประมาณ 1 มิลลิลิตร กรองผ่านกระดาษกรอง No. 1 นำไปวิเคราะห์หาปริมาณอะซาดิแรคติน ทำการสกัดต่อโดยเก็บตัวอย่างที่เวลาสกัด 20, 30, 60, 90, 120 และ 240 นาทีตามลำดับ ทำจนกระทั่งปริมาณอะซาดิแรคตินที่สกัดได้เข้าสู่ภาวะสมดุล

การคำนวณปริมาณอะซาดิแรคติน (ไมโครกรัม/กรัมเนื้อในเมล็ดสะเดา) หาก

$$\text{ปริมาณอะซาดิแรคติน} = \frac{C_s \times D_s \times V_s}{W_s}$$

- เมื่อ
- C_s = ความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่าง (ไมโครกรัม)
 - D_s = จำนวนเท่าของการเจือจางสารละลาย
 - V_s = ปริมาตรสารละลายตัวอย่าง (มิลลิลิตร)
 - W_s = น้ำหนักของเนื้อในเมล็ดสะเดา (กรัม)

ขั้นตอนการศึกษาสมบัติเบื้องต้นของสะเดา ตลอดจนการศึกษาการสกัดอะซาดิแรคตินด้วยเมทานอล คาร์บอนไดออกไซด์และสารละลายผสม แสดงเป็นภาพรวมไว้ในรูปที่ 3.6



รูปที่ 3.6 แผนผังแสดงขั้นตอนศึกษาการสกัดอะซาดิแรคตินจากเนื้อในเมล็ดสะเดา

การสกัดอะซาดิแรคตินด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ในสภาพของไหลเหนือจุดวิกฤต

เตรียมวัตถุดิบที่ใช้ในการสกัดโดยนำเนื้อในเมล็ดสะเดาที่บดได้ขนาดอนุภาคเฉลี่ย 875 ไมโครเมตร ชั่งน้ำหนัก 27 กรัมอย่างละเอียด เติมตัวทำละลายเฮกเซน 270 มิลลิลิตร ใส่ในเครื่องปฏิกรณ์เคมีแบบถังกวน ความเร็วใบพัด 500 รอบต่อนาที เวลาในการสกัด 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นไซสารละลายออกแล้วเติมตัวทำละลายเฮกเซนใหม่ 270 มิลลิลิตร เพื่อทำการสกัดซ้ำอีก 1 ชั่วโมง นำกากสะเดาที่ผ่านการสกัดน้ำมันออกแล้วนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการสกัดอะซาดิแรคตินด้วยเครื่องสกัดในสภาพของไหลเหนือจุดวิกฤต ชั่งน้ำหนักกากสะเดาที่ผ่านการสกัดน้ำมันออกประมาณ 3 กรัมอย่างละเอียด บรรจุในขวดสกัดสารของเครื่องสกัด ทำการทดลองที่ความดัน 90, 140, 240 และ 340 บาร์ อุณหภูมิ 35, 45 และ 55 องศาเซลเซียส อะซาดิแรคตินที่สกัดได้จะออกมาพร้อมกับคาร์บอนไดออกไซด์ อะซาดิแรคตินจะถูกเก็บในตัวทำละลายเมทานอลที่มีปริมาตร 7 มิลลิลิตร คาร์บอนไดออกไซด์ที่ออกมาจะระเหยสู่บรรยากาศ เก็บตัวอย่างไปวิเคราะห์หาปริมาณอะซาดิแรคตินทุกๆ 1 ชั่วโมงเป็นเวลาทั้งหมด 7 ชั่วโมง

การสกัดอะซาดิแรคตินด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ผสมกับตัวทำละลายร่วม

ทำการสกัดน้ำมันสะเดาโดยชั่งเนื้อในเมล็ดสะเดาบดอย่างละเอียด 10 กรัม เติมตัวทำละลายเฮกเซน 100 มิลลิลิตร ทำการสกัด 1 ชั่วโมง ไซสารละลายออกเติมตัวทำละลายเฮกเซนใหม่อีก 100 มิลลิลิตรทำการสกัดซ้ำอีก 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นกากที่ผ่านการสกัดน้ำมันออกแล้วนำมาใช้สกัดอะซาดิแรคตินขั้นต่อไป โดยนำแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ผสมกับตัวทำละลายอินทรีย์ทำการสกัดในเครื่องปฏิกรณ์เคมีแบบถังกวน ความเร็วใบพัด 500 รอบต่อนาที ความดัน 40, 60 และ 80 บาร์ อุณหภูมิ 10, 20, 30 และ 40 องศาเซลเซียส เวลาในการสกัด 30, 60, 90 และ 120 นาที หลังจากทำการสกัดตามระยะเวลาที่กำหนด แล้วปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์ออกสู่บรรยากาศ วัดปริมาตรของคาร์บอนไดออกไซด์ที่ปล่อยออกมาเพื่อนำไปคำนวณหาปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่ใช้ในการสกัด ทำการศึกษากิจกรรมของตัวแปรที่มีผลต่อการสกัดได้แก่

1. ทดลองหาชนิดของตัวทำละลายร่วมที่มีผลต่อการสกัด แปรค่าชนิดของตัวทำละลายร่วมได้แก่ เมทานอล เอทานอลและน้ำ
2. ทดลองหาอัตราส่วนของตัวทำละลายร่วมที่ใช้ในการสกัด ที่ความดัน 80 บาร์ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลาในการสกัด 120 นาที แปรค่าของอัตราส่วนเนื้อในเมล็ดสะเดาคือ เมทานอล 1 กรัมต่อ 10 มิลลิลิตร, 1 กรัมต่อ 5 มิลลิลิตรและ 1 กรัมต่อ 3 มิลลิลิตร

3. ทดลองหาผลของความดันที่มีต่อการสกัด แปรค่าที่ความดัน 40, 60 และ 80 บาร์ ตามลำดับ

4. ทดลองหาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการสกัด แปรค่าที่อุณหภูมิ 10, 20, 30 และ 40 องศาเซลเซียส

การชะละลายอะซาดิแรคตินออกจากถ่านกัมมันต์โดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์ในสภาพของไหลเหนือจุดวิกฤต

อะซาดิแรคตินที่สกัดได้จะอยู่ในรูปสารละลายเมทานอล นำมาทำการดูดซับด้วยถ่านกัมมันต์ชนิดเม็ด ซึ่งบดด้วยเครื่องบด เป็นเวลา 2 นาที จะได้ขนาดอนุภาคเฉลี่ยของถ่านกัมมันต์ 400 ไมโครเมตร ชั่งน้ำหนักถ่านกัมมันต์ที่บดแล้วนี้ 800 กรัม ใส่ในสารละลายเมทานอลที่มีอะซาดิแรคตินละลายอยู่ซึ่งรู้ความเข้มข้นของอะซาดิแรคตินก่อนดูดซับด้วยถ่านกัมมันต์ กวนให้เข้ากันที่ความเร็วรอบแม่เหล็กไฟฟ้า 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที วัดปริมาณของอะซาดิแรคตินที่ถ่านกัมมันต์ดูดซับไว้ จากนั้นจึงนำถ่านกัมมันต์ที่ดูดซับอะซาดิแรคตินไว้แล้วนี้ไปล้างให้แห้งชั่งน้ำหนักอย่างละเอียด 3 กรัม ใส่ในขวดบรรจุสารของเครื่องสกัดสารในสภาพของไหลเหนือจุดวิกฤตวิกฤต ป้อนข้อมูลต่างๆลงในโปรแกรม อะซาดิแรคตินที่ถูกชะละลายออกมาจะเก็บอยู่ในเมทานอล 5 มิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์หาปริมาณอะซาดิแรคตินที่ละลายอยู่ในเมทานอล ทุกๆ 30 นาที เวลาทั้งหมด 7 ชั่วโมง ทำการศึกษาผลของตัวแปรดังนี้

1. ทดลองหาความดันที่ทำให้อะซาดิแรคตินถูกชะละลายออกมา โดยแปรค่าความดันที่ 90, 190, 240 และ 340 บาร์ ตามลำดับ

2. ทดลองหาอุณหภูมิที่มีผลต่อการชะละลาย โดยแปรค่าที่อุณหภูมิ 35, 45 และ 55 องศาเซลเซียส