บทที่ 3 วิธีการทดลอง

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.1.1 เครื่องสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์เหนือวิกฤต (Super Critical Carbon Dioxide : $SCCO_2$) รุ่น *Spe-ed*™ SFE Model 680 BAR system (Applied Separations, Allentown, Pa, USA)

3.1.2 เครื่องวิเคราะห์สารด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography: HPLC) ยี่ห้อ Water รุ่น 600 – 486 -717

3.1.3 เครื่องวัดความชื้น (Moisture Balance Precisa) รุ่น XM 120

3.1.4 เครื่องชั่งน้ำหนักแบบละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง

3.1.5 ตะแกรงร่อนแยกขนาด

3.1.6 เครื่องแยกขนาด

3.1.7 เครื่องวัดสเปกโตรมิเตอร์ช่วง UV-VIS (UV-VIS Spectrophotometer)

3.1.8 เครื่องแก้ว

3.2 วัสดุและสารเคมี

3.2.1 ใบสบู่ดำแห้ง (*Jatropha curcas* Linn.) พันธุ์นครราชสีมา จากศูนย์ศึกษาการพัฒนาเขาหินซ้อนอันเนื่องมาจากพระราชดำริ 7 ม.2 ต.เขาหินซ้อน อ.พนมสารคาม จ.ฉะเชิงเทรา

3.2.2 เมทานอล

3.2.3 เอทานอล

3.2.4 สารมาตรฐานกรดแกลลิก

3.2.5 สารมาตรฐานกรดแอลลาจิก

3.2.6 สารมาตรฐานคอริลาจิน

3.2.7 ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

3.2.8 น้ำปราศจากไอออน

3.2.9 กรดฟอสฟอริก

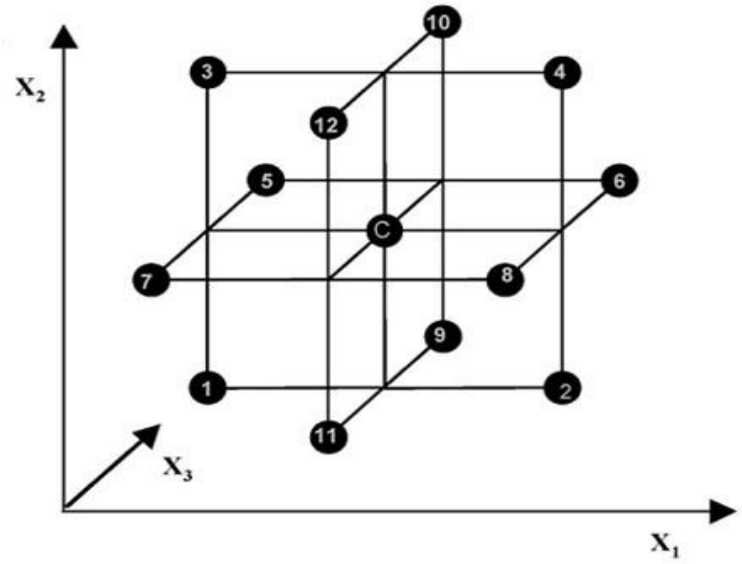
3.2.10 กรดอะซิติก

3.2.11 สารมาตรฐาน 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazy (DPPH)

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การออกแบบการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ออกแบบการทดลองแบบบ๊อกซ์-เบ็นเกน (Box-Behnken Design, BBD) ซึ่งใช้หลักทางคณิตศาสตร์ด้านมิติ สามารถใช้กับการทดลองที่มีตัวแปรได้มากสุดถึง 5 ตัวแปร โดยจะใช้ลูกบาศก์ (cube) ในการออกแบบการทดลอง ลูกบาศก์นี้ประกอบด้วยจุดศูนย์กลางและจุดกึ่งกลางของแต่ละด้าน ดังแสดงในรูปที่ 3.1 ซึ่งตัวแปรที่ศึกษาในงานวิจัยนี้ได้แก่ ความดัน (X_1) อุณหภูมิ (X_2) และสัดส่วนตัวทำละลายร่วม (X_3) โดยแต่ละตัวแปรทำการศึกษาที่ 3 ระดับ คือ ความดันที่ 8 25 และ 42 เมกกะปาสคาล (เนื่องจากความดันวิกฤตของคาร์บอนไดออกไซด์มีค่าเท่ากับ 7.4 เมกกะปาสคาล และเครื่องมือที่ใช้ในการสกัดสามารถใช้ความดันได้ไม่เกิน 50 เมกกะปาสคาล) อุณหภูมิที่ 35 60 และ 85 องศาเซลเซียส เนื่องจากอุณหภูมิวิกฤตของคาร์บอนไดออกไซด์มีค่าเท่ากับ 31 องศาเซลเซียส และสารสกัดผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติจะสลายตัวได้ง่ายที่อุณหภูมิสูงจึงเลือกใช้อุณหภูมิไม่เกิน 85 องศาเซลเซียสในการสกัด และสัดส่วนตัวทำละลายร่วมที่ 1 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เนื่องจากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าการใช้สัดส่วนตัวทำละลายร่วมในช่วง 1 – 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรจะให้ผลในการสกัดสูงที่สุด โดยผลการออกแบบการทดลองแสดงดังตารางที่ 3.1 และ 3.2



รูปที่ 3.1 การออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken 3 ตัวแปร [3]

ตารางที่ 3.1 สัญลักษณ์และระดับตัวแปรต่าง ๆ ในการออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken

ตัวแปร	สัญลักษณ์		ระดับ	
	รหัสทั่วไป	รหัสระบุ	รหัสทั่วไป	รหัสระบุ
ความดัน (เมกกะปาสคาล)	P	X_1	8	-1
			25	0
			42	1
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	T	X_2	35	-1
			60	0
			85	1
สัดส่วนตัวทำละลายร่วม (เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร)	C	X_3	1	-1
			3	0
			5	1

ตารางที่ 3.2 ผลการออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken แบบ 3 ตัวแปร 3 ระดับ

การทดลอง	ความดัน (X_1) (เมกกะปาสคาล)	อุณหภูมิ (X_2) (องศาเซลเซียส)	สัดส่วนตัวทำละลายร่วม (X_3) (เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร)
1	-1 (8)	-1 (35)	0 (3)
2	-1 (8)	1 (85)	0 (3)
3	1 (42)	-1 (35)	0 (3)
4	1 (42)	1 (85)	0 (3)
5	-1 (8)	0 (60)	-1 (1)
6	-1 (8)	0 (60)	1 (5)
7	1 (42)	0 (60)	-1 (1)
8	1 (42)	0 (60)	1 (5)
9	0 (25)	-1 (35)	-1 (1)
10	0 (25)	-1 (35)	1 (5)
11	0 (25)	1 (85)	-1 (1)
12	0 (25)	1 (85)	1 (5)
13	0 (25)	0 (60)	0 (3)
14	0 (25)	0 (60)	0 (3)
15	0 (25)	0 (60)	0 (3)

3.3.2 การเตรียมใบสบู่ดำอบแห้ง

3.3.2.1 นำใบสบู่ดำที่ตัดก้านแล้วมาอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

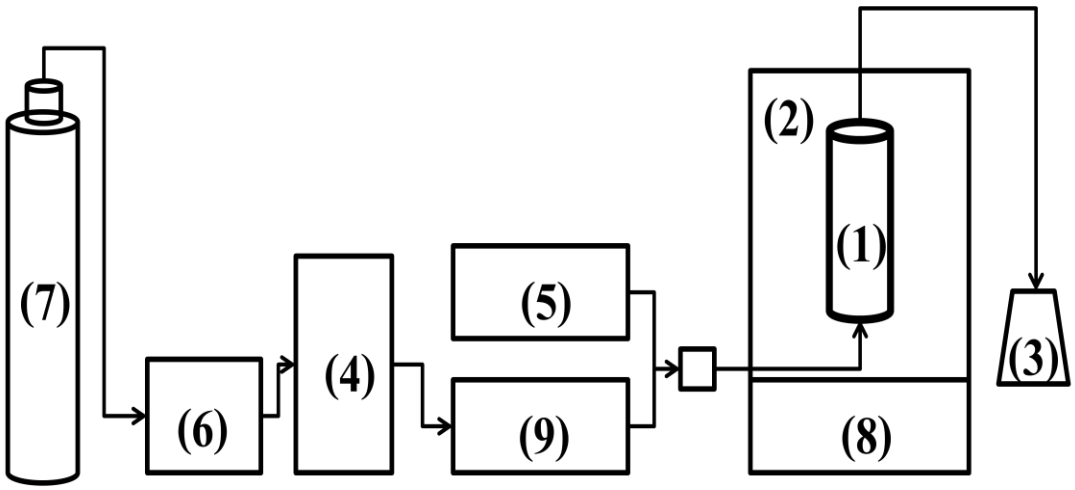
3.3.2.2 นำใบสบู่ดำที่อบแห้งแล้วมาบดเพื่อลดขนาด แล้วคัดแยกขนาดด้วยตะแกรงขนาด 1.19 – 2.00 มิลลิเมตร

3.3.2.3 นำใบสบู่ดำอบแห้งที่คัดแยกขนาดแล้วมาวิเคราะห์หาปริมาณความชื้นด้วยเครื่องวัดปริมาณความชื้น พบว่าใบสบู่ดำอบแห้งมีความชื้นเหลือไม่เกิน 7 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง

3.3.2.4 เก็บใบสบู่ดำอบแห้งที่คัดแยกขนาดแล้วในตู้ควบคุมความชื้นที่อุณหภูมิห้อง

3.3.3 การสกัดสารประกอบฟีโนลิคจากใบสบู่ดำโดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์เหนือวิกฤต

ศึกษาการสกัดสารประกอบฟีโนลิคจากใบสบู่ดำด้วยคาร์บอนไดออกไซด์เหนือวิกฤต (รูปที่ 3.2) ทำการศึกษาอิทธิพลของ 3 ตัวแปร ได้แก่ ความดันที่ 8 25 และ 42 เมกกะปาสคาล อุณหภูมิที่ 35 60 และ 85 องศาเซลเซียส และสัดส่วนตัวทำละลายร่วมที่ 1 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ขั้นตอนการทดลองมีดังนี้



รูปที่ 3.2 โครงสร้างเครื่องสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์เหนือวิกฤต

3.3.3.1 ชั่งน้ำหนักใบสบู่ดำแห้ง 5 กรัม บรรจุลงในหน่วยสกัด (1)

3.3.3.2 นำหน่วยสกัดเข้าเครื่องสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์เหนือวิกฤต (2)

3.3.3.3 ใส่เมทานอลในขวดรองรับ (3) 20 มิลลิลิตร

3.3.3.4 นำขวดรองรับ (3) เข้าเครื่องสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์เหนือวิกฤต

3.3.3.5 เปิดเครื่องทำความเย็น (4) ตั้งอุณหภูมิที่ 20 องศาเซลเซียส

3.3.3.6 ตั้งค่าอัตราการไหลของตัวทำละลายร่วม (5)

3.3.3.7 เปิดเครื่องปั๊มอากาศ (6) และเปิดถังแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (7)

3.3.3.8 เปิดเครื่องสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์เหนือวิกฤต และตั้งอุณภูมิ (8)

3.3.3.9 ตั้งค่าความดันของแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (9)

3.3.3.10 เริ่มการสกัดโดยปรับอัตราการไหลของสารสกัดขาออกไว้ที่ 100 มิลลิลิตรต่อนาที แล้วเริ่มจับเวลา

3.3.3.11 เก็บตัวอย่างทุกครึ่งชั่วโมงเป็นเวลาสองชั่วโมง และเก็บตัวอย่างทุกชั่วโมงจนครบ 4 ชั่วโมง

3.3.3.12 เก็บรักษาสารที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.3.3.13 นำสารที่สกัดได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีโนลิค (กรดแกลลิก กรดแอลลาจิก และคลอริลาจิน) โดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (HPLC) (หัวข้อ 3.4.2)

3.3.3.14 นำสารที่สกัดได้ไปวิเคราะห์หาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธีโมดิฟาย ออลิจินอลดีพีพีเอช (modified original DPPH) (หัวข้อ 3.4.3)

3.4 การวิเคราะห์ผลการทดลอง

3.4.1 การสร้างกราฟมาตรฐาน

สร้างกราฟมาตรฐาน (standard curve) เพื่อใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณกรดแกลลิก กรดแอลลาจิก และคลอริลาจิน จากสารสกัดใบสบู่ดำโดยใช้เทคนิค HPLC

3.4.1.1 นำสารมาตรฐานกรดแกลลิก 0.5 กรัม ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร

3.4.1.2 เติมเอทานอล 10 มิลลิลิตร

3.4.1.3 ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน

3.4.1.4 ปิเปตสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกปริมาตร 1 2 3 4 5 และ 10 มิลลิลิตร ใส่ขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร

3.4.1.5 ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจะได้สารละลายมาตรฐานของกรดแกลลิกความเข้มข้น 50 100 250 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

3.4.1.6 นำสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกไปวิเคราะห์หาปริมาณด้วยเครื่อง HPLC

3.4.1.7 นำข้อมูลที่วิเคราะห์ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐานดังรูปที่ ก.1

3.4.1.8 ทำซ้ำตั้งแต่ข้อ 3.4.1.1 ถึง 3.4.1.7 โดยเปลี่ยนเป็นสารมาตรฐานกรดแอลลาจิก และคลอริลาจิน ตามลำดับ

3.4.2 การวิเคราะห์หาปริมาณกรดแกลลิก กรดแอลลาจิก และคลอริลาจิน โดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

3.4.2.1 เตรียมสารสกัดตัวอย่าง โดยกรองด้วยตัวกรองสารสกัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 ไมครอน เก็บในขวดตัวอย่าง

3.4.2.2 ใช้ไมโครไซริ้งค์ (micro syringe) ขนาด 100 ไมโครลิตร ดูดสารสกัดตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร ฉีดเข้าเครื่อง HPLC โดยสภาวะของเครื่องมีดังนี้

- คอลัมน์ : reverse-phase Shimpack CLC-ODS
- ดีเทคเตอร์ : UV-visible detector ใช้ที่ความยาวคลื่น 270 นาโนเมตร
- เฟสเคลื่อนที่ : กรดฟอสฟอลิก 0.05 เปอร์เซ็นต์ และอะซิโตไนไตร์ 100 เปอร์เซ็นต์
- อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ : 80 ต่อ 20 โดยปริมาตร
- อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ : 1 มิลลิลิตรต่อนาที
- ปริมาตรสารตัวอย่างที่ฉีด : 20 ไมโครลิตร

3.4.2.3 เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ที่ได้กับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก กรดแอลลาจิก และคลอริลาจิน

3.4.2.4 รายงานผลผลได้การสกัดในหน่วยมิลลิกรัมต่อกิโลกรัมใบสบู่ดำแห้ง

3.4.3. การทดสอบคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบสบู่ดำ

ศึกษาคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบสบู่ดำ โดยวิธีโมดิฟายออลิจินอลดีพีพีเอช (modified original DPPH) [3] มีขั้นตอนดังนี้

3.4.3.1 นำตัวอย่างสารสกัดจากใบสบู่ดำ 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดสอบ

3.4.3.2 เติมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 60 ไมโครโมลาร์ในเอทานอลความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ปริมาณ 3.9 มิลลิลิตร

3. 4.3.3 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 515 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องวัดยูวีวิซิเบิลสเปกโตรมิเตอร์

3. 4.3.4 รายงานผลของความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบสบู่ดำเป็นเปอร์เซ็นต์เทียบเท่ากับสารมาตรฐาน DPPH

3.4.4 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดสารประกอบฟีโนลิคจากใบสบู่ดำด้วยวิธีพื้นที่ผิวตอบสนอง

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของปัจจัยที่มีผลต่อผลได้การสกัดสารประกอบฟีโนลิคจากใบสบู่ดำด้วยวิธีพื้นที่ผิวตอบสนองโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปในการคำนวนผลการทดลองทั้งหมด 15 การทดลอง เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัด และสร้างสหสัมพันธ์เพื่อใช้ทำนายค่าของผลได้การสกัด โดยศึกษาอิทธิพลของสามตัวแปร (ความดัน อุณหภูมิ และสัดส่วนตัวทำละลายร่วม) ที่มีผลต่อค่าของผลได้การสกัด และแสดงผลในรูปของกราฟพื้นที่ผิวตอบสนอง

3.4.5 การวิเคราะห์ความคงตัวของสารสกัดในระหว่างการเก็บรักษา

วิเคราะห์ความคงตัวของสารประกอบฟีโนลิค (กรดแกลลิก กรดแอลลาจิก และคลอริลาจิน) และความเสถียรของความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบสบู่ดำ โดยมีขั้นตอนดังนี้

3.4.5.1 เก็บรักษาสารสกัดจากใบสบู่ดำด้วยคาร์บอนไดออกไซด์เหนือวิกฤตและตัวทำละลายร่วมทั้ง 15 การทดลองในขวดสีชาที่มีฝาปิด

3.4.5.2 นำสารสกัดใบสบู่ดำไปเก็บในสภาวะที่ไม่มีแสงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์

3.4.5.3 วิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีโนลิค (กรดแกลลิก กรดแอลลาจิก และคลอริลาจิน) ที่เหลืออยู่ด้วยเทคนิค HPLC เพื่อเปรียบเทียบกับปริมาณสารประกอบฟีโนลิคเริ่มต้นทุก 1 สัปดาห์

3.4.5.4 วิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบสบู่ดำทุก 1 สัปดาห์ ด้วยวิธี DPPH เพื่อเปรียบเทียบกับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเริ่มต้น