

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัตถุดิบและสารเคมี

3.1.1 น้ำมันรำข้าวดิบ

น้ำมันรำข้าวดิบได้รับความอนุเคราะห์จาก บริษัทน้ำมันบริโภคไทย จำกัด โดยน้ำมันรำข้าวดิบถูกเก็บไว้ในภาชนะทึบแสง ที่สภาวะอุณหภูมิห้อง

3.1.2 สารเคมี

- 1) เฮกเซน (Hexane, AR Grade, RCI Labscan)
- 2) แก๊สไนโตรเจน 99.5% (Nitrogen, บ.ไทยสเปเชียลแก๊ส จำกัด)
- 3) กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric Acid, AR Grade, J.T. Baker)
- 4) โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (Potassium Hydroxide, AR Grade, Ajax Finechem Pty Ltd.)
- 5) กรดซัลฟิวริก (Sulfuric Acid, AR Grade, J.T. Baker)
- 6) โซเดียมโมลิบเดต (Sodium Molybdate, AR Grade, Ajax Finechem Pty Ltd.)
- 7) ไฮดราซีนซัลเฟต (Hydrazine Sulfate, AR Grade, Loba Chemie Pvt .Ltd.)
- 8) โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium Hydroxide, AR Grade, Ajax Finechem Pty Ltd.)
- 9) โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Potassium Hydrogen Phosphate, AR Grade, Ajax Finechem Pty Ltd.)
- 10) แกมมาออไรซานอลสังเคราะห์ (Gamma Oryzanal, AR Grade, Wakopure Chemical Industries LTD.)
- 11) ไอโซโพรพานอล (Isopropanol, AR Grade, Ajax Finechem Pty Ltd.)
- 12) กรดแอสคอร์บิก (Ascorbic Acid, AR Grade, Ajax Finechem Pty Ltd.)

- 13) เอทานอลแอบซอลูท (Ethanol, AR Grade, RCI Labscan)
- 14) โซเดียมคลอไรด์ (Sodium Chloride, AR Grade, Ajax Finechem Pty Ltd.)
- 15) เมทานอล (Methanol, AR Grade, RCI Labscan)

3.2 อุปกรณ์การทดลอง

3.2.1 เครื่องแก้วสำหรับการทดลอง ประกอบด้วย บีกเกอร์ ขวดรูปชมพู่ ขวดปรับปริมาตร แท่งแก้วสำหรับคนสาร ฯลฯ

3.2.2 เมมเบรนชนิดอัลตราฟิลเตรชัน และนาโนฟิลเตรชัน โดยเมมเบรนที่ใช้เป็นเกรดการค้า (Microdyn Nadir, ประเทศเยอรมัน) วัสดุที่ใช้ทำเมมเบรน คือ พอร์ลิอีเทอร์ซัลโฟน (Polyether Sulphone; PES) โดยคุณลักษณะของเยื่อแผ่นดังตารางที่ 3.1-3.2

ตารางที่ 3.1 คุณลักษณะเมมเบรนระดับอัลตราฟิลเตรชัน

เยื่อแผ่น	อัลตราฟิลเตรชัน (UP 020)
Pore size [μm]	-
MWCO [kDa]	20
ฟลักซ์ของน้ำ [L/(m ² h)]	>200

ตารางที่ 3.2 คุณลักษณะเมมเบรนระดับนาโนฟิลเตรชัน

เยื่อแผ่น	NP010	NP030
Nom. Retention Na ₂ SO ₄ [%]	35-75	80-95
ฟลักซ์น้ำ [L/(m ² h)]	>200	>40

การทดลองการกรองด้วยเมมเบรนทุกสภาวะใช้เมมเบรนใหม่ โดยเมมเบรนใหม่จะต้องผ่านการปรับสภาพเพื่อคลายตัว

3.2.3 เครื่องกวนแม่เหล็ก (HL Intrument รุ่น HS-115) ปรับความเร็วได้ 8 ระดับ

3.2.4 ตู้อบ (WTD-Finder รุ่น FD 115) ความจุ 115 ลิตร ปรับอุณหภูมิในช่วง 0-300 องศาเซลเซียส

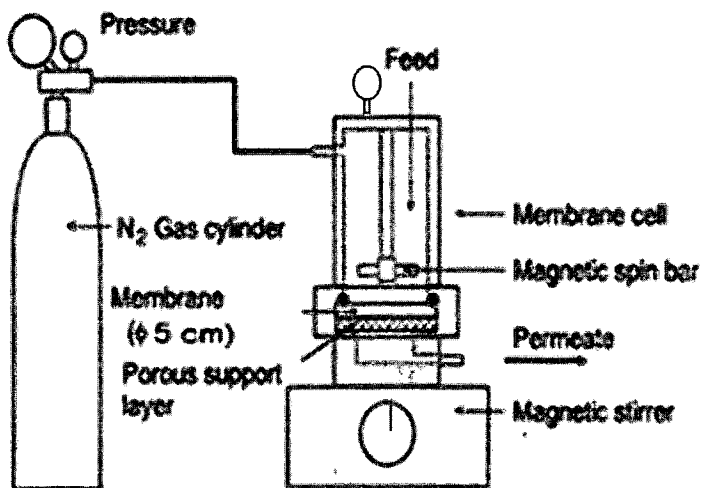
3.2.5 ชุดการกรอง

ชุดการกรองเป็นแบบปิดตายดังรูปที่ 3.1 และ 3.2 ประกอบด้วย

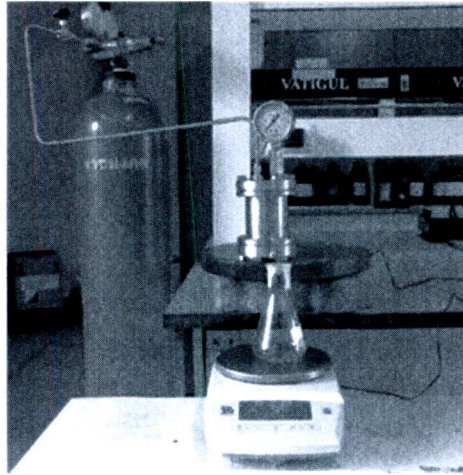
3.2.5.1 ถังแก๊สไนโตรเจนใช้เป็นแรงขับเพื่อให้สารป้อนเคลื่อนที่ผ่านเมมเบรน ด้านบนติดชุดอุปกรณ์วัดความดันเพื่อปรับค่าให้ได้ตามต้องการ พร้อมระบบท่อสเตนเลสนำแก๊สไนโตรเจนเข้าสู่ชุดกรอง

3.2.5.2 ถังบรรจุสารป้อนทำจากสเตนเลสตีล ขนาดความจุ 170 ลูกบาศก์เซนติเมตร โดยภายในของถังจะติดตั้งแท่งแม่เหล็ก และด้านล่างของถังเป็นที่ติดตั้งเมมเบรนโดยเมมเบรนมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร วางบนแผ่นรองรับสแตนเลส ถังบรรจุสารป้อนติดตั้งบนเครื่องกวน และด้านบนติดตั้งเกจวัดความดัน

3.2.5.3 เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Ohaus รุ่น PA2102) ใช้ในการเก็บน้ำหนักเพอร์มิเอทที่ทางออก



รูปที่ 3.1 แผนภาพชุดเครื่องกรองด้วยเยื่อแผ่นแบบปิดตายในการทดลอง



รูปที่ 3.2 ชุดเครื่องกรองด้วยเยื่อแผ่นแบบปิดตายในการทดลอง

3.2.6 วิธีกรใช้ชุดกรอง

3.2.6.1 ตัดเมมเบรนให้มีขนาดเท่ากับแผ่นรองรับ (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร)

3.2.6.2 คลายนี้อัตทุกตัวของชุดการกรองแบบปิดตาย เพื่อถอดฟาด้านบนและฟาด้านล่างของชุดการกรอง ที่ฟาด้านล่างของชุดกรอง ให้วางแผ่นสแตนเลสพูนลงในร่อง จากนั้นวางเมมเบรนที่ตัดไว้ปิดทับไปบนแผ่นสแตนเลสพูน โดยให้ขอบของเมมเบรนจะต้องวางอยู่บนวงยางของฟาด้านล่างพอดี จากนั้นให้วางท่อกลางเข้ากับฟาด้านล่าง โดยระวังไม่ให้เมมเบรนขยับออก แล้วจึงขันน็อตทุกตัวยึดท่อกลางกับฟาด้านล่างให้แน่น (การขันน็อตจะต้องค่อย ๆ เวียนขันน็อตทุกตัวทีละน้อย จนแน่นเสมอกัน)

3.2.6.3 วางชุดกวนแม่เหล็กลงในท่อกลาง ปิดฟาด้านบน ขันน็อตฟาด้านบนกับท่อกลางให้แน่น

3.2.6.4 เตรียมสารละลายตั้งต้นปริมาตร 150 มิลลิลิตร ในถังป้อน

3.2.6.5 คลายนี้อัตที่ฟาด้านบนของถังบรรจุสารละลายตั้งต้นออก เติมสารละลายตั้งต้น ปิดฝาให้แน่น ขันเกลียวทุกตัว

3.2.6.6 ขันเกลียวข้อต่อท่อสแตนเลส 1/4 นิ้ว ที่มาจากท่อแก๊สไนโตรเจนความดันสูง เข้ากับฟาด้านบนของถังบรรจุสารป้อนให้แน่น

3.2.6.7 เปิดเครื่องกวนแม่เหล็ก ตรวจสอบให้มั่นใจว่าแท่งแม่เหล็กในชุดการกรงหมุนปกติ นำขวดรูปชมพู่วางบนเครื่องชั่งอิเล็กทรอนิกส์ โดยจัดให้ปลายท่อออกของเพอร์มิเอทที่ด้านล่างของชุดกรงให้ไหลลงขวดรูปชมพู่พอดี

3.2.6.8 คลายเรกกูเรเตอร์ปรับความดันที่หัวท่อไนโตรเจนอย่างช้าๆ สังเกตเข็มเกจวัดความดันที่หัวท่อไนโตรเจนให้เพิ่มขึ้นที่ค่า 5 บาร์

3.2.6.9 ปรับเรกกูเรเตอร์ที่อยู่ระหว่างท่อไนโตรเจนกับถังป้อน สังเกตเข็มของเกจวัดความดันที่ติดอยู่ที่ด้านบนของถังบรรจุสารป้อน รอจนเพิ่มขึ้นถึงค่าความดันที่ต้องการใช้งาน

3.2.6.10 ในระหว่างการทดลอง ถ้าความดันที่เกจวัดความดันด้านบนของถังป้อนตกลงจากค่าที่ตั้งไว้ ก็สามารถปรับเรกกูเรเตอร์ที่อยู่ระหว่างท่อไนโตรเจนกับถังสารละลายตั้งต้นจนถึงค่าความดันที่ต้องการใช้งาน

3.2.6.11 รอจนมีกระแสเพอร์มิเอทไหลผ่านเมมเบรนลงสู่ขวดรูปชมพู่ จนได้ปริมาตรมากพอที่จะตรวจวัดพารามิเตอร์ต่างๆ

3.2.6.12 สามารถเลือกใช้ความดันในการกรงด้วยการปรับความดันในถังบรรจุสารป้อน โดยสามารถปรับได้ตั้งแต่ 0-40 บาร์ ขึ้นอยู่กับสภาวะการทดลอง และชนิดของเมมเบรน

3.2.6.13 เมื่อต้องการเลิกใช้งานเครื่อง ให้ดำเนินการดังนี้

1) ปิดเรกกูเรเตอร์ที่หัวท่อไนโตรเจน โดยการหมุนเรกกูเรเตอร์ในทิศทางเข็มนาฬิกาจนแน่น (ข้อควรระวังคือ อย่าหมุนผิดทาง เพราะจะทำให้ความดันสูงขึ้นมากกว่า 40 บาร์ซึ่งจะอันตรายมาก)

2) คลายเกลียวด้านบนของถังบรรจุสารป้อนที่เชื่อมไปยังท่อไนโตรเจน ให้ทำเบาๆ จะได้ยินเสียงแก๊สรั่วออกมาในช่วงเวลาสั้นๆ ให้รอจนเสียงหยุดลง แสดงว่าแก๊สที่ค้างท่ออยู่ได้ออกไปจนหมดแล้ว (ห้ามคลายเกลียวด้านบนของถังบรรจุป้อนที่เชื่อมไปยังชุดการกรง เพราะจะมีสารละลายตั้งต้นรั่วออกมาด้วย)

3.3 วิธีการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้แบ่งวิธีการทดลองออกเป็น 3 ส่วน เพื่อศึกษาฟลักซ์เพอร์มิเอท ความสามารถการกักกันฟอสโฟไลปิดและกรดไขมันอิสระ และความสามารถการกักกันแก๊สมากอโรซานอล มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

3.3.1 วิธีการทดลองเพื่อศึกษาฟลักซ์เพอร์มิเอท แสดงในแผนภาพดังรูปที่ 3.3

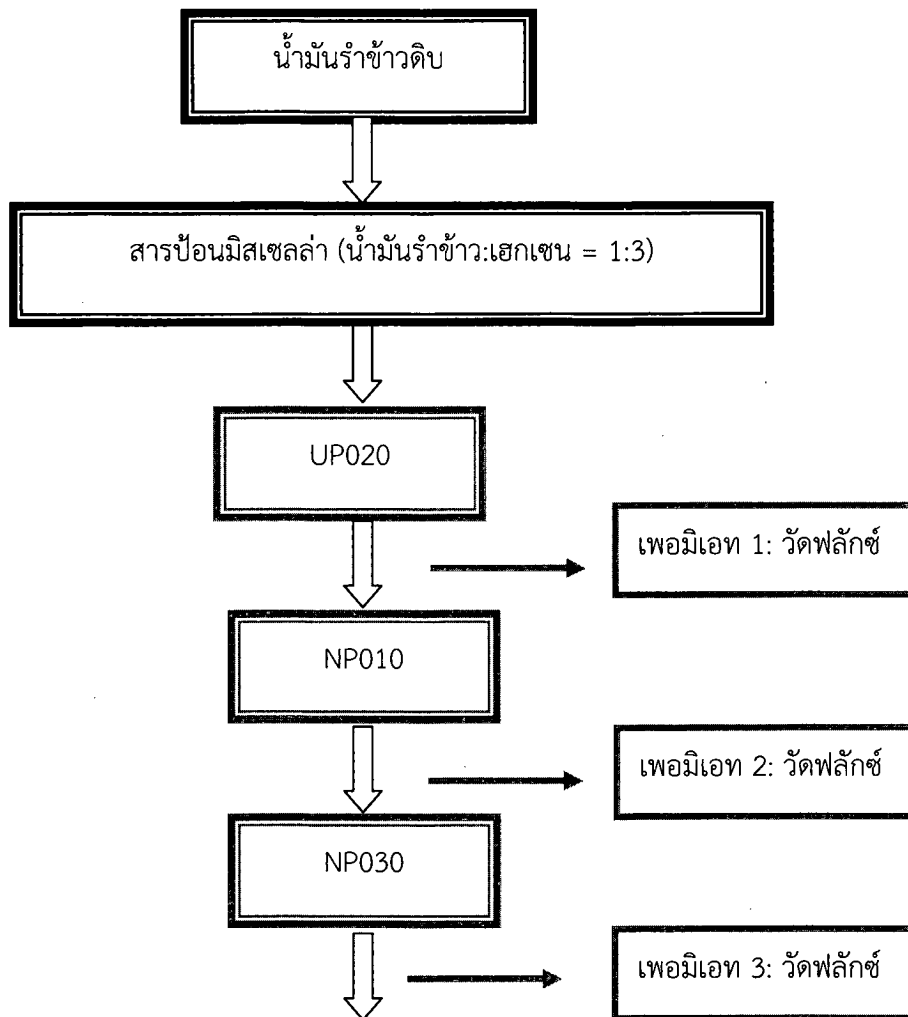
การทดลองเพื่อศึกษาฟลักซ์เพอร์มิเอท ได้แบ่งการกรองเป็น 2 ระดับคือ ระดับอัลตราฟิลเตรชัน UP020 ศึกษาการกรองที่ความดัน 3 ค่า คือ ความดัน 5, 10, 15 บาร์ และระดับนาโนฟิลเตรชัน NP010 ใช้ความดัน 28 บาร์ และ NP030 ใช้ความดัน 34 บาร์ โดยมีวิธีการทดลองดังนี้

3.3.1.1 การเตรียมมิสเซลล์่าเป็นสารป้อน โดยนำน้ำมันรำข้าวมาผสมกับเฮกเซนในอัตราส่วน 1:3 (v/v) ในการทดลองนี้เตรียมปริมาตรเริ่มต้น 150 มิลลิลิตร

3.3.1.2 นำสารป้อนใส่ชุดกรอง จากนั้นทำการกรองระดับอัลตราฟิลเตรชัน UP020 โดยเลือกความดัน 5 บาร์ ทำการทดลองโดยเริ่มจากเวลาที่เพอร์มิเอทหยดแรกออกจากถังกรอง ทำการวัดน้ำหนักเพอร์มิเอทที่ได้ ณ เวลาการกรองต่างๆ จนถึงสิ้นสุดการทดลอง ในทำนองเดียวกัน เมื่อต้องการศึกษาฟลักซ์เพอร์มิเอทของการกรองระดับอัลตราฟิลเตรชันที่ความดัน 10 และ 15 บาร์ ใช้วิธีการที่กล่าวไว้ข้างต้น โดยผลจากการศึกษาฟลักซ์เพอร์มิเอทของการกรองระดับอัลตราฟิลเตรชันเพื่อหาค่าความดันที่เหมาะสมที่สุด

3.3.1.3 นำฟลักซ์เพอร์มิเอทจากการกรองระดับอัลตราฟิลเตรชัน UP020 เป็นสารป้อน จากนั้นดำเนินการกรองระดับนาโนฟิลเตรชัน NP010 โดยควบคุมความดัน 28 บาร์ ทำการทดลองโดยเริ่มจากเวลาที่เพอร์มิเอทหยดแรกออกจากถังกรอง ทำการวัดน้ำหนักเพอร์มิเอทที่ได้ ณ เวลาการกรองต่างๆ จนถึงสิ้นสุดการทดลอง

3.3.1.4 นำฟลักซ์เพอร์มิเอทจากการกรองระดับอัลตราฟิลเตรชัน NP010 เป็นสารป้อน จากนั้นดำเนินการกรองระดับนาโนฟิลเตรชัน NP030 โดยควบคุมความดัน 34 บาร์ ทำการทดลองโดยเริ่มจากเวลาที่เพอร์มิเอทหยดแรกออกจากถังกรอง ทำการวัดน้ำหนักเพอร์มิเอทที่ได้ ณ เวลาการกรองต่างๆ จนถึงสิ้นสุดการทดลอง



รูปที่ 3.3 ขั้นตอนการกรองแบบอนุกรมในระดับต่างๆ เพื่อศึกษาฟลักซ์เพอร์มิเอท

3.3.2 วิธีการทดลองเพื่อศึกษาความสามารถการกักกันกรดไขมันอิสระและฟอสโฟไลปิด

การทดลองนี้ประกอบด้วยการกรองเป็น 2 ระดับคือ ระดับอัลตราฟิลเตรชัน UP020 ศึกษาการกรองที่ความดัน 10 บาร์ และระดับนาโนฟิลเตรชัน NP010 ใช้ความดัน 28 บาร์ และ NP030 ใช้ความดัน 34 บาร์ เมมเบรนในการทดลองเป็นเมมเบรนใหม่ที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว ดังนี้

3.3.2.1 เก็บตัวอย่างน้ำมันรำข้าวดิบมาวิเคราะห์ กรดไขมันอิสระ และฟอสโฟไลปิด

3.3.2.2 การเตรียมมิสเซลล่าเป็นสารป้อน โดยนำน้ำมันรำข้าวมาผสมกับเฮกเซนในอัตราส่วน 1:3 (v/v) ในการทดลองนี้เตรียมปริมาตรเริ่มต้น 150 มิลลิลิตร จากนั้นเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์กรดไขมันอิสระและฟอสโฟไลปิด

3.3.2.3 การทดลองการกรองระดับอัลตราฟิลเตรชัน UP020 นำสารป้อนใส่ชุดกรองระดับอัลตราฟิลเตรชัน UP020 ณ ความดัน 10 บาร์ ทำการกรองจนกระทั่งได้ปริมาณกระแสเพอร์มิเอท 60 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรสารป้อน แล้วจึงหยุดการทดลอง

1) เก็บรวบรวมกระแสเพอร์มิเอททั้งหมดเพื่อใช้เป็นสารป้อนในขั้นตอนต่อไป

2) เก็บตัวอย่างสารในกระแสเพอร์มิเอทและรีเทนเทต เพื่อวิเคราะห์กรดไขมันอิสระและฟอสโฟไลปิด

3.3.2.4 การทดลองการกรองระดับนาโนฟิลเตรชัน NP010: นำกระแสเพอร์มิเอทจากการกรองระดับอัลตราฟิลเตรชัน UP020 ในข้อ 3.3.2.3 เพื่อเป็นสารป้อน จากนั้นทำการกรองระดับนาโนฟิลเตรชัน NP010 ณ ความดัน 28 บาร์ ทำการกรองจนกระทั่งได้ปริมาณกระแสเพอร์มิเอท 60 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรสารป้อน แล้วจึงหยุดการทดลอง

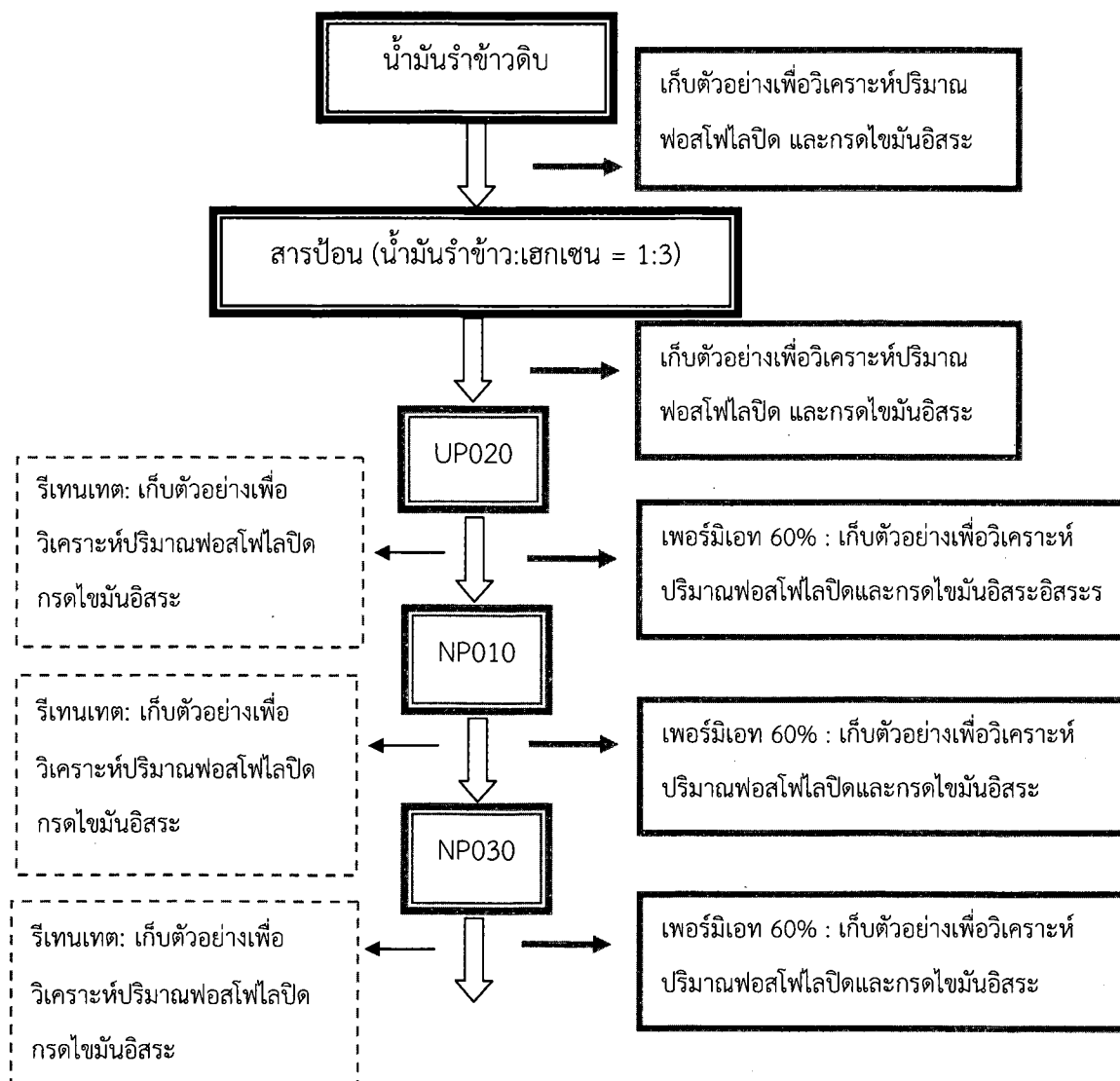
1) เก็บรวบรวมกระแสเพอร์มิเอททั้งหมดเพื่อใช้เป็นสารป้อนในขั้นตอนต่อไป

2) เก็บตัวอย่างสารในกระแสเพอร์มิเอทและรีเทนเทต เพื่อวิเคราะห์กรดไขมันอิสระและฟอสโฟไลปิด

3.3.2.5 การทดลองการกรองระดับนาโนฟิลเตรชัน NP030: นำกระแสเพอร์มิเอทจากการกรองระดับอัลตราฟิลเตรชัน NP010 ในข้อ 3.3.2.4 เพื่อเป็นสารป้อน จากนั้นทำการกรองระดับนาโนฟิลเตรชัน NP030 ณ ความดัน 34 บาร์ ทำการกรองจนกระทั่งได้ปริมาณกระแสเพอร์มิเอท 60 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรสารป้อน แล้วจึงหยุดการทดลอง

1) เก็บตัวอย่างสารในกระแสเพอร์มิเอทและรีเทนเทต เพื่อวิเคราะห์กรดไขมันอิสระและฟอสโฟไลปิด

โดยแผนภาพวิธีการทดลองเพื่อศึกษาความสามารถการกักกันกรดไขมันอิสระและฟอสโฟไลปิด ดังรูปที่ 3.4



รูปที่ 3.4 ขั้นตอนการกรองแบบอนุกรมในระดับต่างๆ เพื่อศึกษาความสามารถการกักกันกรดไขมันอิสระ และฟอสโฟไลปิด

3.3.3 วิธีการทดลองเพื่อศึกษาความสามารถการกักกันแกมมาอโรซานอล

เนื่องด้วยน้ำมันรำข้าวดิบมีลักษณะขุ่นและหนืด ซึ่งเป็นผลมาจากสารโมเลกุลใหญ่ ในการนี้เพื่อลดปัญหาการอุดตันระบบ จึงมีการปรับสภาพน้ำมันรำข้าวดิบด้วยปฏิกิริยาซาฟอนนิฟิเคชัน ทั้งนี้เพื่อกำจัดน้ำมันโมเลกุลใหญ่ออกก่อน อย่างไรก็ตามปฏิกิริยาซาฟอนนิฟิเคชันมีผลต่อเสถียรภาพของแกมมาอโรซานอล ดังนั้นหลังจากการปรับสภาพแล้ว น้ำมันที่ได้จึงจำเป็นต้องมีการเติมแกมมาอโรซานอลทั้งนี้เพื่อควบคุมปริมาณแกมมาอโรซานอล ณ สภาวะเริ่มต้นให้ใกล้เคียงกัน นอกจากนี้การกรองสารที่มีปริมาณน้อยๆ (ปริมาณแกมมาอโรซานอลที่น้อย) มีความแตกต่างไปจากการทำงานสภาพจริงที่มีแกมมาอโรซานอล 300-2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงควบคุมค่าความเข้มข้นแกมมาอโรซานอลอยู่ในช่วง 300-400 มิลลิกรัมต่อลิตร

การทดลองเพื่อศึกษาความสามารถการกักกันแกมมาอโรซานอล ประกอบด้วย 3 ส่วน คือ 1. การปรับสภาพเบื้องต้นของน้ำมันรำข้าวดิบด้วยปฏิกิริยาซาฟอนนิฟิเคชัน 2. การเติมแกมมาอโรซานอลในน้ำมันที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว และ 3. การทดลองการกรองด้วยเมมเบรน 2 ระดับคือระดับอัลตราฟิลเตรชัน UP020 ศึกษาการกรองที่ความดัน 10 บาร์ และระดับนาโนฟิลเตรชัน NP010 ใช้ความดัน 28 บาร์ และ NP030 ใช้ความดัน 34 บาร์ และมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

3.3.3.1 การทำซาฟอนนิฟิเคชัน (จุไรวัลย์ รัตนะพิสิฐ และคณะ, 2555)

ในที่นี้แสดงรายละเอียดการทำซาฟอนนิฟิเคชันบนฐานเพื่อให้ได้ส่วนอันซาฟอนนิฟาย 250 มิลลิลิตร ในกรณีที่ต้องการเพิ่มหรือลดปริมาตรของอันซาฟอนนิฟายนั้น สามารถใช้การเทียบปรับอัตราส่วนนี้ได้ โดยมีขั้นตอนดังนี้

1) เตรียมกรดแอสคอบิก (Ascorbic Acid) น้ำหนัก 21.25 g ในเอทานอลแอบซอลูท 1,593.75 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ขนาด 2,000 มิลลิลิตร ทำการคนสารละลายด้วยเครื่องกวนแม่เหล็ก จนสารทั้งหมดละลายเป็นเนื้อเดียวกัน การเตรียมสารละลายในข้อนี้ จะต้องเป็นการเตรียมสดใหม่ทุกครั้ง เนื่องจากการละลายของกรดแอสคอบิกในเอทานอลแอบซอลูทนั้นค่อนข้างยาก จึงเป็นกระบวนการที่ใช้เวลานาน (เมื่อเทียบกับการเตรียมสารในขั้นตอนอื่นๆ) ดังนั้นจึงเตรียมสารละลายกรดแอสคอบิกในเอทานอลแอบซอลูท เป็นลำดับแรก

2) ชั่งน้ำมันรำข้าวดิบ น้ำหนัก 42.5 กรัม ผสมลงในสารละลายกรดแอสคอบิกในข้อ 1 ข้างต้น แล้วคนให้เข้ากัน ทำการผสมกรดแอสคอบิก เนื่องจากกรดแอสคอบิก (คือวิตามินซี) เพื่อป้องกันการทำปฏิกิริยาระหว่างโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์

3) เตรียมสารละลายโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ 10% (w/v) ในเมทานอลดังนี้ ชั่งน้ำหนักโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ 42.5 กรัม ในเมทานอล 425 มิลลิลิตร ทำการคนจนสารเกิดการละลายจนหมด

4) เติมสารละลายโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ 10% ที่เตรียมไว้ในข้อ 3 ข้างต้น ใส่ลงในบีกเกอร์ข้อ 2 (ซึ่งเป็นของสารผสมน้ำมันรำข้าวดิบและกรดแอสคอบิกในเอทานอลแอบซอลูท) จากนั้นให้ทำการคนให้สารให้เป็นเนื้อเดียวกัน

5) แบ่งใส่ขวดรูปชมพู่ 9 ขวดเท่าๆกัน แล้วปิดฝาด้วยกระจกนาฬิกา

6) นำขวดรูปชมพู่ไปอบในตู้อบที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

หมายเหตุ: ตู้อบจะถูกเปิดให้ร้อนจนได้อุณหภูมิคงที่ที่ 70 องศาเซลเซียส แล้ว จึงค่อยนำสารละลายในขวดรูปชมพู่ให้ความร้อน

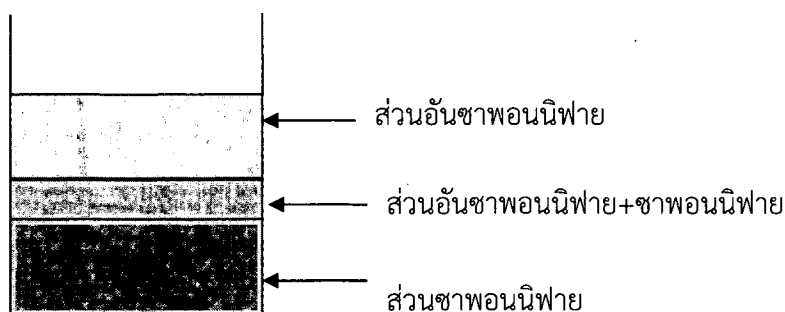
7) เตรียมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ในน้ำกลั่น ความเข้มข้น 25 กรัมต่อลิตร ดังนี้ ชั่งน้ำหนักโซเดียมคลอไรด์ 25 กรัม แล้วละลายลงในน้ำกลั่นจำนวนหนึ่ง จนละลายเข้ากันหมด จากนั้นให้ทำการปรับปริมาตรให้ได้สารละลาย 1 ลิตร

8) จากนั้นทำการเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ทั้ง 9 ขวด (ที่ผ่านการอบร้อนในข้อ 6 แล้ว) โดยเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ขวดละ 59.03 มิลลิลิตร เมื่อเติมแล้ว ให้ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที

สำหรับการเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์นั้น เพื่อต้องการให้เกิดการแยกชั้นของสารได้ชัดเจนมากยิ่งขึ้น ทั้งนี้เพื่อแยกระหว่างส่วนที่เรียกว่า “ซาฟอนนิฟาย” (เป็นส่วนที่เกิดปฏิกิริยาซาฟอนนิฟิเคชันกลายเป็นสบู่) และส่วน “อันซาฟอนนิฟาย” ซึ่งส่วนอันซาฟอนนิฟายจะเป็นส่วนที่มีแกมมาออโรซานองละลายอยู่ นั่นคือส่วนอันซาฟอนนิฟายจึงเป็นส่วนที่จะถูกนำไปใช้ในการกรองต่อไป

ในทางปฏิบัติ การแยกชั้นของส่วนซาฟอนนิฟายและส่วนอันซาฟอนนิฟายสามารถแสดงได้ดังรูปที่ 3.5 ซึ่งการดึงส่วนอันซาฟอนนิฟายจะเป็นการดึงไปเฉพาะชั้นด้านบนสุดเท่านั้น

สำหรับชั้นตรงกลางจะเป็นส่วนผสมระหว่างชาพอนนิฟายและอันชาพอนนิฟาย ในขณะที่ชั้นล่างสุดจะเป็นส่วนชาพอนนิฟายที่เป็นไขสบู่ ดังนั้นชั้นกลางและชั้นล่างสุดจะถูกทิ้งไป เพื่อป้องกันไขสบู่เข้าสู่ระบบการกรองที่อาจส่งผลทำให้เกิดการอุดตันเร็ว

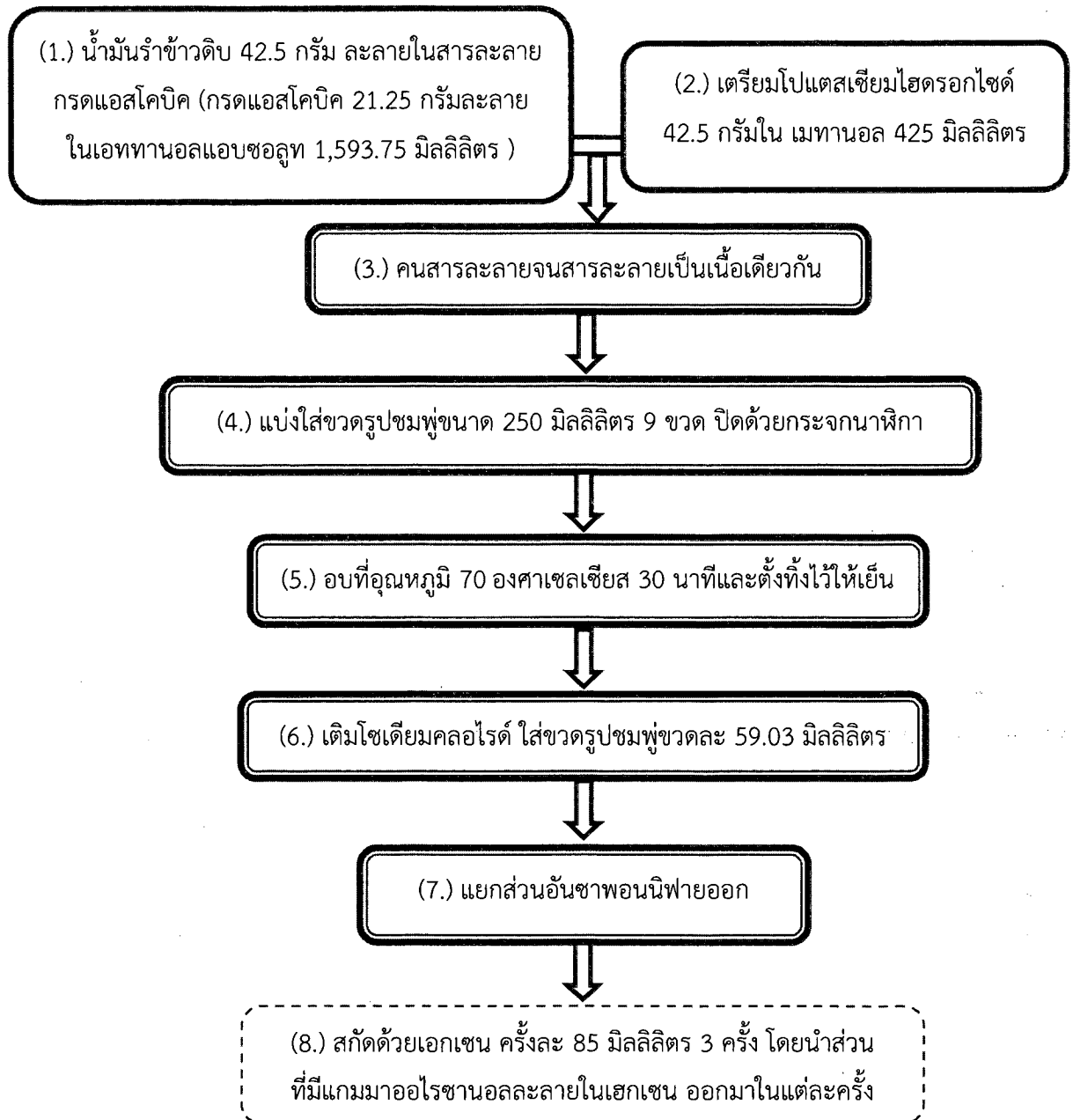


รูปที่ 3.5 การแยกชั้นที่ได้หลังจากการเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์

สำหรับการเตรียมโซเดียมคลอไรด์นั้น มีข้อแนะนำคือควรทำการเตรียมไว้ล่วงหน้าในปริมาณมากเนื่องจากสารจะผสมเป็นเนื้อเดียวกันได้ดีกว่าสารที่เพิ่งทำการเตรียมใหม่ๆ ทำให้มีประสิทธิภาพในการใช้งานมากกว่า นอกจากนี้จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่า การไม่ใส่สารละลายโซเดียมคลอไรด์จะทำให้การแยกชั้นทำได้ยากขึ้น หรือเกิดชั้นกลางในรูปที่ 3.5 ที่กว้างและมีขอบเขตการแยกไม่ชัดเจน ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์

9) ให้ดูดสารที่เป็นส่วนบนสุด (ส่วนอันชาพอนนิฟาย) จากขวดรูปชมพู่ทั้งหมดมารวมกันในปิกเกอร์รวม จากนั้นทำการสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน โดยใช้ปริมาตรเฮกเซนทั้งหมดเพื่อการสกัดในสัดส่วนเชิงปริมาตรระหว่างเฮกเซนต่อน้ำมันรำข้าวดิบคือ 6:1 โดยการสกัดจะแบ่งออกเป็น 3 ครั้ง เพื่อช่วยให้ประสิทธิภาพการละลายดีขึ้น ดังนั้นในการทดลองนี้จึงใช้ปริมาณเฮกเซนในแต่ละครั้งคือ 85 มิลลิลิตร เมื่อทำการสกัดแต่ละครั้งจะแยกสารออกได้เป็น 2 ชั้น คือชั้นบนและชั้นล่าง โดยการทดลองนี้จะทำการแยก ส่วนบนเก็บไว้ (ส่วนบนเป็นส่วนที่มีแกมมาออโรซานอลละลายอยู่ในเฮกเซน) จากนั้นแล้วนำส่วนล่างมาสกัดต่อด้วยเฮกเซน แล้วจึงทำการเก็บแยกชั้นบนเช่นเดิมจากนั้นให้ทำการสกัดครั้งที่สามเป็นครั้งสุดท้ายและแยกเอาส่วนบนออกเหมือนเดิม

ด้วยวิธีการข้างต้น พบว่าเมื่อทำการสกัดครบสามครั้งแล้ว จะได้สารที่สามารถนำไปทำการทดลองการกรองประมาณ 250 มิลลิลิตรสำหรับวิธีการทำชาพอนนิฟิเคชันดังรูปที่ 3.6



รูปที่ 3.6 ขั้นตอนการทำซาพอนนิฟิเคชันน้ำมันรำข้าวดิบ

3.3.3.2 การเติมแกมมาอโรซานอลในน้ำมันที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว

เนื่องจากปฏิกิริยาซาฟอนนิฟิเคชันที่มีผลต่อเสถียรภาพของแกมมาอโรซานอลอย่างสูง จากผลการทดลองเบื้องต้นพบว่าปริมาณแกมมาอโรซานอลในตัวอย่างที่ผ่านการซาฟอนนิฟิเคชันมีค่าน้อยมาก ดังนั้นเพื่อให้การทดลองสามารถควบคุมปัจจัยความเข้มข้นของแกมมาอโรซานอลให้ใกล้เคียงทุกชุดการทดลอง จึงได้มีการปรับค่าแกมมาอโรซานอลในสารป้อนก่อนการกรองให้มีค่าที่ใกล้เคียงกัน ซึ่งในที่นี้มีแนวทางการทำงานดังนี้

การเติมแกมมาอโรซานอลลงในน้ำมันที่ผ่านกระบวนการซาฟอนนิฟิเคชันทำได้ดังนี้ ทำการเติมแกมมาอโรซานอล โดยชั่งแกมมาอโรซานอล 0.5 กรัม และทำการละลายในเฮกเซน 50 มิลลิลิตร ในขวดปริมาตร จะได้ความเข้มข้น 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วนำแกมมาอโรซานอลที่เตรียมได้นั้นปริมาณ 15 มิลลิลิตร เติมน้ำมันที่ได้จากกระบวนการซาฟอนนิฟิเคชัน 500 มิลลิลิตร ก็จะได้ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร

3.3.3.3 การทดลองเพื่อศึกษาความสามารถการกักกันแกมมาอโรซานอลโดยใช้น้ำมันที่ผ่านการซาฟอนนิฟิเคชันและการเติมปริมาณแกมมาอโรซานอล

การทดลองนี้ประกอบด้วยการกรองเป็น 2 ระดับคือ ระดับอัลตราฟิลเตรชัน UP020 ศึกษาการกรองที่ความดัน 10 บาร์ และระดับนาโนฟิลเตรชัน NP010 ใช้ความดัน 28 บาร์ และ NP030 ใช้ความดัน 34 บาร์ เมมเบรนในการทดลองเป็นเมมเบรนใหม่ที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว มีรายละเอียดดังนี้

1) การเตรียมสารป้อน: โดยใช้สารป้อนเป็นน้ำมันที่ผ่านการซาฟอนนิฟิเคชันและการเติมปริมาณแกมมาอโรซานอล ในข้อ 3.3.3.2 โดยเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณแกมมาอโรซานอล

2) การทดลองการกรองระดับอัลตราฟิลเตรชัน UP020: นำสารป้อนใส่ชุดกรองระดับอัลตราฟิลเตรชัน UP020 ณ ความดัน 10 บาร์ ทำการกรองจนกระทั่งได้ปริมาณกระแสเพอร์มิเอท 60 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรสารป้อนเริ่มต้น แล้วจึงหยุดการทดลอง แล้วดำเนินการดังนี้

2.1. เก็บรวบรวมกระแสเพอร์มิเอททั้งหมดเพื่อใช้เป็นสารป้อนในขั้นตอนต่อไป

2.2. เก็บตัวอย่างสารในกระแสเพอร์มิเอทและรีเทนเทต เพื่อวิเคราะห์ปริมาณ
แกมมาออโรซานอล

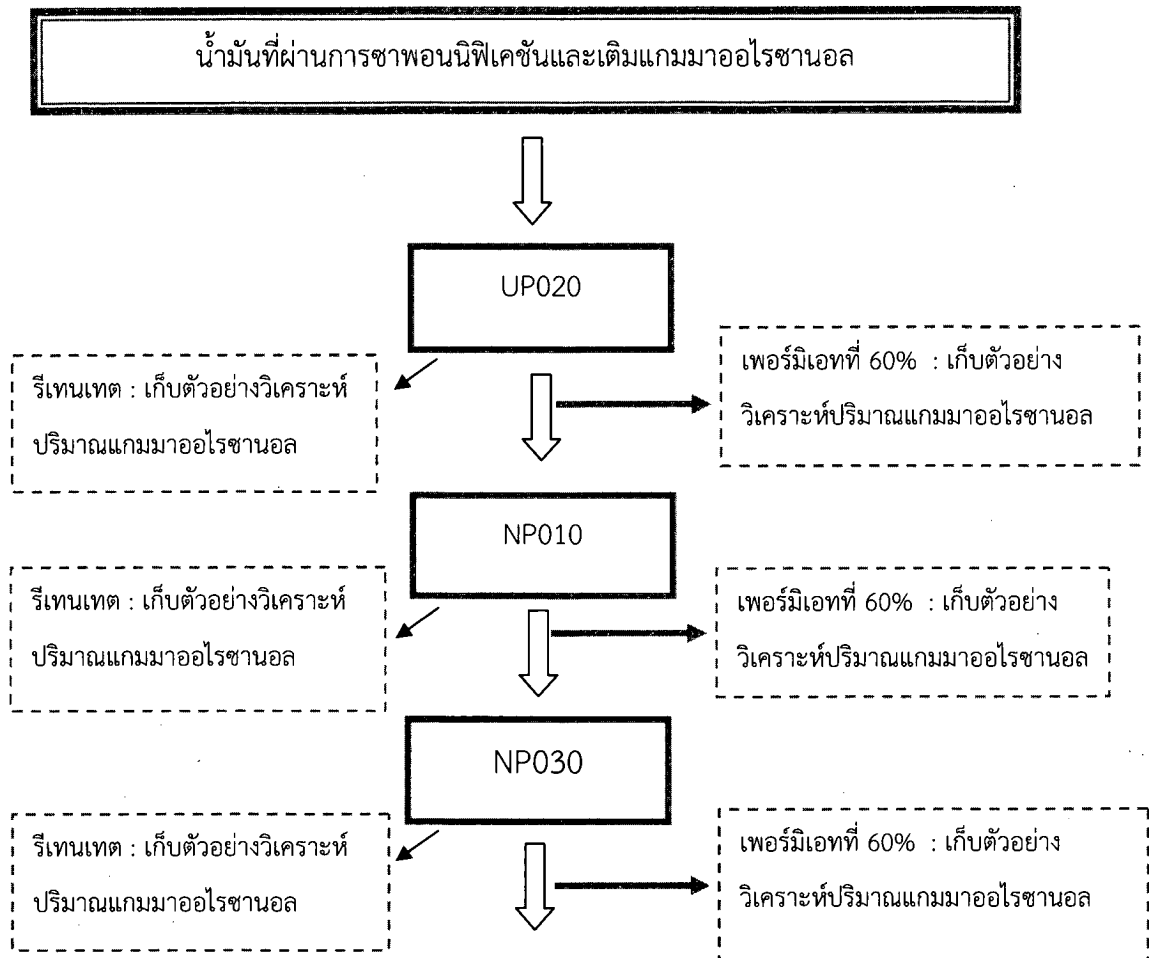
3) การทดลองการกรองระดับนาโนฟิลเตรชัน NP010: นำกระแสเพอร์มิเอทจากการกรองระดับอัลตราฟิลเตรชัน UP020 ในข้อ 3.3.3.3 2) เพื่อเป็นสารป้อน จากนั้นทำการกรองระดับนาโนฟิลเตรชัน NP010 ณ ความดัน 28 บาร์ ทำการกรองจนกระทั่งได้ปริมาณกระแสเพอร์มิเอท 60 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรสารป้อนที่ใช้ในขั้นนี้ แล้วจึงหยุดการทดลอง

3.1. เก็บรวบรวมกระแสเพอร์มิเอททั้งหมดเพื่อใช้เป็นสารป้อนในขั้นตอนต่อไป

3.2. เก็บตัวอย่างสารในกระแสเพอร์มิเอทและรีเทนเทต เพื่อวิเคราะห์ปริมาณ
แกมมาออโรซานอล

4) การทดลองการกรองระดับนาโนฟิลเตรชัน NP030: นำกระแสเพอร์มิเอทจากการกรองระดับอัลตราฟิลเตรชัน NP010 ในข้อ 3.3.3.3 3) เพื่อเป็นสารป้อน จากนั้นทำการกรองระดับนาโนฟิลเตรชัน NP030 ณ ความดัน 34 บาร์ ทำการกรองจนกระทั่งได้ปริมาณกระแสเพอร์มิเอท 60 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรสารป้อนที่ใช้ในขั้นนี้ แล้วจึงหยุดการทดลอง จากนั้นเก็บตัวอย่างสารในกระแสเพอร์มิเอทและรีเทนเทต เพื่อวิเคราะห์ปริมาณแกมมาออโรซานอล

แผนภาพการทดลองเพื่อศึกษาความสามารถการกักกันแกมมาออโรซานอลโดยใช้น้ำมันที่ผ่านการซาฟอนนิฟิเคชันและการเติมปริมาณแกมมาออโรซานอล ดังรูปที่ 3.7



รูปที่ 3.7 ขั้นตอนการแยกด้วยเมมเบรนกับน้ำมันที่ผ่านการซาฟอนนิฟิเคชันและการเติมปริมาณ
แกมมาอโรซานอล

3.4 การวิเคราะห์ปริมาณ

3.4.1 การวิเคราะห์เชิงปริมาณของแกมมาออโรซานอลในน้ำมันรำข้าวที่ผ่านกระบวนการแยกด้วยเยื่อแผ่น โดยเทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิทรี (UV-Visible Spectrophotometry)

การเตรียมสารละลายมาตรฐานแกมมาออโรซานอล เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยชั่งสารตัวอย่าง 0.025 กรัม ละลายในตัวทำละลายเฮกเซนให้ได้ปริมาตร 25 มิลลิลิตร
2. เตรียมสารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร จากสารละลายข้อ 1
3. เตรียมสารละลายมาตรฐานด้วยเฮกเซนที่มีความเข้มข้นต่างๆ เพื่อใช้เป็นสารมาตรฐานในช่วงการใช้งาน (Working Standard) ดังตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 การเตรียมสารมาตรฐานแกมมาออโรซานอลความเข้มข้นต่างๆ

ปริมาตรสารละลายมาตรฐาน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (มิลลิลิตร)	ปริมาตรสารที่เตรียม (มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นของสารละลาย มาตรฐานที่ได้เตรียม (มิลลิกรัมต่อลิตร)
3	10	30
5	10	50
6	10	60
7	10	70
8	10	80
9	10	90

4. วิเคราะห์ด้วยเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer รุ่น UV-2401 PC ยี่ห้อ Shimadzu ที่ช่วงความยาวคลื่น 326 nm แล้วนำความยาวคลื่นที่เหมาะสมสร้างกราฟมาตรฐาน
เข้มข้นของสารตัวอย่าง (มิลลิกรัมต่อลิตร) กับค่าการดูดกลืนแสง

กรดไขมันอิสระ (Free Fatty Acid; AOCS Official Method Ca 12-55)
:S ดังนี้

1. การเตรียมเอทานอลให้เป็นกลาง โดยนำเอทานอลความเข้มข้น 95%บริสุทธิ์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่ หยดฟีนอล์ฟธาลีน อินดิเคเตอร์ 3-4 หยด นำมาไทเทรตด้วย สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ จนสารละลายเปลี่ยนสีเป็นสีชมพู ปิดฝาให้สนิท

2. นำมาให้ความร้อนในอ่างควบคุมความร้อน ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

3. เติมสารตัวอย่างน้ำมันรำข้าว 7.05 กรัม ลงในข้อ 2 เขย่าให้สารเป็นเนื้อเดียวกันในอ่างควบคุมความร้อน เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นตั้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

4. นำมาหยดฟีนอล์ฟธาลีน อินดิเคเตอร์ 3-4 หยด ทำการไทเทรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ จนสารละลายเปลี่ยนสีเป็นสีชมพู

5. บันทึกปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ แล้วนำไปคำนวณหาปริมาณกรดไขมันอิสระในสารตัวอย่างน้ำมันรำข้าว

ข้อควรระวัง และข้อเสนอแนะในการวิเคราะห์กรดไขมันอิสระแสดงในภาคผนวก ข

3.4.2 การวิเคราะห์ฟอสโฟไลปิด (Phospholipids; AOCS Official Method Ca 12-55) ดำเนินตามวิธีมาตรฐาน AOCS ดังนี้

1) การเตรียมสารสำหรับวิเคราะห์ฟอสโฟไลปิด

1. การเตรียมโซเดียมโมลิบเดต นำโซเดียมโมลิบเดต อบที่อุณหภูมิ 101 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ตั้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

2. เติมกรดซัลฟูริก 140 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร จากนั้นเติมโซเดียมโมลิบเดตในข้อ 1. 12.50 กรัม ปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เวลา 24 ชั่วโมง จึงจะนำมาวิเคราะห์ฟอสโฟไลปิด

3. การเตรียมไฮดราซีนซัลเฟต ความเข้มข้น 0.015% (w/v) โดยชั่งไฮดราซีนซัลเฟต 0.150 กรัม นำมาละลายด้วยน้ำกลั่น จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

4. การเตรียมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 50% (w/v) โดยชั่งโพแทสเซียม ไฮดรอกไซด์ 50 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร เขย่า ให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

2) การเตรียมสารละลายมาตรฐานฟอสเฟต

1. เตรียมสารละลายมาตรฐาน โดยชั่งโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.0967 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตร สารละลายนี้ปริมาตร 1 มิลลิกรัมของฟอสฟอรัสต่อ มิลลิลิตรของสารละลาย

2. เจือจางสารละลายมาตรฐาน โดยปิเปตสารละลายในข้อ 1 มา 5 มิลลิลิตร ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 500 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร สารละลายนี้มีปริมาตร 0.01 มิลลิกรัมของฟอสฟอรัสต่อมิลลิลิตรของสารละลาย

ข้อควรระวัง และข้อเสนอแนะในการวิเคราะห์ฟอสโฟไลปิดแสดงในภาคผนวก ข

3) การวิเคราะห์ปริมาณฟอสโฟไลปิดในสารตัวอย่าง (น้ำมันรำข้าว)

1. ชั่งสารตัวอย่าง (น้ำมันรำข้าว) $3.00-3.20 \pm 0.001$ กรัม ใส่ในครุชีเบล เติมซิงค์ ออกไซด์ 0.5 กรัม

2. นำมาให้ความร้อน จนกระทั่งสารตัวอย่างเริ่มหนืด ค่อยๆเพิ่มความร้อน จนกระทั่งสารตัวอย่างเริ่มไหม้ (ในขณะที่ให้ความร้อนต้องคนสารละลายตลอดการให้ความร้อน)

3. นำสารตัวอย่างเข้าเตาเผาที่อุณหภูมิ 500-600 องศาเซลเซียส จำนวน 2 ชั่วโมง แล้วนำออกจากเตาเผา วางให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

4. เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร และกรดไฮโดรคลอริก 5 มิลลิลิตร ลงในแก้ว

5. ปิดด้วยกระจกนาฬิกา และต้มด้วยไฟอ่อนๆ จนเริ่มเดือด

6. นำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman no. 42 ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ล้างด้านในของกระจกนาฬิกาและด้านข้างของถ้วยครุชีเบลด้วยน้ำกลั่นร้อน 5 มิลลิลิตร ล้างถ้วยครุชีเบลและกระดาษกรองอีกสั้ครั้งด้วยน้ำกลั่นร้อน

7. ตั้งสารละลายให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติมสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 50%(w/v) จนเกิดตะกอนซิงค์ออกไซด์ จากนั้นเติมกรดไฮโดรคลอริกจนตะกอนซิงค์ออกไซด์หมดไป และ

เติมกรดไฮโดรคลอริกเพิ่มอีก 2 หยด เพื่อให้แน่ใจว่า ปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น เขย่า

8. ปิเปตสารละลายในข้อ 7 มา 10 มิลลิลิตร ลงในขวดปรับปริมาตร

9. เติมสารละลายไฮดราซีนซัลเฟต 8 มิลลิลิตร และสารละลายโมลิบดีนัม 2 มิลลิลิตร

10. ปิดฝาขวด เขย่า (พลิกขวดกลับไปกลับมา 3-4 รอบ) เปิดฝาดูแล้วให้ความร้อนในอ่างควบคุมความร้อน เป็นเวลา 10 ± 0.5 นาที

11. นำมาวางในน้ำที่อุณหภูมิ 25 ± 5 องศาเซลเซียส ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และผสมให้เข้ากัน

12. นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร เทียบกับสารละลายแบลนด์

13. การเตรียมสารละลายแบลนด์ ทำเช่นเดียวกับข้อ 1-12 แต่ไม่เติมสารตัวอย่าง (น้ำมันรำข้าว)

4) การทำกราฟมาตรฐาน

1. ปิเปตสารละลายเจือจางมาตรฐาน ปริมาณ 0.0, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, และ 10.0 มิลลิลิตร ตามลำดับ ลงในขวดปรับปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร แล้วทำตามข้อ 9-12 จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร สำหรับค่าฟอสฟอรัสมาตรฐานมีค่าตั้งแต่ 0.0, 0.01, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 และ 0.10 มิลลิกรัม

2. สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงในหน่วยนาโนเมตรกับค่าฟอสฟอรัสมาตรฐานในหน่วยมิลลิกรัม