

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

3.1 สารเคมี

ตัวอย่างละลายอินทรีย์ที่ใช้ชนิด เอ อาร์ เกรด ได้แก่

- Ethanol จาก Merck
- 85% phosphoric acid (H_3PO_4) จาก Farmitalia Carlo Erba.
- Petroleum ether จาก J.T. Baker Chemical Co.

ตัวอย่างละลายอินทรีย์ที่ใช้ชนิด เอชพีแอลซี เกรด ได้แก่

- Chloroform ($CHCl_3$), Acetonitrile (CH_3CN) จาก Farmitalia Carlo Erba.
- Methanol (CH_3OH) จาก J.T. Baker Chemical Co.
- Isopropyl alcohol จาก Caledol Laboratories LTD.
- L- α - Phosphatidylcholine 45% (L- α -Lecithin 45%) จาก Sigma Chemical Co.

3.2 เครื่องมือ

3.2.1 Centrifuge Kokusan Model H-251 ของ Kokusan Enshinki Co.,LTD.

3.2.2 เครื่องชั่งละเอียด ของ Sartorius รุ่น 1200

3.2.3 Vortex-genie 2 ของ Scientific Industries,INC.

3.2.4 Separatory funnel

3.2.5 Rotary Evaporator ของ Heidolph รุ่น VV 2000

3.2.6 เครื่อง HPLC ประกอบด้วย Pump Model 510 ,
Lambda-Max Model 401 LC Spectrophotometer,
Injector U6K and Water 740 Data Module ของ Water Associates. และ Column Lichrosorb 5 u silica.
(250 * 4.6 mm.) ของ Phenomenex.

3.2.7 Ultrasonic Cleaner รุ่น Bransonic 221 ของ Smith Kline Company.

3.2.8 เครื่องกรองสุญญากาศ ของ Water Associates. ประกอบด้วย
- Glass filter holder 47 mm
- Vacuum/pressure pump 220 V. 50 Hz.

3.3 การสกัดเลชันจากกัมที่ได้จากโรงงานอุตสาหกรรมน้ำมันก๊วเหลือง

3.3.1 การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการสกัดเลชันจากกัม โดยใช้น้ำหนักตัวอย่างต่างๆ กัน

- ก. ชั่งกัมให้ได้น้ำหนักประมาณ 0.1 , 0.2 และ 0.4 g. บรรจุลงในหลอดทดลองขนาดเล็ก (บันทึกค่าน้ำหนักที่แน่นอนของกัม)
- ข. เติม 100% เอทานอล(ethanol) 2 ml. ลงในหลอดในข้อ ก. และทำการสกัดกัม โดยเครื่อง Vortex Mixer ในแต่ละหลอดนาน 1 min.
- ค. นำสารละลายในข้อ ข. มาทำการปั่นแยกที่ความเร็วรอบ 5000 rpm. เป็นเวลา 10 min.
- ง. เก็บสารละลายส่วนใสไว้ในหลอด vial ขนาดเล็ก 1 ml. เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณเลชันโดยเครื่อง HPLC ต่อไป
- จ. ในทำนองเดียวกันทำการทดลองโดยใช้ เอทานอลความเข้มข้น 90 % , 80% และ 70% (โดยปริมาตร) ตามลำดับ
- ฉ. ทำการทดลองตั้งแต่ข้อ ก.-จ. โดยเปลี่ยนตัวทำละลายอินทรีย์จากเอทานอลเป็น เมทานอล และ ไอโซโพรพานอล ตามลำดับ

3.3.2 การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการสกัดเลชันจากกัม โดยใช้ปริมาตรสารละลายอินทรีย์ต่างๆกัน

- ก. ชั่งกัมให้ได้น้ำหนักประมาณ 0.1 g. บรรจุลงในหลอดทดลองขนาดเล็ก (บันทึกค่าน้ำหนักที่แน่นอนของกัม)
- ข. เติม 100% เอทานอล 1,3,4 และ 5 ml. ลงในแต่ละหลอดในข้อ ก. และทำการสกัดกัม โดยเครื่อง Vortex Mixer ในแต่ละหลอดนาน 1 min.

- ค. นำสารละลายในข้อ ข. มาทำการปั่นแยก ที่ความเร็วรอบ 5000 rpm. เป็นเวลา 10 min.
- ง. เก็บสารละลายส่วนใสใส่ไว้ในหลอด vial ขนาดเล็ก 1 ml. เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณเลซิทินโดยเครื่อง HPLC ต่อไป
- จ. วนทานองเดียวกันทำการทดลองโดยใช้ เอทานอล ความเข้มข้น 90 % , 80 % และ 70 % (โดยปริมาตร) ตามลำดับ
- ฉ. ทำการทดลองตั้งแต่ข้อ ก.-จ. โดยเปลี่ยนตัวทำละลายอินทรีย์จาก เอทานอล เป็น เมทานอล และ ไอโซโพรพานอล ตามลำดับ

3.4 การวิเคราะห์ปริมาณเลซิทินโดยใช้เครื่อง HPLC

3.4.1 การเตรียมสารละลายเลซิทินมาตรฐาน

เตรียมจาก L-Lecithin 45% ละลายในคลอโรฟอร์ม โดยชั่ง L-Lecithin 45% อย่างละเอียด (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) แล้วนำมาละลายในคลอโรฟอร์มให้มีความเข้มข้น 5 mg./ml. (ดูรายละเอียดในภาคผนวก)

3.4.2 การเตรียมวัฏภาคไหล (Mobile phase)

วัฏภาคไหลประกอบด้วย $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_3\text{PO}_4(85\%):\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{OH}$ ในอัตราส่วน 100:1.5:1:1: โดยปริมาตร เตรียมโดยใช้ volumetric flask เขย่าให้เข้ากัน นำไปกรองโดยใช้เครื่องกรองสุญญากาศ ผ่านแผ่นกรองชนิด PTFE Filter (polytetrafluoroethylene filter) ของ Sartorius ที่มีขนาดรูพรุน 0.45 μm . สำหรับกรองสารละลายอินทรีย์ จากนั้นนำไปกำจัดฟองอากาศที่ละลายอยู่ในวัฏภาคไหล ด้วยเครื่องอัลตราโซนิก (ultrasonic bath)

3.4.3 การวิเคราะห์

ก. ทำการ equilibrate column ด้วยวัฏภาคไหล โดยชะในอัตรา 1.5 ml./min. ผ่าน Lichrosorb 5 μ silica ตรวจวัดด้วย UV detector ที่ความยาวคลื่น 205 nm. ความไวเต็มสเกล = 0.01 A. และทำการอินทิเกรตด้วยเครื่องอินทิเกรเตอร์ (integrator) ซึ่งมีค่าการเคลื่อนที่ของกระดาษ (chart feed) เท่ากับ 2 min./cm. และ Attenuation 512

ข. เมื่อ stable แล้ว ฉีดสารละลายเลซิธินมาตรฐานเข้าไปใน injector 5 μ l บันทึกด้วย Water 740 Data Module เพื่อใช้เป็นสารละลายมาตรฐานในการวิเคราะห์สารตัวอย่าง

ค. ฉีดสารตัวอย่างเข้าไปใน injector 5 μ l แล้วบันทึกด้วย Water 740 Data Module นำผลที่ได้ไปคำนวณเปรียบเทียบกับปริมาณเลซิธินกับสารละลายมาตรฐานที่ได้ในข้อที่ ข.