

บทที่ 4

วิธีการทดลองและการวิเคราะห์

4.1 วัสดุตั้งต้น อุปกรณ์และสารเคมี

4.1.1 เหย็ดตั้งเชื้อสีทอง ในส่วนของเหย็ดตั้งเชื้อสีทองที่ใช้เป็นสารตั้งต้นในการสกัดนั้น ผู้วิจัยได้ควบคุมคุณภาพ โดยการนำตัวอย่างเหย็ดตั้งเชื้อสีทอง มาจากแหล่งเดียวกัน และเก็บไว้ที่อุณหภูมิและความชื้นเท่ากันตลอดเวลา

4.1.2 สารเคมี

1. น้ำกลั่น
2. เอทานอล (Analytical Grade)
3. กรดซัลฟูริก (Analytical Grade)
4. โซเดียมไบคาร์บอเนต (Analytical Grade)

4.1.3 อุปกรณ์

1. กรรบด
2. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
3. นาฬิกาจับเวลา
4. เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH Meter)
5. เครื่องแก้วที่ใช้ในการวิเคราะห์
6. เครื่องให้ความร้อนและกวนละลายด้วยแม่เหล็ก (Hot plate stirrer)

4.1.4 เครื่องมือวิเคราะห์ปริมาณคอร์ดิเซปปีน

เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography)

4.2 วิธีการทดลอง

กระบวนการสกัดสกัดคอร์ดิเซปปีนออกจากเหย็ดตั้งเชื้อสีทอง มีขั้นตอนในการสกัดดังนี้

1. นำเหย็ดตั้งเชื้อสีทองที่อบแห้งแล้ว ปริมาณ 3 กรัม มาบดด้วยครก แยกให้มีขนาด 0.49-2.25 มิลลิเมตร
2. นำเหย็ดตั้งเชื้อสีทองใส่ลงในตัวทำละลาย และปั่นด้วยเครื่องกวนสารละลายด้วยแม่เหล็กเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

- เมื่อครบกำหนดเวลา เก็บตัวอย่างโดยกรองให้ถึงเซ้าสีทองออก ตรวจสอบปริมาณคอร์ดิเซป็นด้วยเครื่อง HPLC

หมายเหตุ 1 ในการทดลองจะมีการศึกษาตัวแปรต่างๆตามการออกแบบการทดลองแบบส่วนประสมกลาง (ดังที่กล่าวไว้ในบทที่ 3) โดยวิธีการจัดเตรียมตัวแปรต่างๆ มีดังนี้

- ปรับค่าความเป็นกรด-เบสของตัวทำละลายโดยใช้กรดซัลฟูริกและโซเดียมไฮดรอกไซด์

ให้เป็น 3, 5, 7, 9 และ 11

- ผสมตัวทำละลายให้มีปริมาตร 50, 75, 100, 125 และ 150 มิลลิลิตร โดยใช้ปริมาณเอทานอลในน้ำ เท่ากับ 0%, 25%, 50%, 75% และ 100% โดยปริมาตร

- ปรับอุณหภูมิในการสกัด ให้เป็น 35, 42, 50, 57 และ 65 องศาเซลเซียส

หมายเหตุ 2 การหาปริมาณคอร์ดิเซป็นทั้งหมดที่อยู่ในเห็ดถั่งเช่าสีทอง

การหาปริมาณคอร์ดิเซป็นทั้งหมดที่อยู่ในเห็ดถั่งเช่าสีทอง ทำได้โดยการนำเห็ดถั่งเช่าสีทองมาปริมาณหนึ่ง (เช่น 3 กรัม) และนำมาสกัดด้วยตัวทำละลาย (โดยเลือกสถานะใดก็ได้) แล้วทำการสกัดซ้ำๆ หลายๆ ครั้ง กล่าวคือ ทำการสกัด 1 ครั้ง แล้วนำเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ผ่านการสกัดครั้งแรกนั้น มาสกัดอีกครั้ง โดยใช้ตัวทำละลายใหม่ ทำเช่นนี้เรื่อยไป จนกระทั่งพบว่าไม่มีคอร์ดิเซป็นละลายอยู่ในตัวทำละลาย หลังจากนั้นจึงนำปริมาณคอร์ดิเซป็นในทุกการสกัดมารวมกัน ก็จะได้ปริมาณคอร์ดิเซป็นทั้งหมดที่อยู่ในเห็ดถั่งเช่าสีทอง

4.3 ออกแบบการทดลองแบบส่วนประสมกลาง (Central composite design)

- กำหนดปัจจัยที่มีผลเกี่ยวข้องกับการสกัดออกเป็น 4 ปัจจัยด้วยกันคือ อุณหภูมิ อัตราส่วนโดยปริมาตรระหว่างเอทานอลในตัวทำละลาย ปริมาตรตัวทำละลาย และค่าความเป็นกรด-ด่างของตัวละลาย

2. กำหนดสัญลักษณ์ในเชิงปัจจัยแทนด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษอัน ได้แก่ A แทนค่าอุณหภูมิ, B แทนค่าอัตราส่วนโดยปริมาตรระหว่างเอทานอลในตัวทำละลาย, C แทนค่าปริมาตรตัวทำละลาย และ D แทนค่าค่าความเป็นกรด-ด่างของตัวละลาย
3. กำหนดขอบเขตของการทดลองในรูปแบบของค่าสูง (+1) กับค่าต่ำ (-1) ของแต่ละปัจจัยดังตาราง ข้อมูลที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ขอบเขตของการทดลอง

แทนด้วย สัญลักษณ์	ตัวแปรที่ศึกษา	หน่วย	ค่าที่เปลี่ยนแปลงไป				
			(-2)	(-1)	(0)	(1)	(2)
A	อุณหภูมิ	องศา	35	42	50	57	65
B	อัตราส่วนโดยปริมาตร	-	0	25	50	75	100
C	ปริมาตรตัวทำละลาย	มิลลิลิตร	50	75	100	125	150
D	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	-	3	5	7	9	11

1. กำหนดรูปแบบของการทดลองดังตารางข้อมูลที่ 4.2 โดยให้ (-2) แทนระดับต่ำที่สุดของแต่ละปัจจัย, (-1) แทนระดับต่ำของแต่ละปัจจัย, (0) แทนระดับกลางของแต่ละปัจจัย, (1) แทนระดับสูงของแต่ละปัจจัย และ (2) แทนระดับสูงที่สุดของแต่ละปัจจัย ซึ่งเป็นไปตามรูปแบบแผนการทดลองแบบนี้จะคล้ายกับแผนการทดลองแบบ Fractorial Design โดย CCD จะประกอบด้วยตำแหน่งการทดลองของ Fractorial Design ซึ่งมีตำแหน่งการทดลองทั้งหมด 16 ตำแหน่ง (2^4) และจะมีตำแหน่งการทดลองที่เพิ่มขึ้นมาอีก 8 ตำแหน่ง คือ ตำแหน่งที่เป็น แนว +2 หรือ -2 ในแนวแกน ตำแหน่งตรงกลางของพื้นที่การทดลองอีก 7 ตำแหน่ง คือ Central Point (ตำแหน่ง 0,0)
2. ดำเนินการทดลองทางแบบส่วนประสมกลาง เพื่อบันทึกผลที่เกิดขึ้นจากการสกัดคอร์ดิเซปินออกจากถั่งเช่าสีทองโดยใช้การสกัดด้วยตัวทำละลายจากวิธีเบื้องต้น

ตารางที่ 4.2 ตารางการออกแบบการทดลอง

จำนวน การ ทดลอง	อุณหภูมิ (A)	อัตราส่วนโดยปริมาตร ระหว่างเอทานอลในตัว ทำละลาย (B)	ปริมาตรตัวทำ ละลาย (C)	ค่าความเป็น กรด-ด่างของตัว ทำละลาย (D)
1	-1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1	-1
3	-1	1	-1	-1
4	1	1	-1	-1
5	-1	-1	1	-1
6	1	-1	1	-1
7	-1	1	1	-1
8	1	1	1	-1
9	-1	-1	-1	1
10	1	-1	-1	1
11	-1	1	-1	1
12	1	1	-1	1
13	-1	-1	1	1
14	1	-1	1	1
15	-1	1	1	1
16	1	1	1	1
17	-2	0	0	0
18	2	0	0	0
19	0	-2	0	0
20	0	2	0	0
21	0	0	-2	0
22	0	0	2	0
23	0	0	0	-2
24	0	0	0	2
25	0	0	0	0
26	0	0	0	0
27	0	0	0	0
28	0	0	0	0
29	0	0	0	0
30	0	0	0	0
31	0	0	0	0

4.4 การวิเคราะห์ผล

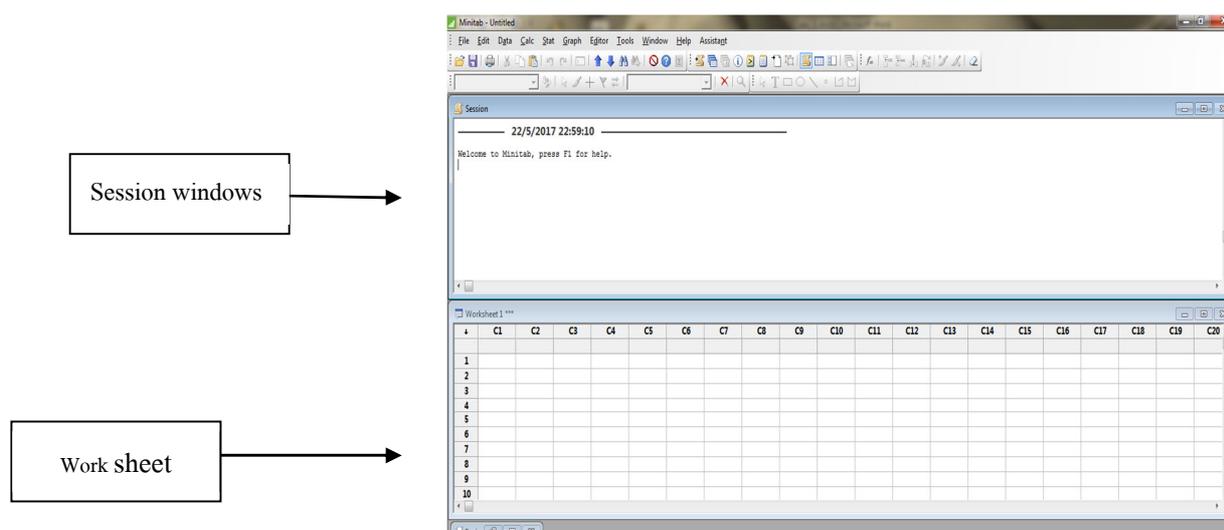
- นำสารละลายที่ได้จากการสกัดคอร์ดิเซปินออกจากถังเช่าสีทองไปตรวจหาปริมาณคอร์ดิเซปินในแต่ละการทดลองด้วยเครื่อง HPLC หลังจากนั้นนำผลที่ได้ในแต่ละการทดลองมาหาเปอร์เซ็นต์การสกัดเปรียบเทียบกับ ดังสมการ

$$\%ex = \frac{m_i}{m_t} \times 100$$

โดยที่ m_i คือ ปริมาณคอร์ดิเซปินที่สกัดได้ในแต่ละการทดลอง (ไมโครกรัม)

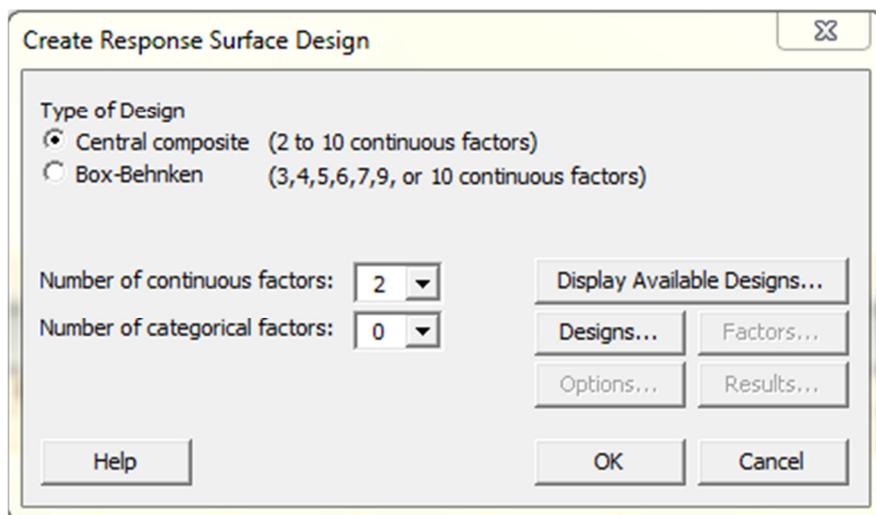
m_t คือ ปริมาณคอร์ดิเซปินที่อยู่ในถังเช่าสีทอง (สำหรับงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยได้ทดลองหาแล้วว่า ปริมาณคอร์ดิเซปินที่อยู่ในถังเช่าสีทอง 3 กรัม มีค่า 12,037 ไมโครกรัม

- ในการใช้โปรแกรม Minitab เพื่อออกแบบการทดลองแบบการทดลองแบบ Central Composite Design สามารถทำได้ตามขั้นตอนดังต่อไปนี้
 - ติดตั้งโปรแกรม Minitab V17 หลังจากติดตั้งโปรแกรม คลิกเข้าสู่หน้า ของโปรแกรม เริ่มต้นใช้งาน
 - เมื่อเข้าสู่โปรแกรมจะพบ 2 ส่วนหลักบนหน้าจอ ได้แก่ ส่วนที่ 1 คือ session windows ซึ่งจะแสดงผลการวิเคราะห์ในรูปแบบของตัวอักษร (text) และในวินโดว์นี้สามารถป้อนคำสั่งเข้าไปแทนการใช้เมนูของได้ ส่วนที่ 2 คือ Data window จะมีแผ่นงานที่มีลักษณะคล้ายตารางคำนวณ (SpreadSheet) ซึ่งสามารถเปิดได้หลายแผ่นงาน ดังแสดงในรูปที่ 4.1



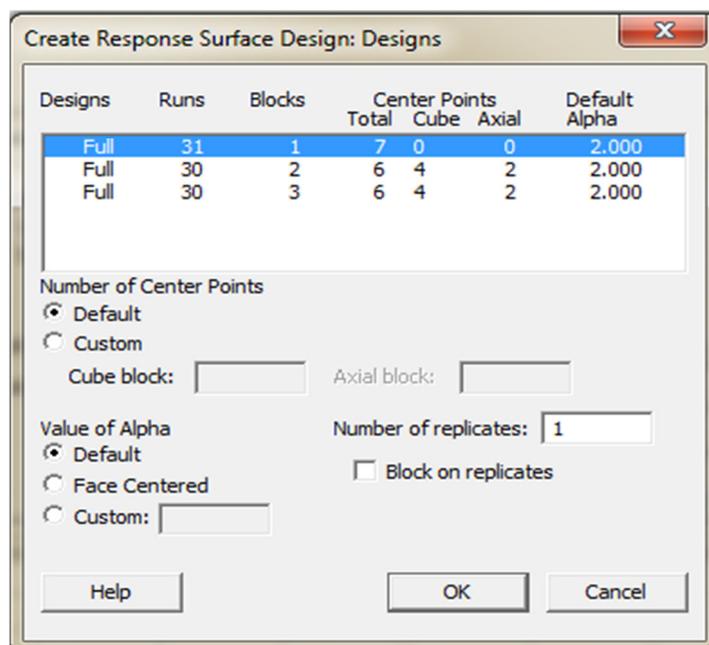
รูปที่ 4.1 แสดงองค์ประกอบของหน้าจอหลักในการป้อนข้อมูลของ Minitab

- ทำการป้อนข้อมูลในรูปแบบแฟคทอเรียลแบบ 2 โดยเข้าไปที่ Stat ในแถบเครื่องมือด้านบน
→ เลือก DOE → เลือก Response surface → เลือก Create Factorial Design จะเกิดบด็อก
สี่เหลี่ยมของแถบเครื่องมือขึ้นมาใหม่ดังรูปที่ 4.2



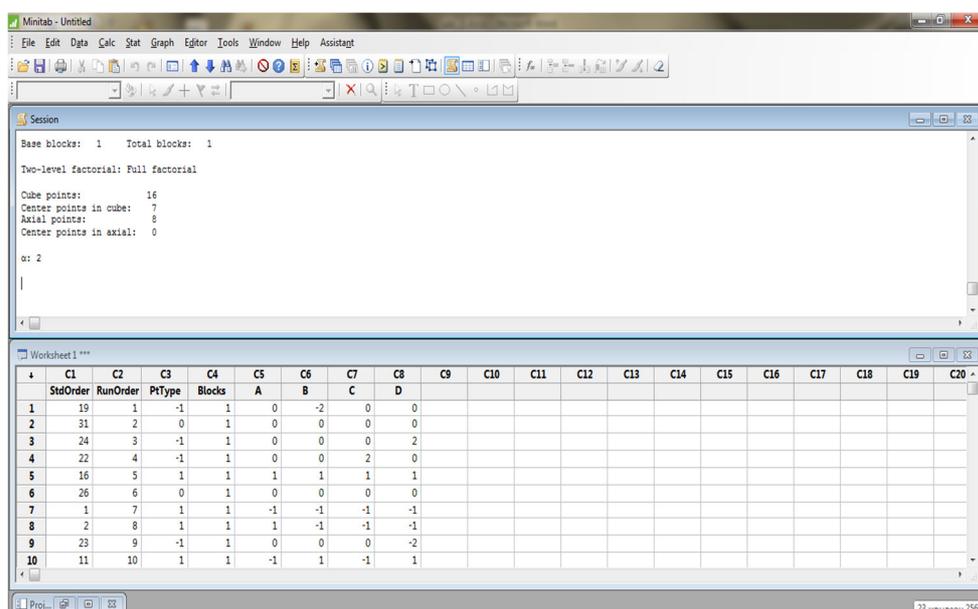
รูปที่ 4.2 หน้าจอแสดงวิธีการป้อนข้อมูล

- เลือก Central composite → เลือก Number of factors 4 → คลิก Designs ปรากฏหน้าจอดังรูป
ที่ 4.3



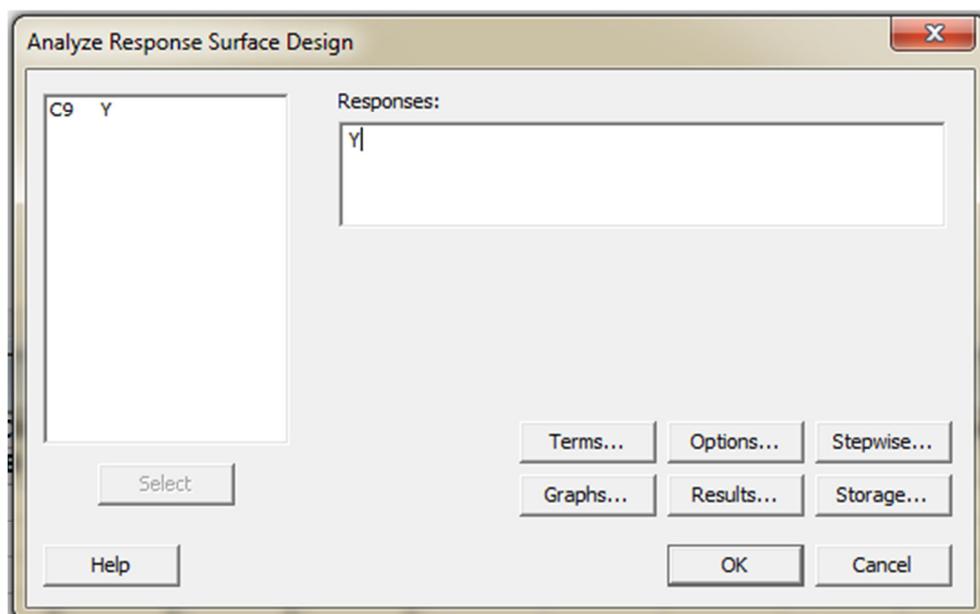
รูปที่ 4.3 หน้าจอแสดงวิธีการป้อนข้อมูล

- ปรากฏหน้าจอดังรูปที่ 4.4 เลือก Full factorial → Number of replicates for corner point:3 → คลิก OK



รูปที่ 4.4 หน้าจอแสดงวิธีการป้อนข้อมูล

- จากรูปที่ 4.4 นั้น จะทำการจัดเรียงข้อมูลใหม่โดยทำการตั้งค่าที่ Stats → DOE → Display Design → Standard Order For Design → คลิก OK จากนั้นจะทำการจัดเรียงข้อมูลที่ Standard Order ในแผ่นงานใหม่และเปลี่ยนค่าตัวแปรเชิงสัญลักษณ์ใหม่ เช่น A เปลี่ยนเป็นอุณหภูมิ , B เปลี่ยนเป็นอัตราส่วนโดยปริมาตรของเอทานอลในตัวทำละลาย , C เปลี่ยนเป็นปริมาตรตัวทำละลาย D เปลี่ยนเป็นค่าความเป็นกรด-ด่างของตัวทำละลาย และ Column C9 เพิ่มตัวแปร Y ซึ่งแสดงผลของร้อยละของการสกัดที่ได้ในแต่ละการ ทดลองทำการป้อนข้อมูลลงในโปรแกรม
- เมื่อทำการป้อนข้อมูลที่ได้จากการทดลองเรียบร้อยแล้วจะทำการประมวลผลและทำวิเคราะห์ผลโดยเข้าไปที่ Stat → DOE → Response Surface → Analyze Response Surface Design จะปรากฏดังรูปที่ 4.5 เพื่อเลือกปัจจัยที่ใช้เป็นค่าตอบสนอง โดยในที่นี้คือร้อยละการสกัด จากนั้นโปรแกรมจะทำการประมวลผลในรูปแบบการเชิงถดถอยและค่าตัวแปรต่างๆที่เกี่ยวข้องในการวิเคราะห์ตามทฤษฎีทางสถิติ



รูปที่ 4.5 หน้าจอแสดงวิธีการป้อนข้อมูล

จากนั้นทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ตัวแปรต่างๆในทางสถิติ ดังนี้

1. ตัวแปรที่ส่งผลต่อกันมากที่สุด
2. ตัวแปรเดียวที่ส่งผลต่อการสกัด
3. สมการความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรต่างๆกับการสกัด
4. ตัวแปรที่มีผลมากหรือน้อยที่สุดต่อการสกัด