

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 สารเคมีและตัวอย่าง

ชื่อสารเคมี	ประเภท	บริษัทผู้ผลิต
All-trans-Retinol	Standard	Sigma, U.S.A
α -Tocopherol	Standard	Sigma, U.S.A
Methanol	HPLC grade	Merck, Germany
Acetonitrile	HPLC grade	Lab-Scan, Ireland
Ethanol	AR grade	Merck, Germany
Hexane	HPLC grade	Ulsan, Korea
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	AR grade	Merck, Germany

3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

- เครื่องชั่งวิเคราะห์ (Analytical Balance, AG 204 Mettler Toledo)
 - เครื่อง High Performance liquid Chromatography (SCL-10P, Shimadzu)
- ประกอบด้วย Pump : LC-10AD
- Detector : SPD-10A
- Column : C8-3 Inersil GL science 4.6 mm x 150 mm

- เครื่อง UV-visible spectrophotometer (บริษัท ไชแอนติฟิกโปรโมชัน จำกัด)
- เครื่องปั่นละเอียด (National, Japan)
- เครื่อง Soxhlet extraction
- ตู้อบ (Binder, บริษัท ไชแอนติฟิกโปรโมชัน จำกัด)
- ชุดกรองสูญญากาศ (Power consumption, Taiwan)
- เครื่อง pH-meter รุ่น MP-220
- เครื่อง Electronic overhead stirrers
- เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน Rotary Evaporator
- ไมโครปิเปต ขนาด 100, 200 และ 1000 μL



3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การเตรียมเมล็ดข้าวโพด

- ทำการสุ่มตัวอย่างคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวโพดที่นิยมปลูกในเขตพื้นที่จังหวัดพิษณุโลก มาจำนวน 2 สายพันธุ์
- นำเมล็ดข้าวโพดไปอบด้วยตู้อบควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
- การสกัดน้ำมันข้าวโพดด้วยทำละลายที่เหมาะสมต่างๆ โดยวิธี Soxhlet extraction และวิธีอื่น ๆ ที่สนใจ

3.3.2 การสกัดน้ำมันข้าวโพด

- การสกัดน้ำมันจากผลข้าวโพดแห้ง

ซึ่งตัวอย่างเมล็ดข้าวโพดที่อบแล้ว 1 กิโลกรัม แخذด้วยสารละลาย

ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ 0.5 เปอร์เซ็นต์



ล้างด้วยน้ำกลั่นให้สะอาดผึ่งให้แห้ง



บดให้เป็นผงละเอียดด้วยเครื่องบดละเอียด แล้วเก็บใส่ภาชนะ



นำไปแช่ด้วยน้ำกลั่น โดยเติมน้ำกลั่นให้ท่วมปิดฝาให้สนิทแช่เป็นเวลา 3 วัน



แยกต้นอ่อน (germ) ที่ลอยอยู่ด้านบนนำไปอบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส



นำไปสกัดด้วย hexane โดยใช้เครื่อง Soxhlet apparatus เป็นเวลา 3 ชั่วโมง



เก็บน้ำมันที่ได้ใส่ลงในขวดที่มีฝาปิดสนิท



นำน้ำมันที่ได้นำมาคำนวณหาค่า % yield

$$\text{สูตรหารหาค่า \% yield} = \frac{\text{น้ำหนักของน้ำมันที่ได้}}{\text{น้ำหนักของเมล็ดข้าวโพดที่ใช้สกัด}} \times 100$$

- การสกัดน้ำมันจากผลข้าวโพดสด การสกัดน้ำมันจากผลข้าวโพด ทำได้ 2 วิธีคือ

1) สกัดโดยใช้ Organic Solvent

ชั่งน้ำหนักข้าวโพดให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน แล้วนำไปสกัดน้ำมันโดยใช้ Soxhlet Apparatus โดยสกัดด้วย Hexane หรือ Petroleum Ether และ/หรือ Dichloromethane เรียงตามลำดับ ใช้เวลาในการสกัดเป็นเวลา 3 ชั่วโมง

2) สกัดโดยใช้ Aqueous Solvent

ล้างผลข้าวโพด แยกเอาส่วนเนื้อไปปั่นให้ละเอียด ชั่งเนื้อข้าวโพดที่ปั่นแล้วให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน เติมน้ำในเครื่องปั่น แล้วเติมน้ำเกลือลงไป ทำการปั่นอีกครั้งหนึ่ง แล้วเท Slurry ที่ปั่นได้ใส่ใน Beaker นำไปตั้งบนอ่างน้ำร้อนอุณหภูมิประมาณ 75–77 °C จากนั้นนำไป Centrifuge แยกเอากากออก

นำเอาส่วนที่เป็นน้ำผสมกับน้ำมันใส่กรวยแยก แล้วตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น ไซเออาชั้นที่เป็นน้ำมันใส่ Beaker เติม anhydrous sodium sulfate ลงไปเพื่อดูดน้ำออก ก็จะได้น้ำมันที่ปราศจากน้ำ

3.3.3 คุณสมบัติทางกายภาพ

ทดสอบคุณสมบัติของน้ำมันข้าวโพดที่สกัดได้ เช่น สี กลิ่น และลักษณะความใส ชุ่ม และทดสอบความพึงพอใจของน้ำมันที่สกัดได้ เป็นต้น

- การหาค่าเปอร์เซ็นต์ Transmittance ของน้ำมัน

เจือจางน้ำมันที่สกัดได้ด้วยคลอโรฟอร์ม อัตราส่วน 1:1000 วัดค่า %transmittance ที่ความยาวคลื่นที่แสงถูกดูดกลืนมากที่สุดของน้ำมัน

- การหาค่าความหนืด

ล้าง viscosimeter ให้สะอาดด้วย chromic acid และ acetone แล้วทำให้แห้ง ใช้ น้ำและ benzene ดูดใส่ viscosimeter จับเวลาที่สารละลายไหลจากขีดบนถึงขีดล่าง เพื่อหาค่าคงที่ จากนั้นใส่น้ำมันที่ต้องการหาความหนืดลงใน viscosimeter จับเวลาในการไหล นำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าความหนืด

- การวิเคราะห์หาปริมาณ Gum

ใช้น้ำมันประมาณ 5 กรัม อบในตู้อบ 120 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้น้ำระเหยออกจากน้ำมันให้หมด อบกระดาษกรอง Whatman No.1 ที่ 100 °C ทำให้เย็นในอุณหภูมิตูความชื้น แล้วชั่งน้ำหนักไว้ เติม acetone ลงในน้ำมัน ทำให้สารละลายเย็น 15 °C กรองผ่านกระดาษกรอง โดยใช้ acetone ที่ละ 50 มิลลิลิตร จนสารละลายที่กรองได้ไม่มีสีน้ำมัน นำกระดาษกรองและสิ่งติดอยู่บนกระดาษกรองไปอบให้แห้งทำให้เย็นในอุณหภูมิตูความชื้นชั่งน้ำหนักที่ได้ แล้วนำค่าไปคำนวณหา %Gum

3.3.4 คุณสมบัติทางเคมี

ศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของน้ำมันที่สกัดได้ โดยทำการวัดค่า pH, Iodine Value, Saponification Value และ Unsaponifiable Matter ของน้ำมันที่สกัดได้

- การหาค่าคงที่ของน้ำมันข้าวโพด

การวิเคราะห์องค์ประกอบที่เป็น น้ำมัน ไขมัน เรซิน ตามปกติแล้วหาออกมาเป็นค่าของคุณสมบัติทางฟิสิกส์และทางเคมี โดยทั่ว ๆ ไปแล้วเรียกว่าค่าคงที่ (Constants) ซึ่งจะ

มีค่าคงที่ต่างๆ ตามที่กำหนดไว้ ใช้สำหรับวิเคราะห์ว่าตัวยาเหล่านั้นมีความบริสุทธิ์หรือมีของปนปลอมมาด้วยหรือไม่

▪ **การวิเคราะห์หาค่า Saponification Value ของน้ำมัน**

ชั่งตัวอย่างน้ำมันข้าวโพดอย่างถูกต้องประมาณ 2 กรัม ใส่ลงไปใน flask ขนาด 250 mL แล้วเปิดสารละลาย alcoholic 0.5 N KOH ใส่ลงไป 25 mL ต่อเข้ากับ air condenser นำไปต้ม บนอ่างน้ำเดือดประมาณ 30 นาที เขย่า flask บ่อยๆ เติมน้ำยาทดสอบ phenolphthalein T.S ลงไป 1 mL แล้วไทเทรตหาปริมาณ KOH ที่เหลือด้วยสารละลายมาตรฐานของ 0.5 N HCl ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นของ saponification จะเป็นไปตามสมการ



▪ **การวิเคราะห์หาค่า Unsaponifiable Value ของน้ำมัน**

ชั่งน้ำมันข้าวโพดอย่างถูกต้องประมาณ 5 กรัม ใส่ลงใน flask ขนาด 250 mL เติมน้ำยาของ potassium hydroxide 2 กรัม ใน alcohol 40 mL นำไป heat under reflux เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำเอาส่วนผสมนี้มาระเหยบนอ่างน้ำเดือดเพื่อไล่ alcohol ออก ละลายส่วนที่เหลือในน้ำร้อน 50 mL และถ่ายลงใน separator สกัดด้วย ether จำนวน 50 mL 2 ครั้ง ไซเออชั่น ether ใส่ลงไปใน separator อีกอันหนึ่ง แล้วล้างด้วยน้ำยา NaOH ทดสอบด้วย phenolphthalein ไซชั่น ether ลงใน beaker ที่ชั่งน้ำหนักแล้ว นำ beaker ไประเหยบนอ่างน้ำเดือดเพื่อไล่ ether ออก นำไปอบที่ 100 °C ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น บันทึคน้ำหนักที่แน่นอนส่วนที่เหลือจากการระเหยของ Unsaponifiable matter

▪ **Iodine Value ของน้ำมัน**

ชั่งน้ำมันข้าวโพดอย่างถูกต้องประมาณ 0.2 กรัม ใส่ลงใน iodine flask ขนาด 250 mL เติม chloroform ลงไป 10 mL และ iodo-bromine T.S จำนวน 25 mL แล้วปิดจุกให้

แน่น แกว่งให้เข้ากันเบาๆ ตั้งเก็บทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาที โดยนำมาเขย่าบ้างเป็นครั้งคราว เมื่อครบ 30 นาที แล้วไทเทรต iodine ที่แยกตัวออกมาอิสระด้วย 0.1 N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ และเติมน้ำแข็ง แล้วไทเทรตต่อจนสีน้ำเงินหายไป บันทึกปริมาตรที่ใช้ไป คำนวณค่า iodine value

3.3.5 การวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินเอและวิตามินอี

วิเคราะห์หาปริมาณวิตามินเอและวิตามินอี ในน้ำมันข้าวโพดที่สกัดได้จากพันธุ์ต่างๆ โดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

▪ การเตรียมสารละลายมาตรฐานของวิตามินเอและวิตามินอี

ชั่งสารมาตรฐานวิตามินเอ ให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน 5 mg ละลายด้วยเมทานอล เทใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 10 mL แล้วปรับปริมาตรด้วยเมทานอลจนครบปริมาตร จะได้สารละลายมาตรฐานวิตามินเอ ที่มีความเข้มข้น 500 mg/L

ชั่งสารมาตรฐานวิตามินอี ให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน 5 mg ละลายด้วยเมทานอล เทใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 10 mL แล้วปรับปริมาตรด้วยเมทานอลจนครบปริมาตร จะได้สารละลายมาตรฐานวิตามินอี ที่มีความเข้มข้น 500 mg/L

นำสารละลายมาตรฐานวิตามินเอ และวิตามินอี ที่มีความเข้มข้น 500 mg/L มาทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังตารางที่ 3.1



ตารางที่ 3.1 แสดงการเตรียมสารละลายมาตรฐานวิตามินเอ และวิตามินอี

ความเข้มข้น (mg/L)	วิตามินเอ + วิตามินอี (µL)	เมทานอล (µL)
5	10 + 10	980
10	20 + 20	960
20	40 + 40	920
40	80 + 80	840
60	120 + 120	760
80	160 + 160	680
100	200 + 200	600

การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินเอและวิตามินอี จากน้ำมันข้าวโพดด้วยเทคนิค HPLC

1) ศึกษาความยาวคลื่นของการดูดกลืนแสงสูงสุดของวิตามินเอและวิตามินอี

เจือจางสารละลายมาตรฐานวิตามินเอและวิตามินอี ที่ความเข้มข้น 500 mg/L

ให้ได้ความเข้มข้นเป็น 10 mg/L แล้วนำสารมาตรฐานวิตามินเอและวิตามินอี ไปวัดค่าการ

ดูดกลืนแสงสูงสุดด้วยเครื่อง UV-Visible spectrophotometer แล้วบันทึกค่าการดูดกลืนแสง

สูงสุด เพื่อนำไปใช้วิเคราะห์หาปริมาณวิตามินเอและวิตามินอี โดยใช้เทคนิค HPLC ที่พัฒนา

ระบบขึ้น

2) การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของระบบ HPLC

2.1) การศึกษาชนิดของเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ที่เหมาะสม

โดยพิจารณาจากการแยกของสารสำคัญที่สนใจที่มีผลต่อสภาพความมีขั้วของ

ตัวทำละลายของเฟสเคลื่อนที่ โดยปรับอัตราส่วนระหว่างตัวทำละลายอินทรีย์กับน้ำในเฟส

เคลื่อนที่ และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม ทั้งนี้ได้พิจารณาในเรื่องความดันของระบบและเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วย

2.2) การศึกษาอัตราการไหล (flow rate) ที่เหมาะสม

โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานวิตามินเอและวิตามินอี ความเข้มข้น 10 mg/L ฉีดเข้าสู่ระบบ HPLC โดยเลือกเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสมสำหรับวิเคราะห์ปริมาณวิตามินเอและวิตามินอี โดยตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 325 และ 292 นาโนเมตร ตามลำดับ ได้ทำการศึกษาอัตราการไหล (flow rate) ตั้งแต่ 0.8–1.5 mL/min

2.3) การศึกษาความเป็นเส้นตรง

เตรียมสารละลายมาตรฐานวิตามินเอและวิตามินอี ให้มีความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 1, 5, 10, 20, 40, 60, 80 และ 100 mg/L ตามลำดับ (ดังตารางที่ 3.1) ปรับปริมาตรด้วยเมทานอล แล้วนำสารละลายมาตรฐานไปฉีด (inject) เข้าสู่ระบบ HPLC ที่ปริมาตร 20 μ L และทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

3.3.6 การตรวจสอบความถูกต้อง

▪ การศึกษาความแม่นยำ (precision)

เตรียมสารละลายมาตรฐานวิตามินเอและวิตามินอี ที่มีความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 5, 10 และ 20 mg/L ตามลำดับ ปรับปริมาตรด้วย DMSO แล้วนำไปฉีด (inject) เข้าสู่ระบบ HPLC ที่ปริมาตร 20 μ L ทำการทดลองซ้ำ 7 ซ้ำ (intra-day) และทำการทดลองซ้ำระหว่างวัน (inter-day) แล้วนำผลที่ได้ไปคำนวณหาค่า S.D หรือ %R.S.D

▪ การศึกษาความถูกต้อง (accuracy)

เตรียมโดยชั่งน้ำมันข้าวโพด ให้มีน้ำหนักที่แน่นอน 500 mg ปรับปริมาตร 5 mL ด้วย DMSO แล้วบีบเปิดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 500 μ L ใส่ลงในขวดปรับปริมาตร

ขนาด 5 mL จำนวน 5 ขวด ขวดที่ 1 ปรับปริมาตรด้วย DMSO ส่วนขวดที่ 2, 3, 4 และ 5 เติมสารละลายมาตรฐานวิตามินเอและวิตามินอี ปริมาตร 20, 40, 80 และ 120 μL ตามลำดับ แล้วปรับปริมาตรด้วย DMSO จนปริมาตรครบ 1 mL แล้วนำไปฉีด (inject) เข้าระบบ HPLC ที่ ปริมาตร 20 μL ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง แล้วนำผลที่ได้ไปคำนวณหาค่า % recovery

- การศึกษาขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์ (limit of detection) และปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (limit of quantitative)

หาได้จากกราฟมาตรฐานวิตามินเอและวิตามินอี โดยใช้สมการเส้นตรงในการคำนวณค่า LOD = 3.3(S.D/s) และ LOQ = 10 (S.D/s) โดยที่ S.D คือส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของสัญญาณและ s คือความชันของเส้นตรง

3.3.7 เตรียมผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางจากน้ำมันข้าวโพด

การเตรียมครีมหรือโลชั่นทาผิวจากน้ำมันข้าวโพดที่สกัดได้ แล้วศึกษาความคงตัวของครีมและโลชั่นและทดสอบความพึงพอใจ

- การเตรียมโลชั่น ได้ศึกษาสูตรการเตรียมโลชั่นน้ำมันข้าวโพด ดังนี้

สูตรที่ 1	ใช้อัตราส่วน	Span 80	15 g
		Tween 80	15 g
		Corn oil	2 g
		Water	68 g
สูตรที่ 2	ใช้อัตราส่วน	Span 80	30 g
		Tween 80	30 g
		Corn oil	2 g

		Water	38 g
สูตรที่ 3	ใช้อัตราส่วน	Span 80	20 g
		Tween 80	10 g
		Corn oil	2 g
		Water	68 g
สูตรที่ 4	ใช้อัตราส่วน	Span 80	10 g
		Tween 80	20 g
		Corn oil	2 g
		Water	68 g
สูตรที่ 5	ใช้อัตราส่วน	Span 80	10 g
		Tween 80	5 g
		Corn oil	2 g
		Water	83 g
สูตรที่ 6	ใช้อัตราส่วน	Span 80	5 g
		Tween 80	10 g
		Corn oil	2 g
		Water	83 g

วิธีการเตรียมโลชัน มีดังนี้

1. ชั่ง Span 80 และ Tween 80 รวมกันแล้วนำไปคนให้เข้ากันด้วย magnetic stirrer ให้ Span 80 และ Tween 80 ผสมจนเข้าเป็นเนื้อเดียวกัน

2. นำไปปั่นด้วยเครื่อง electronic overhead stirrer ด้วยความเร็วรอบ 500 รอบ/นาที แล้วค่อยๆเติมน้ำลงไปช้า ๆ รอให้ Span 80, Tween 80 และน้ำผสมเข้ากันดีแล้ว ค่อยเติมน้ำมันข้าวโพดลงไป แล้วตามด้วยน้ำหอม 1-2 หยด รอจนส่วนผสมต่างเข้ากันดีแล้วจึง นำ โลชั่นออกจากเครื่อง electronic overhead stirrers

▪ การเตรียมครีม

ตำรับยาพื้นครีมที่เลือกประกอบด้วย

Phase A: Oil phase

Cetyl alcohol	2.0 g
Stearyl alcohol	2.0 g
Liquid paraffin	36.0 g
Stearic acid	6.0 g
Petrolatum	20.0 g

Phase B: Water phase

Propylene glycol	10.0 g
Triethanolamine	1.8 g
Conc. Paraben	2.0 G
Purified water	36.2 G

วิธีการเตรียมครีม มีดังนี้

1. หลอม Phase A รวมกับน้ำมันข้าวโพด 2 กรัม จนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน โดยเริ่มหลอมที่อุณหภูมิสูงที่สุดก่อนตามลำดับบนหม้ออังไอน้ำ อุณหภูมิประมาณ 65-70 °C

2. ละลาย Phase B ในน้ำอุ่นอุณหภูมิ 70-75 °C

3. เติม Phase A ลงใน Phase B ช้า ๆ อย่างต่อเนื่อง เติมน้ำหอมลงไป 1-2 หยด พร้อมกับคนตลอดเวลา จนอุณหภูมิใกล้เคียงกับอุณหภูมิห้อง

▪ การประเมินลักษณะทางกายภาพและความคงตัวของตำรับครีมหรือโลชั่น

1) วัด pH ของครีมหรือโลชั่น

ชั่งครีมหรือโลชั่นหนัก 1 กรัม ใส่ใน beaker ขนาด 10 mL เติมน้ำกลั่นลงไป 10 ml คนจนละลายให้เข้ากัน แล้ววัด pH โดยใช้ pH meter

2) ลักษณะทางกายภาพของครีมหรือโลชั่น

สังเกตดูลักษณะทางกายภาพของครีม ซึ่งได้แก่ สี กลิ่น เนื้อครีม การแยกชั้น และความหนืด

3) ศึกษาความคงตัวของวิตามินในตำรับครีมทาผิวหรือโลชั่น

ทดสอบหลังจากเก็บไว้ที่สภาวะเร่งต่างๆ ได้แก่อุณหภูมิ 4 °C อุณหภูมิ 25 °C และอุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลา 4 เดือน โดยวิธี HPLC

ชั่งครีม 1 กรัม ใส่ในขวด vial ขนาด 5 mL ทั้งหมดจำนวน 75 vial เก็บไว้ที่สภาวะเร่งต่างๆ ได้แก่ อุณหภูมิ 4 °C จำนวน 25 vial อุณหภูมิ 25 °C จำนวน 25 vial และอุณหภูมิ 45 °C จำนวน 25 vial

▪ การประเมินความพึงพอใจในการใช้ครีมหรือโลชั่น

ประเมินโดยใช้แบบสอบถาม ถ้ามจากอาสาสมัครที่ทดลองใช้ครีม โดย
สอบถามด้านลักษณะทางกายภาพ ได้แก่ กลิ่น สี ความเนียน ความหนืด ความชุ่มชื้นที่ให้กับ
ผิว และความเหนอะหนะเวลาทา

▪ เตรียมสบู่

เตรียมสบู่จากน้ำมันข้าวโพดที่สกัดได้ และประเมินลักษณะทางกายภาพและ
ความคงตัว

ส่วนผสมของสบู่

น้ำมันข้าวโพด	154 g
น้ำมันปาล์ม	154 g
โซเดียมไฮดรอกไซด์	55 g
น้ำ	130 g
น้ำหอม (1-2%)	12 g

▪ เตรียมอาหารเสริมสุขภาพ

พัฒนาตำรับน้ำมันข้าวโพด เพื่อบรรจุในเจลลาตินแคปซูลชนิดแข็ง ศึกษาความ
เข้ากันได้ของตัวยา (น้ำมันสกัดจากข้าวโพด) กับเจลลาตินแคปซูลชนิดแข็ง และสารช่วยต่าง ๆ
ที่จะใช้ในตำรับ ตลอดจนการศึกษาด้านความคงตัวต่ออุณหภูมิ แสง และความชื้นเป็นต้น