

PHORBOL ESTERS EXTRACTION FROM JATROPHA CURCAS RESIDUE
KERNEL MEALS USING SURFACTANT SOLUTION



Miss Kanokwan Chaichodkunchai

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Environmental Management

(Interdisciplinary Program)

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 2008

Copyright of Chulalongkorn University

การสกัดสารฟอรับอลเอสเทอร์จากกากเนื้อเมล็ดสับดำโดยสารละลายกรดแรงตั้งผิว

นางสาว กนกวรรณ ชัยโชติกุลชัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาการจัดการสิ่งแวดล้อม (สหสาขาวิชา)

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

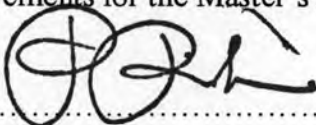
ปีการศึกษา 2551

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

511466

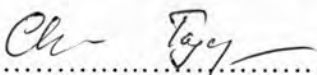
Thesis Title PHORBOL ESTERS EXTRACTION FROM *Jatropha*
curcas RESIDUE KERNEL MEALS USING
SURFACTANT SOLUTION
By Miss Kanokwan Chaichodkunchai
Field of Study Environmental Management
Advisor Chantra Tongcumpou, Ph.D.

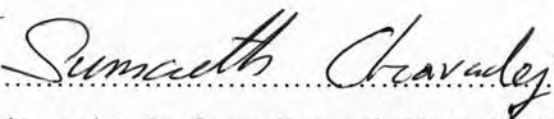
Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial
Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

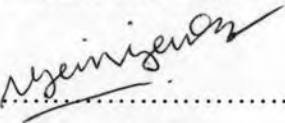

..... Dean of the Graduate School
(Associate Professor Pornpote Piumsomboon, Ph.D.)

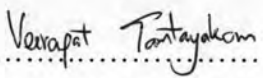
THESIS COMMITTEE


..... Chairman
(Assistant Professor Manaskorn Rachakornkij, Ph.D.)


..... Advisor
(Chantra Tongcumpou, Ph.D.)


..... Examiner
(Associate Professor Sumaeth Chavadej, Ph.D.)


..... Examiner
(Nyein Nyein Aung, Ph.D.)


..... External Examiner
(Veerapat Tantayakom, Ph.D.)

กนกวรรณ ชัยโชติกุลชัย : การสกัดสารฟอรับอลเอสเทอร์จากกากเนื้อเมล็ดสบู่ดำโดย
 สารละลายลดแรงตึงผิว. (PHORBOL ESTERS EXTRACTION FROM *Jatropha*
curcas RESIDUE KERNEL MEALS USING SURFACTANT SOLUTION)
 อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ดร.จันทรา ทองคำภา, 103 หน้า.

ฟอรับอลเอสเทอร์เป็นสารพิษชนิดหนึ่งที่พบในเมล็ดสบู่ดำ ซึ่งจะพบปนเปื้อนทั้งใน
 น้ำมันและกากสบู่ดำที่เหลือจากการหีบเนื่องด้วยจากคุณสมบัติที่ชอบละลายในสารละลายมีขั้ว
 ต่ำของสารนี้ ด้วยเหตุนี้ทำให้การใช้ประโยชน์กากสบู่ดำมีความจำกัดในการนำไปใช้ประโยชน์
 ด้านอื่นนอกจากทำเป็นปุ๋ยได้ ทั้งที่มีส่วนประกอบของโปรตีนสูงถึง 40% และเพราะข้อจำกัดจาก
 การปนเปื้อนสารพิษ งานวิจัยนี้จึงนำเสนอวิธีการกำจัดฟอรับอลเอสเทอร์ออกจากกากสบู่ดำโดย
 ใช้สารละลายลดแรงตึงผิว สารกำจัดฟอรับอลเอสเทอร์จะทำการศึกษาโดยใช้ทั้งสารละลายลด
 แรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุอย่างเดี่ยว และสารละลายลดแรงตึงผิวชนิดผสม โดยใช้เครื่องโครมาโท
 กราฟีของเหลวสมรรถนะสูงในการวิเคราะห์ปริมาณของฟอรับอลเอสเทอร์ จากผลการวิจัยพบว่า
 กากสบู่ดำหลังจากการหีบมีปริมาณฟอรับอลเอสเทอร์ 1.45 มิลลิกรัมต่อกรัม และเมื่อผ่านการ
 กำจัดสารโดยสารละลายชนิดต่างๆ พบว่า น้ำมีประสิทธิภาพกำจัดเพียง 22.49% สารละลายลด
 แรงตึงผิวไม่มีประจุที่ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลมีประสิทธิภาพ 81.43% และ 81.87% สำหรับทวิน
 80 และดีไฮดอลเอลเอส 9 ตามลำดับ ส่วนสารละลายลดแรงตึงผิวไม่มีประจุความเข้มข้น 40 มิลลิ
 โมล ที่ผสมด้วย แอโรซอลโอที (สารลดแรงตึงผิวประจุลบ) 5 มิลลิโมล และ กลีโกลิโคไซด์คอลลอยด์
 100 มิลลิโมล มีประสิทธิภาพ 81.23% และ 78.85% สำหรับสารผสมทวิน 80 และสารผสมดี
 ไฮดอลเอลเอส 9 ตามลำดับ ระยะเวลาการสกัดที่เหมาะสมคือที่ 15 นาที การเพิ่มประสิทธิภาพ
 การกำจัดทำได้โดยการสกัดกากสบู่ดำซ้ำและการเพิ่มอัตราส่วนของสารละลายต่อกากสบู่ดำ
 แม้ว่าการกำจัดสารฟอรับอลเอสเทอร์ด้วยสารละลายลดแรงตึงผิวเพียงอย่างเดียวยังไม่สามารถ
 กำจัดจนลดลงเท่าสบู่ดำพันธุ์ไม่มีพิษ วิธีการนี้สามารถพัฒนาเพื่อให้เหมาะสมกับการกำจัดสารได้
 เพื่อเพิ่มการใช้ประโยชน์ของกากสบู่ดำตามวัตถุประสงค์ต่างๆ

สาขาวิชาการจัดการสิ่งแวดล้อม.....
 ปีการศึกษา 2551.....

ลายมือชื่อนิสิต กนกวรรณ ชัยโชติกุลชัย.....
 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

5087505420 : MAJOR ENVIRONMENTAL MANAGEMENT

KEYWORDS : *Jatropha curcas* / PHORBOL ESTERS / SURFACTANT / EXTRACTION

KANOKWAN CHAICHODKUNCHAI : PHORBOL ESTERS EXTRACTION FROM *Jatropha curcas* RESIDUE KERNEL MEALS USING SURFACTANT SOLUTION. ADVISOR : CHANTRA TONGCUMPOU, Ph.D., 103 pp.

Phorbol esters (PEs) are toxic compounds found in the *Jatropha curcas* seeds. Due to their hydrophobic property, PEs still remain in *Jatropha* oil and residual meals after extraction process. This becomes a limitation for further applications of the oil and its meals. Even though the meals of *Jatropha* seed contains protein up to 40%, its toxicity restricts its application only for fertilizer production. To solve this problem, this work introduced a new technique to PEs removal in residual meals by using surfactant solutions. Nonionic surfactant and mixed surfactant solutions were investigated on PEs removal from residual meals obtained by various types of extraction methods. Determination of PEs were carried out by HPLC. The results show that the amount of PEs in the mechanical pressed meals was around 1.45 mg/g. The PEs removal efficiencies were 22.49%, 81.43%, 81.23%, 81.87% and 78.85% from water, single 40 mM Tween80, mixed 40 mM Tween80 with 5 mM AOT and 100 mM NaCl, single 40 mM Dehydol LS9, and mixed 40 mM Dehydol LS9 with 5 mM AOT and 100 mM NaCl, respectively. The optimal extraction time was 15 min. Re-extraction and increasing of liquid portion per solid portion was able to increase the removal efficiency of PEs. However, this technique only cannot remove PEs from the meals as low as those found in non-toxic variety. Nonetheless, this method can be considered as a promising technique for the PEs removal from the meal and hence, it can benefit the residue meal in term of value-addition for further application.

Field of Study : Environmental Management Student's Signature Kanokwan
Academic Year : 2008 Advisor's Signature Ch. T.

ACKNOWLEDGEMENTS

This thesis work cannot be possibly done and be successful by only one man without these persons and these groups.

First of all, I would like to express recognition and thanks to my graceful advisor, Dr. Chantra Tongcumpou for many mindful to provide the useful information and knowledge, give many good recommendations when I face with problems in this work.

I would like to express gratitude with respectfully to Assistant Professor Dr. Manaskorn Rachakornki who is the chairman of the committee, Associate Professor Dr. Sumaeth Chavadej and Dr. Nyein Nyein Aung who are the committees for their helpful suggestions and recommendations for my thesis work.

To full fill my master degree and this thesis work, I would like to thank National Center of Excellence for Environmental and Hazardous Waste Management (NCE-EHWM) for scholarship, funding and conveniences, and funding from the Graduate School to fulfill this work.

Moreover, I would like to express my sincere gratitude to PTT Chemical Public Company Limited, Thailand (PTTCH) for supporting funding, surfactants and *Jatropha curcas* seeds and meals for experiments in this research. Also, special thanks to Dr. Veerapat Tantayakorn for great helpful to contact the company and be my external committee.

Many thanks to the staffs at NCE-EHWM laboratory, Miss Chantana Intim and Miss Benjawan Noinumnon, all staff at NCE-EHWM program especially Mr. Soontorn Pannok for helpful to facilitate my work.

A lot of thanks belong to my friends at Mahidol University and at NCE-EHWM for inspiring my power to complete my work. Special thanks to Pilada, Warangkana, Silawut, Witchaya, Noukamol, Siriporn, Worachat, Napasawan and Sirikarn for listening to my trouble and suggest the solutions, also kindness for sharing the laboratory glassware and some equipments.

At last in this acknowledge page but not last of all, I would like to express my indefinite appreciation and love to my family for standing beside my life with cheerfulness and love.

CONTENTS

	Page
ABSTRACT (THAI)	iv
ABSTRACT (ENGLISH)	v
ACKNOWLEDGEMENTS	vi
CONTENTS	vii
LIST OF TABLES	xi
LIST OF FIGURES	xii
ABBREVIATIONS	xiv
CHAPTER I Introduction	1
1.1 Motivations.....	1
1.2 Objectives.....	2
1.3 Hypotheses.....	3
1.4 Working Scope.....	3
1.4.1 Develop method for phorbol esters extraction.....	3
1.4.2 Part II.....	4
1.4.2.1 <i>Jatropha curcas</i> meals.....	4
1.4.2.2 Phorbol esters extraction by surfactant solution..	4
1.4.2.3 Phorbol esters determination.....	4
1.4.2.4 Quality of the <i>Jatropha</i> meal.....	4
1.5 Expected Results.....	4
CHAPTER II Theory and Literature Review	7
2.1 <i>Jatropha curcas</i> L.	7
2.1.1 Oil content.....	7
2.1.2 Nutrient in seed.....	9
2.1.3 Phorbol esters.....	10
2.2 Oil extraction method.....	13
2.3 Surfactant.....	13
2.3.1 Interfacial tension reduction phenomena.....	14
2.4 Ultrasonic extraction.....	14
2.5 Related work.....	15

	Page
CHAPTER III Methodology	20
3.1 Type of study.....	20
3.2 Workplace.....	20
3.3 Material.....	20
3.3.1 <i>Jatropha curcas</i> seeds, pressed meals and oil.....	20
3.3.2 Surfactants.....	20
3.3.2.1 Nonionic surfactants.....	20
3.3.2.2 Anionic surfactants.....	22
3.3.2 Chemical.....	23
3.4 Methodology.....	23
3.4.1 <i>Jatropha</i> seeds preparation.....	23
3.4.2 Phorbol esters extraction for quantitative determination... ..	23
3.4.3 The oil extraction by Soxhlet.....	24
3.4.4 The oil extraction by surfactant aqueous-base.....	24
3.4.5 Phorbol ester extraction in meal.....	24
3.4.6 Nutrient study.....	25
3.5 Analytical method.....	25
3.5.1 Quantitative of oil contain by Soxhlet (AOAC, 2006)	25
3.5.2 Quantitative of oil yield.....	25
3.5.3 Quantitative of middle phase height.....	26
3.5.4 Quantitative of crude protein (AOAC, 2006).....	26
3.5.5 Quantitative of phorbol esters.....	26
CHAPTER IV Results and Discussion	27
4.1 Phorbol Esters Extraction Method for Determination by HPLC.....	27
4.1.1 Determination the optimum condition for extraction methods.....	27
4.1.2 Modification of extraction technique for efficiency enhancement.....	29
4.1.3 Verification of the selected extraction method.....	30

	Page
4.2 Physical and Chemical Properties of <i>Jatropha curcas</i> Seeds, Meals and Oil.....	32
4.2.1 Physical and chemical properties of seeds.....	32
4.2.2 Properties of <i>Jatropha</i> oil and residual meals from different oil extraction method.....	33
4.3 Phorbol Esters Removal from Meals using Surfactant Solutions.....	35
4.3.1 Investigation for surfactant solutions.....	36
4.3.1.1 Phorbol esters removal by nonionic surfactant systems.....	36
4.3.1.2 Phorbol esters removal by mixed surfactant solution.....	41
4.3.1.2.1 Effect of anionic surfactant (AOT) concentration.....	42
4.3.1.2.2 Effect of electrolyte (NaCl).....	43
4.3.1.3 Comparison of single nonionic surfactant and mixed surfactants systems.....	45
4.3.2 Effect of physical parameters on phorbol esters removal..	46
4.3.2.1 Contact time.....	46
4.3.2.2 Solid:liquid ratio.....	47
4.3.2.3 Re-extraction.....	48
4.3.2.4 Reuse solution study.....	49
4.3.3 Up-scale the removal process.....	51
4.3.4 Effect of phorbol esters removal process on crude protein in residual meals.....	52
CHAPTER V Conclusions and Recommendations.....	55
5.1 Conclusions.....	55
5.2 Recommendations.....	58
REFERENCES.....	60
APPENDICES.....	65
Appendix A Calibration curve of TPA standard of this research.....	66

	Page
Appendix B Phorbol esters extraction method for determination by HPLC data.....	67
Appendix C Physical and chemical properties of <i>Jatropha curcas</i> seeds, meals and oil data.....	72
Appendix D Phorbol esters removal from meals using surfactant Solution data.....	75
Appendix E Crude protein study report.....	90
Appendix F Statistic data test by one-way ANOVA.....	91
BIOGRAPHY	103

LIST OF TABLES

Table	Page
2.1 Oil proportion in <i>Jatropha curcas</i> seeds (%wt).....	8
2.2 Free fatty acid in <i>Jatropha curcas</i> oil.....	8
2.3 Crude protein content in <i>Jatropha curcas</i> seeds by percent weight.....	9
2.4 Phorbol esters in <i>Jatropha curcas</i>	10
2.5 The toxicity studies of phorbol esters.....	12
2.6 The Efficiency of oil extraction (Jongschaap et al., 2007).....	13
3.1 Properties of nonionic surfactants: ethoxylate group.....	21
3.2 Properties of nonionic surfactants: Tween group.....	22
3.3 Structure of AOT, anionic surfactant used in this study.....	22
4.1 Recovery (%) of phorbol esters (TPA) extraction method.....	31
4.2 Physical properties of <i>J. curcas</i> seeds.....	32
4.3 Chemical properties of <i>J. curcas</i> seeds in this study.....	33
4.4 Properties of oil and meals from different oil extraction methods.....	35
4.5 Properties of nonionic surfactant and phorbol esters removal (%) by 40 mM of various types of nonionic surfactants.....	37
4.6 The ingredient of surfactant solutions in percent weight.....	46
4.7 Crude protein content in initial pressed meals and residual meals after phorbol esters removal by surfactant solution.....	53
5.1 Summary of properties from the pressed meals detoxification by the surfactant solution.....	57

LIST OF FIGURES

Figure	Page
1 Flow chart of the scope of this study.....	6
2.1 Formula structure of <i>J. curcas</i> oil (Jongschaap et al., 2007).....	9
2.2 The structure of phorbol esters: (a) general structure, (b) 12-o-tetradecanoyl -phorbol-13-acetate (TPA), (c) 12-deoxy-16-hydroxyphorbol and (d) 12-deoxy-16-hydroxyphorbol-4'-[12',14'-butadienyl]-6'-[16',18',20'-nonatrienyl]-bi-cyclo [3.1.0]hexane-(13-o)-2'-[carboxylate]-(16-o)-3'-[8'-butenoic-10']ate (DHPB).....	11
3.1 Fatty alcohol ethoxylate structure.....	21
3.2 Tween 20 structure.....	22
4.1 Comparison of phorbol esters extraction efficiency between shaking at different rate and sonicating.....	28
4.2 Comparison of phorbol esters extraction efficiency between shaking and sonicating from the duration of extraction time 5 min to 2 hrs.....	29
4.3 Comparison of phorbol esters extraction efficiency of the shaking extraction and other two modified methods; 1) sonicating 10 min before shaking and 2) triple of 2 hrs-shaking.....	30
4.4 Phorbol esters removal (%) with 40 mM of nonionic surfactant solution: T20, T40, T60 and T80 are Tween 20, Tween 40, Tween 60 and Tween 80, respectively while LS3, Ls 7 and LS9 are Dehydol LS3, Dehydol LS7 and Dehydol LS9, respectively.....	37
4.5 Effect of EON, C-chain length and HLB on the removal of phorbol esters (PEs) of a) fatty alcohol C12-14 EO group, b) Tween group and c) fatty alcohol C12-14 EO and Tween groups	39
4.6 Phorbol esters removal with nonionic surfactant solutions at concentration from 10 to 40 mM	40
4.7 Phorbol esters removal by systems of Tween 80 and Dehydol LS9 at the various concentrations from 10 to 100 mM	41
4.8 Phorbol esters removal with 40 mM Tween 80 and 40 mM Dehydol LS9 mixed with AOT and 100 mM NaCl.....	43

Figure	Page
4.9 Phorbol esters removal with 40 mM Tween 80 and 40 mM Dehydol LS9 mixed with 5 mM AOT and NaCl	44
4.10 Phorbol esters removal using selected single nonionic surfactant (40 mM) and mixed surfactant (40 mM nonionic surfactant and 5 mM AOT with 100 mM NaCl) systems compared with only D.I.water.....	45
4.11 Effect of contact time to phorbol esters removal by Mixed of 40 mM Tween 80 and 5 mM AOT with 100 mM NaCl	47
4.12 Phorbol esters removal by mixed of 40 mM Dehydol LS9 and 5 mM AOT with 100 mM NaCl in solid:liquid ratio and varies contact time.....	48
4.13 Phorbol esters removal from once and twice extractions by new solution, using same meals at 1 g:10 mL ratio; Single T80 as 40 mM Tween 80, Single LS9 as 40 mM Dehydol LS9, Mixed T80 as mixed of 40 mM Tween 80 and 5 mM AOT with 100 mM NaCl, and Mixed LS9 as mixed of 40 mM Dehydol LS9 and 5 mM AOT with 100 mM NaCl.....	49
4.14 Comparison phorbol esters removal from new surfactant solutions and the reused surfactant solutions; Single T80 as 40 mM Tween 80, Single LS9 as 40 mM Dehydol LS9, Mixed T80 as mixed of 40 mM Tween 80 and 5 mM AOT with 100 mM NaCl, and Mixed LS9 as mixed of 40 mM Dehydol LS9 and 5 mM AOT with 100 mM NaCl.....	50
4.15 Comparison of phorbol esters removal between a experimental test-tube - scale of 1 g meals/20 ml solution in 40 with 8 times larger scale in 250 mL Erlenmeyer flask; Single T80 as 40 mM Tween 80, Single LS9 as 40 mM Dehydol LS9, Mixed T80 as mixed of 40 mM Tween 80 and 5 mM AOT with 100 mM NaCl, and Mixed LS9 as mixed of 40 mM Dehydol LS9 and 5 mM AOT with 100 mM NaCl.....	52
5.1 The phase of phorbol esters in the removal system by overall from the 4 surfactant solutions; Single T80 as 40 mM Tween 80, Single LS9 as 40 mM Dehydol LS9, Mixed T80 as mixed of 40 mM Tween 80 and 5 mM AOT with 100 mM NaCl, and Mixed LS9 as mixed of 40 mM Dehydol LS9 and 5 mM AOT with 100 mM NaCl.....	58

ABBREVIATIONS

AOT	=	Aerosol OT
EO	=	Ethylene oxide
EON	=	Ethylene oxide number
g	=	Gram
g/L	=	Gram per liter
HLB	=	Hydrophile-lipophile balance
IFT	=	Interfacial tension
mg/g	=	Milligram per gram
mL	=	Milliliter
PEs	=	Phorbol esters
%wt	=	Percent by weight