

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 อุปกรณ์การทดลอง แสดงดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องมือ	ยี่ห้อ / รุ่น	บริษัทผู้ผลิต
1. เครื่องกำเนิดคลื่นอัลตราโซนิก (Ultrasonic cleaner)	Delta D200	D.S.G. Group
2. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Water bath shaker)	WRT	New brunswick scientific CO.,INC., USA
3. เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary vacuum evaporator)	RE 52	Yamato, Japan
4. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)	UV 160	Shimadzu, Japan
5. เครื่องสกัดสารด้วยของไหลเหนือ จุดวิกฤต (Supercritical fluid extraction)	SFE 400	Supelco
6. เครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิด- โครมาโตกราฟี (HPLC)	LC-8A	Shimadzu, Japan
7. ตู้อบสุญญากาศ (Vacuum drying oven)	DP 41	Yamato, Japan
8. Morat magnetic stirrer Morat heating unit	M22 / 1	Framo geratetechnik, Germany

3.1.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง แสดงดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารเคมี	เกรด / บริษัทผู้ผลิต
1. ผงถ่านกัมมันต์ชนิดผง	KK / บริษัทกรเกียรติ จำกัด, ประเทศไทย
2. ไดคลอโรมีเทน	Analytical grade / Merck, Germany
3. ไตรเอทิลเอมีน	Fluka, USA
4. โทลูอีน	Commercial grade (กลั่นก่อนใช้), Analytical grade / Merck, Germany
5. บิวทิลไฮดรอกซีโทลูอีน (BHT)	Food grade
6. เมทานอล	HPLC grade / Merck, Germany
7. อะซีโตไนไตรล์	HPLC grade / Merck, Germany
8. เอทานอล	Commercial grade (กลั่นก่อนใช้)
9. เฮกเซน	Commercial grade (กลั่นก่อนใช้)
10. สารมาตรฐานบีตา-แคโรทีน	Sigma, USA
11. น้ำมันปาล์มดิบ	บริษัท มรกตอินดัสตรีส์ จำกัด (มหาชน) บริษัท ล่ำซง (ประเทศไทย) จำกัด (มหาชน)

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 วิเคราะห์ปริมาณสารแคโรทีนอยด์ในน้ำมันปาล์มดิบ โดยวิธี ยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตเมตรี

3.2.1.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานบีตา-แคโรทีนในโทลูอีน ที่ความเข้มข้น 1 – 5 มิลลิกรัม/ลิตร นำไปวิเคราะห์หาความยาวคลื่นในช่วง visible light ที่สารละลายมาตรฐานบีตา-แคโรทีนในโทลูอีนสามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ซึ่งผลการวิเคราะห์พบว่า ความยาวคลื่นที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด คือ 462 นาโนเมตร (สเปกตรัมการดูดกลืนแสงแสดงในภาคผนวก ก)

3.2.1.2 วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานบีตา-แคโรทีน ที่เตรียมไว้ ที่ความยาวคลื่น 462 นาโนเมตร แล้วนำข้อมูลค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐาน ดังแสดงในภาคผนวก ข

3.2.1.3 ชั่งน้ำมันปาล์มดิบ 0.01 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลองชนิดเกลียวมีฝาปิด จากนั้นละลายด้วยโทลูอีน 1.0 มิลลิลิตร แล้วเจือจางตามความเหมาะสม นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 462 นาโนเมตร แล้วคำนวณหาความเข้มข้นของสารแคโรทีนอยด์ในน้ำมันปาล์มดิบจากกราฟมาตรฐาน

3.2.2 วิเคราะห์ปริมาณบีตา-แคโรทีน ในน้ำมันปาล์มดิบ โดยวิธี HPLC

3.2.2.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานบีตา-แคโรทีนในโทลูอีน ที่ความเข้มข้น 2 – 10 มิลลิกรัม/ลิตร นำมากรองผ่านกระดาษกรอง PTFE ขนาด 0.45 ไมครอน แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้ภาวะในการวิเคราะห์ดังตารางที่ 3.3 จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐาน ดังแสดงในภาคผนวก ค

3.2.2.2 ชั่งน้ำมันปาล์มดิบ 0.01 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลองชนิดเกลียวมีฝาปิด จากนั้นนำมาละลายด้วยโทลูอีน 1.0 มิลลิลิตร แล้วทำการเจือจางตามความเหมาะสม กรองผ่านกระดาษกรอง PTFE ขนาด 0.45 ไมครอน นำไปวิเคราะห์ปริมาณบีตา-แคโรทีนด้วยเครื่อง HPLC แล้วคำนวณหาความเข้มข้นของบีตา-แคโรทีนในน้ำมันปาล์มดิบจากกราฟมาตรฐาน

ตารางที่ 3.3 ภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์บีตา-แคโรทีน โดยเครื่อง HPLC (11)

ภาวะในการวิเคราะห์	
คอลัมน์	Shim-pack CLC-ODS, Steel 150x6.0 มิลลิเมตร
สารละลายตัวพา	อะซิโตน:ไตรล์ : เมทานอล : ไดคลอโรมีเทน 55 : 30 : 15
อัตราการไหล	1.0 มิลลิลิตร/นาที
ความดัน	140 กิโลกรัม/ตารางเซนติเมตร
ปริมาณที่ใช้วิเคราะห์	10 ไมโครลิตร
อุณหภูมิ	25 องศาเซลเซียส
ตัวทำละลายตัวอย่าง	โทลูอีน
การตรวจวัด	462 นาโนเมตร
เวลาในการวิเคราะห์	30 นาที
Sensitivity	0.04 AUFS (absorption unit full scale)

3.2.3 การสกัดแยกบีตา-แคโรทีนจากน้ำมันปลาโดยใช้การดูดซับด้วยผงถ่านกัมมันต์ (11)

3.2.3.1 การบำบัดผงถ่านกัมมันต์

ซึ่งผงถ่านกัมมันต์ชนิดละเอียดปริมาณ 2.5 กรัม ใส่ลงในขวดลูกขมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย 0.5 % บิวทิลไฮดรอกซีโทลูอีนในเฮกเซน 40 มิลลิลิตร ซึ่งปรับสภาพความเป็นต่างของสารละลายดังกล่าวด้วยไตรเอทิลเอมีน (สังเกตกระดาษวัดพีเอชเปลี่ยนสีในช่วง pH 8 – 10) แช่ทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นล้างผงถ่านกัมมันต์ด้วยเฮกเซน กรองผ่านเครื่องกรองสุญญากาศจนกระทั่งสารละลายที่กรองผ่านเครื่องกรองใสไม่มีสี และผงถ่านกัมมันต์แห้ง

3.2.3.2 การดูดซับบีตา-แคโรทีน

ซึ่งน้ำมันปลาลบ 10.0 กรัม ใส่ลงในผงถ่านกัมมันต์ที่ผ่านการบำบัดแล้วตามข้อ 3.2.3.1 นำไปตั้งบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 80 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 120 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมเฮกเซน 80 มิลลิลิตร เพื่อล้างน้ำมันที่เกาะติดบนผง

ถ่านกัมมันต์ออกให้หมด กรองผ่านเครื่องกรองสุญญากาศจะได้สารละลายสีเหลืองของเฮกเซน และผงถ่านกัมมันต์ที่ผ่านการดูดซับสารแคโรทีนอยด์แล้ว

นำสารละลายสีเหลืองของเฮกเซนไประเหยเฮกเซนออก โดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความเร็วในการหมุน 100 รอบ/นาที จนกระทั่งเฮกเซนระเหยออกหมดจะได้น้ำมันปาล์มหลังการดูดซับ นำไปวิเคราะห์ปริมาณสารแคโรทีนอยด์ที่เหลืออยู่ในน้ำมันปาล์มหลังดูดซับ โดยละลายตัวอย่างด้วยโทลูอีนแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 462 นาโนเมตร

สำหรับผงถ่านกัมมันต์ที่ผ่านการดูดซับสารแคโรทีนอยด์แล้ว แขนในสารโทลูอีนที่มีการเติม 2 % tween 80 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมากรองผ่านเครื่องกรองสุญญากาศจะได้สารละลายสีส้มแดง แล้วจึงนำไประเหยโทลูอีนออกโดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ความเร็วในการหมุน 100 รอบ/นาที จนกระทั่งระเหยโทลูอีนออกหมด นำสารที่สกัดได้ดังกล่าวไปวิเคราะห์ปริมาณสารแคโรทีนอยด์ โดยละลายด้วยโทลูอีนแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 462 นาโนเมตร

3.2.3.3 วิเคราะห์ปริมาณบีตา-แคโรทีน และปริมาณโทลูอีนตกค้างในสารสกัดแคโรทีนอยด์ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้ภาวะในการวิเคราะห์ดังตารางที่ 3.3 และ 3.4 ตามลำดับ

ตารางที่ 3.4 ภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์โทลูอีน โดยเครื่อง HPLC (11)

ภาวะในการวิเคราะห์	
คอลัมน์	Shim-pack CLC-ODS, Steel 150x6.0 มิลลิเมตร
สารละลายตัวพา	80 % เมทานอล
อัตราการไหล	1.0 มิลลิลิตร/นาที
ความดัน	140 กิโลกรัม/ตารางเซนติเมตร
ปริมาณที่ใช้วิเคราะห์	10 ไมโครลิตร
อุณหภูมิ	25 องศาเซลเซียส
ตัวทำละลายตัวอย่าง	ไดคลอโรมีเทน
การตรวจวัด	254 นาโนเมตร
เวลาในการวิเคราะห์	15 นาที
Sensitivity	0.02 AUFS (absorption unit full scale)

3.2.4 การสกัดสารแคโรทีนอยด์ด้วยคาร์บอนไดออกไซด์เหนือจุดวิกฤติ

เตรียมผงถ่านกัมมันต์ที่ดูดซับสารแคโรทีนอยด์แล้ว ตามวิธีการข้อ 3.2.3.2 ปริมาณ 2.5 กรัม นำไปสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์เหนือจุดวิกฤติ เพื่อหลีกเลี่ยงขั้นตอนการชะด้วยโทลูอีน โดยแปรปัจจัยที่ใช้ในการสกัด ได้แก่

3.2.4.1 แปรอุณหภูมิ และความดัน ที่ใช้ในการสกัด ดังนี้

- 1) แปรอุณหภูมิที่ 30, 60, 80 และ 140 องศาเซลเซียส ความดัน 4,000 psi
- 2) แปรอุณหภูมิที่ 30, 60, 80 และ 140 องศาเซลเซียส ความดัน 5,000 psi
- 3) แปรอุณหภูมิที่ 30, 60, 80 และ 140 องศาเซลเซียส ความดัน 6,000 psi

3.2.4.2 แปรสารละลายที่ใช้ในการสกัด โดยการเติมสารละลายลงไปผงถ่านกัมมันต์ที่ผ่านการดูดซับสารแคโรทีนอยด์แล้ว จากนั้นนำไปสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์เหนือจุดวิกฤติ สารละลายที่ใช้ ได้แก่

- 1) เมทานอล ในอัตราส่วนผงถ่านกัมมันต์ที่ดูดซับสารแคโรทีนอยด์ 2.5 กรัม ต่อเมทานอล 2.5 มิลลิลิตร (w/v) ทำการสกัดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ความดัน 6,000 psi และที่ 80 องศาเซลเซียส ความดัน 6,000 psi

2) เอทานอล ในอัตราส่วนผงถ่านกัมมันต์ที่ดูดซับสารแคโรทีนอยด์ 2.5 กรัม ต่อเอทานอล 2.5 มิลลิลิตร (w/v) ทำการสกัดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ความดัน 6,000 psi และที่ 80 องศาเซลเซียส ความดัน 6,000 psi

3) ไคคลอโรมีเทน ในอัตราส่วนผงถ่านกัมมันต์ที่ดูดซับสารแคโรทีนอยด์ 2.5 กรัม ต่อไคคลอโรมีเทน 2.5 มิลลิลิตร (w/v) ทำการสกัดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ความดัน 6,000 psi และที่ 80 องศาเซลเซียส ความดัน 6,000 psi

3.2.4.3 แปรตัวทำละลายที่มีการเติมสารลดแรงตึงผิว โดยเติมตัวทำละลายที่มีการเติมสารลดแรงตึงผิวลงไปในผงถ่านกัมมันต์ที่ผ่านการดูดซับสารแคโรทีนอยด์แล้ว จากนั้นนำไปสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์เหนือจุดวิกฤติ ตัวทำละลายที่ใช้ ได้แก่

1) เอทานอลที่มีการเติม 2 % tween 80 ในอัตราส่วนผงถ่านกัมมันต์ที่ดูดซับสารแคโรทีนอยด์ 2.5 กรัม ต่อเอทานอลที่มีการเติม 2 % tween 80 0.5 มิลลิลิตร (w/v) ทำการสกัดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ความดัน 6,000 psi และที่ 80 องศาเซลเซียส ความดัน 6,000 psi

2) ไคคลอโรมีเทนที่มีการเติม 2 % tween 80 ในอัตราส่วนผงถ่านกัมมันต์ที่ดูดซับสารแคโรทีนอยด์ 2.5 กรัม ต่อสารละลายไคคลอโรมีเทนที่มีการเติม 2 % tween 80 0.5 มิลลิลิตร (w/v) ทำการสกัดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ความดัน 6,000 psi และที่ 80 องศาเซลเซียส ความดัน 6,000 psi

3) ตัวทำละลายผสมของเอทานอลและไคคลอโรมีเทนในอัตราส่วน 1 : 1 (โดยปริมาตร) แล้วมีการเติม 2 % tween 80 ในอัตราส่วนผงถ่านกัมมันต์ที่ดูดซับสารแคโรทีนอยด์ 2.5 กรัม ต่อสารละลายผสมดังกล่าว 0.5 มิลลิลิตร (w/v) ทำการสกัดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ความดัน 6,000 psi และที่ 80 องศาเซลเซียส ความดัน 6,000 psi

4) เอทานอลที่มีการเติม 2 % tween 80 ในอัตราส่วนผงถ่านกัมมันต์ที่ดูดซับสารแคโรทีนอยด์ 2.5 กรัม ต่อเอทานอลที่มีการเติม 2% tween 80 2.5 กรัม (w/w) ทำการสกัดที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ความดัน 6,000 psi

5) ไคคลอโรมีเทนที่มีการเติม 2 % tween 80 ในอัตราส่วนผงถ่านกัมมันต์ที่ดูดซับสารแคโรทีนอยด์ 2.5 กรัม ต่อไคคลอโรมีเทนที่มีการเติม 2 % tween 80 2.5 กรัม (w/w) ทำการสกัดที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ความดัน 6,000 psi

6) สารละลายผสมของเอทานอลและไดคลอโรมีเทนในอัตราส่วน 1 : 1 (โดยปริมาตร) แล้วมีการเติม 2 % tween 80 ในอัตราส่วนผงถ่านกัมมันต์ที่ดูดซับสารแคโรทีนอยด์ 2.5 กรัม ต่อสารละลายผสมดังกล่าว 2.5 กรัม (w/w) ทำการสกัดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ความดัน 6,000 psi

3.2.4.4 นำสารที่สกัดได้จากแต่ละภาวะไปวิเคราะห์หาปริมาณสารแคโรทีนอยด์ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 462 นาโนเมตร

3.2.5. การกำจัดน้ำมันในสารสกัดแคโรทีนอยด์ด้วยปฏิกิริยาซาฟอนิฟิเคชัน (61)

3.2.5.1 ซังสารสกัดที่ได้จากวิธีการตามข้อ 3.2.3.2 ปริมาณ 5.0 กรัม ใส่ขวดก้นกลมขนาด 100 มิลลิลิตร นำไปรีฟลักซ์ในสารละลายไปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ในเอทานอลความเข้มข้น 2 นอร์มอล ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3.2.5.2 นำสารละลายที่ผ่านการรีฟลักซ์แล้วไปล้าง และสกัดในขณะที่ยังร้อน โดยเติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเฮกเซนปริมาตร 50 มิลลิลิตร สกัดแยกชั้นน้ำและเฮกเซนออกจากกัน และนำชั้นน้ำไปทำการสกัดซ้ำด้วยเฮกเซนอย่างน้อย 3 ครั้ง

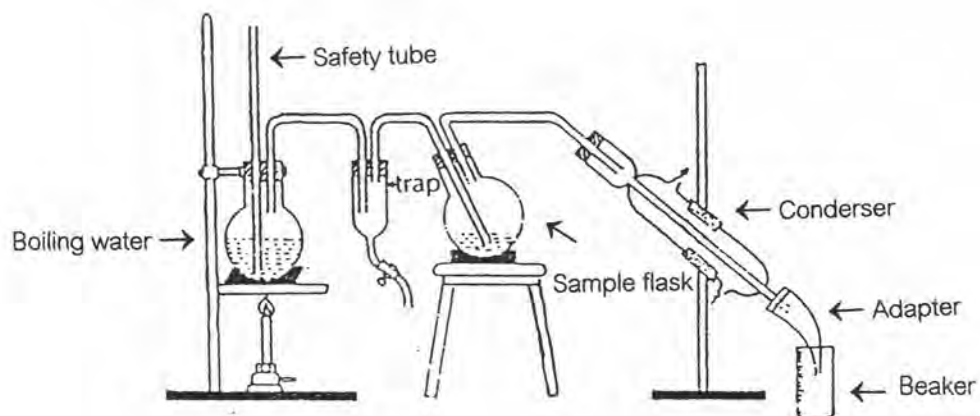
3.2.5.3 เก็บรวบรวมชั้นเฮกเซนที่สกัดได้ทั้งหมดไประเหยเฮกเซนออกโดยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความเร็วในการหมุน 100 รอบ/นาที จนกระทั่งเฮกเซนระเหยออกจนหมด จากนั้นนำตัวอย่างไปอบในตู้อบสุญญากาศที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.2.5.4 วิเคราะห์ปริมาณสารแคโรทีนอยด์ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 462 นาโนเมตร วิเคราะห์ปริมาณบีตา-แคโรทีน และปริมาณโทลูอินตกค้างด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้ภาวะในการวิเคราะห์ดังตารางที่ 3.3 และ 3.4 ตามลำดับ

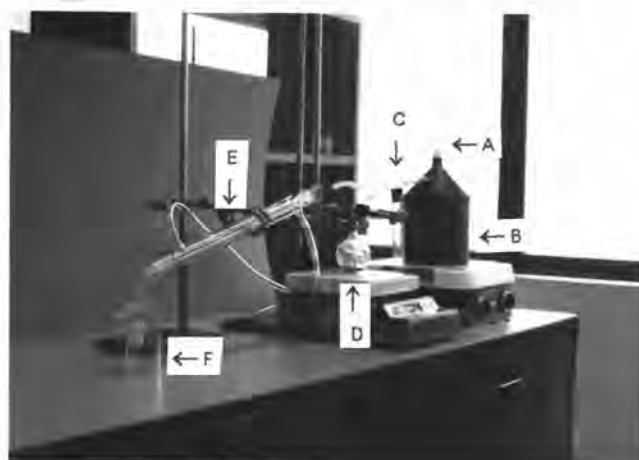
3.2.6. การกลั่นไอน้ำ (Steam distillation)

3.2.6.1 ซังสารสกัดที่ได้จากวิธีการตามข้อ 3.2.3.2 ปริมาณ 5.0 กรัม ลงในขวดก้นกลมขนาด 100 มิลลิลิตร นำไปกลั่นด้วยไอน้ำ โดยจัดชุดอุปกรณ์การกลั่นไอน้ำในลักษณะอย่างง่าย ดังรูปที่ 3.1

3.2.6.2 เก็บตัวอย่างสารสกัดแคโรทีนอยด์ที่ผ่านการกลั่นเป็นเวลานาน 30 นาที ไปวิเคราะห์หาปริมาณสารแคโรทีนอยด์ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 462 นาโนเมตร วิเคราะห์ปริมาณบีตา-แคโรทีน และโทลูอินตกค้าง ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้ภาวะในการวิเคราะห์ดังตารางที่ 3.3 และ 3.4 ตามลำดับ



ก. ลักษณะชุดอุปกรณ์การกลั่นไอน้ำอย่างง่าย (62)



สัญลักษณ์

- A = Safety tube
- B = หม้อน้ำ
- C = Trap
- D = ขวดบรรจุสารตัวอย่าง
- E = เครื่องควบแน่น
- F = ปีกเทอร์

ข. ภาพถ่ายชุดอุปกรณ์การกลั่นไอน้ำที่ใช้ในการทดลอง

รูปที่ 3.1 ชุดอุปกรณ์การกลั่นไอน้ำ

3.2.7. การกลั่นด้วยน้ำ (water distillation)

3.2.7.1 ชั่งสารสกัดที่ได้จากวิธีการตามข้อ 3.2.3.2 ปริมาณ 5.0 กรัม ลงในขวดก้นกลมขนาด 100 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่น โดยแปรปริมาตรน้ำ 2, 5, 10 และ 20 มิลลิลิตร นำไปกลั่นในอ่างน้ำร้อนที่ควบคุมอุณหภูมิประมาณ 125 องศาเซลเซียส และมีการกวนอย่างสม่ำเสมอตลอดเวลา

3.2.7.2 กลั่นจนกระทั่งสารตัวอย่างเดือด และสังเกตเห็นว่ามิของเหลวถูกกลั่นออกมาจึงเริ่มจับเวลาเก็บตัวอย่างสารสกัดแคโรทีนอยด์ที่เวลา 15, 30, 45 และ 60 นาที นำไปวิเคราะห์ปริมาณสารแคโรทีนอยด์ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 462 นาโนเมตร และวิเคราะห์ปริมาณโทลูอินตกค้างด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้ภาวะในการวิเคราะห์ดังตารางที่ 3.4

3.2.7.3 ประเมินปริมาตรน้ำที่เหมาะสมที่สามารถกำจัดโทลูอินตกค้างออกจากสารสกัดแคโรทีนอยด์ได้หมด และทำให้เกิดการสูญเสียสารแคโรทีนอยด์ระหว่างการกลั่นน้อยที่สุดเพื่อนำไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3.2.7.4 ศึกษาความเป็นไปได้ในการกำจัดโทลูอินออกจากสารสกัดแคโรทีนอยด์ในการทดลองระดับขยายส่วน โดยชั่งตัวอย่างสารสกัดแคโรทีนอยด์ที่ได้จากวิธีการตามข้อ 3.2.3.2 ปริมาณ 100.0 กรัม เติมน้ำในอัตราส่วนที่เหมาะสมตามที่ประเมินได้จากข้อ 3.2.7.3 แล้วนำไปกลั่นในอ่างน้ำร้อนที่ควบคุมอุณหภูมิประมาณ 125 องศาเซลเซียส และมีการกวนตลอดเวลา กลั่นจนกระทั่งสารตัวอย่างเดือด และสังเกตเห็นว่ามิของเหลวถูกกลั่นออกมา จึงเริ่มจับเวลาเก็บตัวอย่างสารสกัดแคโรทีนอยด์ที่เวลา 30 นาที 1, 3, 5 และ 7 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณสารแคโรทีนอยด์ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 462 นาโนเมตร วิเคราะห์ปริมาณบีตา-แคโรทีน และโทลูอินตกค้างด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้ภาวะในการวิเคราะห์ดังตารางที่ 3.3 และ 3.4 ตามลำดับ

3.2.8. การระเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน

3.2.8.1 ชั่งสารสกัดที่ได้จากวิธีการตามข้อ 3.2.3.2 ปริมาณ 5.0 กรัม ลงในขวดทรงรูปแพร์ขนาด 100 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร ทำการระเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ความเร็วในการหมุน 100 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที

3.2.8.2 นำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณสารแคโรทีนอยด์ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 462 นาโนเมตร และวิเคราะห์โทลูอินตกค้างด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้ภาวะในการวิเคราะห์ดังตารางที่ 3.4

3.2.8.3 ศึกษาความเป็นไปได้ในการกำจัดโทลูอินออกจากสารสกัดแคโรทีนอยด์ ในการทดลองระดับขยายส่วน โดยชั่งตัวอย่างสารสกัดแคโรทีนอยด์ที่ได้จากวิธีการข้อ 3.2.3.2 ปริมาณ 100.0 กรัม เติมน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร นำไประเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ความเร็วในการหมุน 100 รอบ/นาที กลั่นจนกระทั่งสารตัวอย่าง เดือดและสังเกตเห็นว่ามีของเหลวถูกกลั่นออกมา จึงเริ่มจับเวลาเก็บตัวอย่างสารสกัดแคโรทีนอยด์ ที่เวลา 15, 30 และ 60 นาที นำไปวิเคราะห์ปริมาณสารแคโรทีนอยด์ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 462 นาโนเมตร วิเคราะห์ปริมาณบีตา-แคโรทีน และโทลูอินตกค้างด้วย เครื่อง HPLC โดยใช้ภาวะในการวิเคราะห์ดังตารางที่ 3.3 และ 3.4 ตามลำดับ