



บทที่ 4

การทดลองเรื่องการสกัด

4.1 การสกัดเช่นโนโซด์จากใบมะขามแขกด้วยวิธีการย่อยสลาย (maceration)

ใบมะขามแขกแห้งบดละเอียดแล้ว 100 กรัม ทำให้ชุ่ม (moist) ด้วยตัวทำละลาย 50 มิลลิลิตร ในภาชนะปากกว้าง คนให้ทั่ว ทิ้งไว้ 15 นาที ใส่ในเครื่อง percolator แบบง่าย ก่อนใส่ใบมะขามแขก ใส่สำลีสรองไว้ชั้นหนึ่งก่อน ป้องกันผงมะขามแขกหลุดออกมาตามท่อหลอดแก้ว บรรจุ มะขามแขกลงในเครื่องให้สม่ำเสมอ วางแผ่นกระดาษกรองไว้ข้างบน ค่อย ๆ เทตัวทำละลายลงไป 250 มิลลิลิตร แผ่นกระดาษกรองจะช่วยให้ตัวทำละลายไหลซึมลงในชั้นสำลีสรองอย่างสม่ำเสมอ และไม่รบกวนชั้นสำลีสรองที่บรรจุ (pack) ไว้ ปิดปากเครื่องด้วยแผ่นกระจก วางทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง (9) เปิดวาล์วให้สารละลายสกัดไหลจากเครื่องด้วยอัตราเร็ว 4 มิลลิลิตร / นาที จนได้ปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร ใส่ขวดสีชาเก็บเอาไว้

4.1.1 ศึกษาผลการสกัดเมื่อใช้น้ำและเอทานอลเป็นตัวทำละลาย

ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดเช่นโนโซด์จากใบมะขามแขกมีหลายชนิด แต่ที่ให้ผลในการสกัดที่ดีและปลอดภัยในการใช้งาน ได้แก่ น้ำและเอทานอล ในการทดลองนี้จะใช้น้ำผสมกับสารเคมีป้องกันการเกิดเชื้อรา และใช้เอทานอลความเข้มข้นต่าง ๆ กันเป็นตัวทำละลาย ดังนี้

- น้ำอิมตัวด้วยคลอโรฟอร์ม (คลอโรฟอร์ม 5 ส่วนในน้ำ 1000 ส่วน โดยปริมาตร)
- น้ำอิมตัวด้วยอีเทอร์ (อีเทอร์ 10 ส่วนในน้ำ 100 ส่วน โดยปริมาตร)
- เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 15, 50, 70 และ 95 โดยน้ำหนัก

นำสารละลายสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายเหล่านี้ไปวิเคราะห์หาปริมาณ เช่นโนโซด์ ทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง

4.2 การสกัดเช่นโนโซด์จากใบมะขามแขก ด้วยวิธีการเขย่าในหลอดแก้ว (shaking in tube)

ใช้หลอดแก้วมีจุกปิดขนาด 30 มิลลิลิตร ใส่ใบมะขามแขกบด 50 มิลลิกรัม ใช้ตัวทำละลาย 20 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่า (vortex) นาน 15 นาที จากนั้นนำไปเหวี่ยงด้วยเครื่อง

เหวี่ยง (centrifuge) 20 นาที (18) แยกสารละลายสกัดที่ได้ออกจาก กากพืช

4.2.1 ศึกษาผลของการสกัดเมื่อใช้น้ำและเอทานอลเป็นตัวทำละลาย

ตัวทำละลายที่ใช้ในการทดลองนี้ ได้แก่

- น้ำอ้อมตัวด้วย คลอโรฟอร์ม
- น้ำอ้อมตัวด้วย อีเทอร์
- น้ำผสมโซเดียมเมตาไบซัลไฟด์ อัตราส่วนร้อยละ 0.2 โดยน้ำหนัก
- น้ำต้ม
- เอทานอล เข้มข้นร้อยละ 15, 30, 40, 50, 60, 70, 80 และ 95

โดยน้ำหนัก

ทำการทดลองด้วยวิธี 4.2 นำสารละลายสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายเหล่านี้ไปวิเคราะห์หาปริมาณเช่นไนโซด์ ทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง

4.3 การสกัดเช่นไนโซด์จากใบมะขามแขกด้วยวิธีการไหลซึมผ่านโดยใช้ความดันและระบบหมุนเวียน (Pressure Percolation with Circulating System)

เครื่องมือที่ใช้ในการสกัดแบบนี้คือ เครื่องสกัดแบบคอลัมน์และระบบหมุนเวียน (Column with circulating system) ประกอบด้วย คอลัมน์และเครื่องสูบ นำใบมะขามแขกบดมา 150 กรัม ทำให้อุ่น (moist) ด้วยตัวทำละลาย 100 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 15 นาที ใส่ในคอลัมน์ ซึ่งมีแผ่นสำลีวางบนตะแกรงป้องกัน ผงมะขามแขกตกลงไปปนกับสารละลาย บรรจุ (pack) มะขามแขกในคอลัมน์ให้ล้นมาเสมอ วางกระดาษกรองไว้ข้างบน ใส่ตัวทำละลายลงไป 1150 มิลลิลิตร ปิดฝาคอลัมน์ ต่อสายยางเข้ากับเครื่องสูบ peristaltic pump ใช้ความเร็ว 60 รอบ/นาที ด้วยแรงดันจากเครื่องสูบ ตัวทำละลายจะไหลผ่านชั้นมะขามแขก ได้สารละลายสกัดเก็บไว้ใน ส่วนล่างของคอลัมน์ และถูกสูบให้ไหลย้อนกลับไปสกัดมะขามแขกใหม่ทางส่วนบนของคอลัมน์ การทำงานจะหมุนเวียนเช่นนี้ไปเรื่อย ๆ จนกว่าจะถึง เวลาที่ต้องการจึงปิดเครื่องสูบเก็บสารละลายสกัดที่ได้ไว้ในขวดสีชา

4.3.1 ศึกษาผลของเวลาที่มีต่อการสกัดเมื่อใช้น้ำและเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 15 เป็นตัวทำละลาย

ทำการทดลองตามวิธี 4.3 โดยใช้น้ำและเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 15 โดยน้ำหนัก

เป็นตัวทำละลาย เก็บตัวอย่างจากเครื่องมาประมาณ 10 มิลลิเมตร ที่เวลา 2 ชั่วโมง, 4 ชั่วโมง และ 8 ชั่วโมง นำตัวอย่างสารละลายสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณเช่นไนโซต์ ทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง

4.4 การสกัดเช่นไนโซต์ จากใบมะขามแขก ด้วยวิธีการสกัดอย่างต่อเนื่องแบบสวนทางกัน (Continuous Countercurrent Extraction)

4.4.1 การทดลองหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัด

ทำการทดลองโดยใช้วิธีการสกัดของ Muller, Christ และ Kuhn (20) แต่เปลี่ยนระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดดังนี้ นำใบมะขามแขกแห้งบดละเอียดมาครั้งละ 1 กรัม ซึ่งอย่างละเอียดใส่ลงใน volumetric flask 100 มิลลิเมตร เติมน้ำเดือดลงไปประมาณ 90 มิลลิเมตร เขย่าแล้วจุ่มลงในอ่างน้ำร้อน 70°C. เขย่าบ่อยๆ ควบคุมเวลาที่จุ่ม flask ในอ่างน้ำร้อน โดยทำการทดลองนาน 2, 5, 8, 10, 13, 16 และ 20 นาที จากนั้นทำให้เย็นลงทันที หยดสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 N ลงไปประมาณ 5 หยด จนเปลี่ยนสี เติมน้ำลงไปจนปริมาตรครบ 100 มิลลิเมตร นำไปวิเคราะห์หาปริมาณเช่นไนโซต์ที่สกัดได้ของสารละลายทั้ง 7 ชุด และเลือกเวลาที่ให้ผลการสกัดสูงสุด

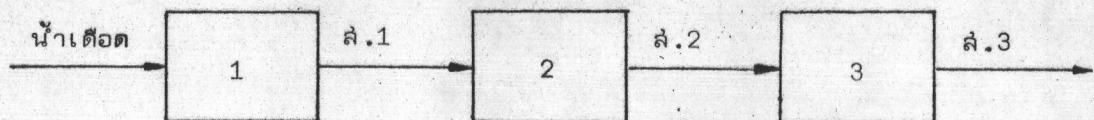
4.4.2 การทดลองหาปริมาณน้ำที่ถูกดูดซับโดยใบมะขามแขกบดละเอียด

ใส่ใบมะขามแขกบดละเอียด 10 กรัม ลงในปิกรอร์ขนาด 600 มิลลิลิตร เติมน้ำลงไป 100 มิลลิลิตร กวนให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน จุ่มลงในอ่างน้ำร้อน 70°C. นาน 10 นาที กวนตลอดเวลา ยกขึ้นกรองแยกสารละลายสกัดออกจากกากพืชด้วยผ้ากรอง บีบน้ำออกจากกากพืชทั้งหมด วัดปริมาตรสารละลายสกัดที่ได้ คำนวณหาปริมาตรของน้ำที่พืชดูดซับไว้ ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง หาค่าเฉลี่ย

4.4.3 การทดลองเพื่อคาดคะเนจำนวนขั้นตอนที่ใช้ในการทำงานและอัตราส่วนของน้ำ ต่อใบมะขามแขก

ก่อนที่จะทำการทดลองจริง เราจำเป็นต้องทำการทดลองขั้นต้นขนาดเล็กเพื่อ
คาดคะเนจำนวนขั้นตอนที่ใช้ในการทำงานและอัตราส่วนของพืชต่อตัวทำละลายก่อน โดยทำการ
สกัดด้วยวิธีของ Muller, Christ และ Kuhn และใช้ผลจากการทดลองที่ 4.4.1 และ 4.4.2
แยกการทดลองเป็น 2 ช่วง คือ

ช่วงที่ 1 อัตราส่วนของน้ำต่อใบมะขามแขก = 4 : 1 โดยน้ำหนัก ใช้ใบ
มะขามแขกบดละเอียด 150 กรัม แยกทำการสกัด 3 ครั้ง ครั้งละ 50 กรัม ใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย
600 มิลลิลิตร อุปกรณ์ที่ใช้ประกอบด้วย ปีกเกอร์ขนาด 1 ลิตร, อ่างน้ำร้อนที่มีเครื่องควบคุม
อุณหภูมิ และมอเตอร์พร้อมใบพัดสำหรับกวน ทำการทดลองดังนี้ (ดูรูป 4.1 ประกอบ)



รูปที่ 4.1 แสดงการสกัด 3 ขั้นตอน

ใส่ใบมะขามแขกบดละเอียด 50 กรัม ซึ่งผ่านการทำให้ชุ่ม (moist) ด้วยน้ำ 100 มิลลิเมตร แล้วลงในปีกเกอร์ใบที่ 1 (ปริมาตรของน้ำจำนวนนี้ได้จากผลการทดลองที่ 4.4.2) เติมน้ำเดือด 600 มิลลิเมตร ลงไป ลุ่มปีกเกอร์ลงในอ่างน้ำขึ้นซึ่งควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 70°C ใส่ใบพัดกวนลงในปีกเกอร์เปิดเครื่องให้ใบพัดกวนตลอดเวลา ปิดฝาปีกเกอร์ ทิ้งไว้ 10 นาที (เวลานี้ได้จากการทดลองที่ 4.4.1 ซึ่งให้ผลการสกัดสูงสุด) ยกขึ้นจากอ่างเติมนโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 N ลงไป ประมาณ 20 หยดจนเปลี่ยนสี มี pH เป็นด่าง กรองแยกสารละลายสกัดออกจากพืชในขณะที่ยังร้อนด้วยผ้ากรอง สารละลายสกัดที่ได้ (ส.1) จะเป็นตัวทำละลายในการสกัดใบมะขามแขกชุดที่ 2 อีก 50 กรัม ในปีกเกอร์ใบที่ 2 ด้วยวิธีการดังกล่าวข้างต้น แต่ไม่เติมนโซเดียมไฮดรอกไซด์ ซึ่งจะได้สารละลายสกัดชุดที่ 2 (ส.2) นำไปสกัดใบมะขามแขกชุดที่ 3 อีก 50 กรัม ด้วยวิธีการเช่นเดียวกับการสกัดครั้งที่ 2 สารละลายสกัดที่ได้ (ส.3) จะเป็นผลิตภัณฑ์ของการสกัด เก็บตัวอย่างสารละลายสกัดที่ได้แต่ละขั้นตอน (ส.1, ส.2 และ ส.3) นำไปวิเคราะห์หาปริมาณเช่นไนโซลด์ ทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง หาค่าเฉลี่ย

ช่วงที่ 2 อัตราส่วนของน้ำต่อใบมะขามแขก = 100:1 โดยน้ำหนัก

ทำการทดลองเช่นเดียวกับ ช่วงที่ 1 แต่ให้อัตราส่วนระหว่างน้ำกับใบมะขามแขก = 100:1 และทำการสกัดขั้นตอนเดียว ใช้น้ำ 500 มิลลิเมตร และใบมะขามแขก 5 กรัม เครื่องมือชุดเดียวกับ ช่วงที่ 1 ทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง หาค่าเฉลี่ย

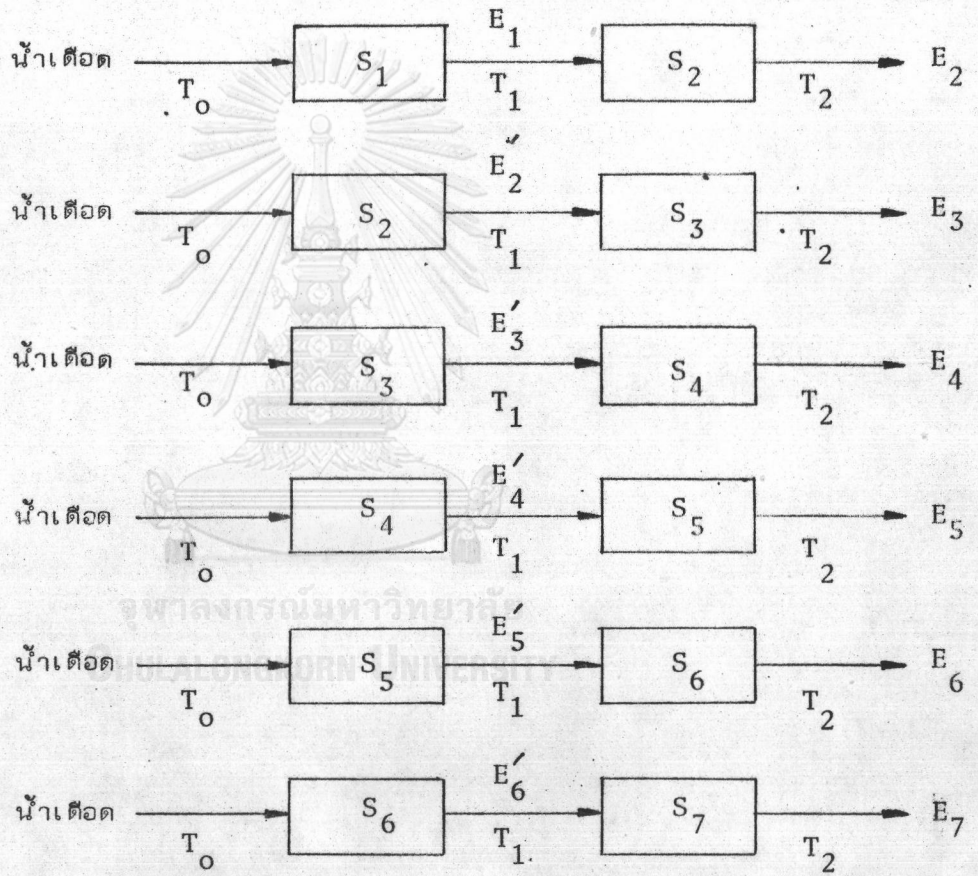
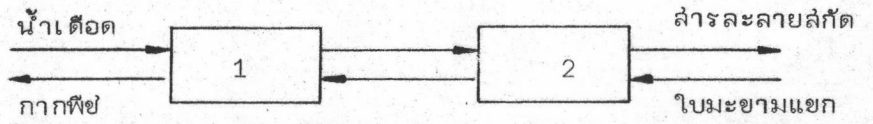
4.4.4 ศึกษาการสกัดเช่นไนโซลด์จากใบมะขามแขก เมื่อจำนวนขั้นตอน = 2

เครื่องมือที่ใช้ได้แก่ เครื่องสกัดแบบตั้งกวนในอ่างน้ำขึ้น ทำการสกัดด้วยวิธีของ Muller, Christ และ Kuhn (20) และใช้ผลจากการทดลองที่ 4.4.2 ในการคำนวณหาปริมาตรของน้ำที่ถูกดูดซับโดยใบมะขามแขก อัตราส่วนระหว่างน้ำต่อใบมะขามแขก = 100:1 โดยน้ำหนัก ในแต่ละถัง โดยใช้ใบมะขามแขกบดละเอียดชุดละ 100 กรัม น้ำ 10 ลิตร ความเร็วในการหมุนของใบพัด = 625 รอบต่อนาที

การสกัดในระบบของ เหลวและของแข็งแบบสลับกันอย่างต่อเนื่อง มักประสบปัญหาในการสูบของแข็งจากถังหนึ่งไปสู่อีกถังหนึ่ง เราสามารถแก้ปัญหานี้ได้ โดยการจำลองภาพการทดลอง เป็นแบบครั้งคราวไม่ต่อเนื่องที่หาต่อเนื่องกัน เสมือนหนึ่งเป็นการทำงานอย่างต่อเนื่อง (22)

โดยทำการทดลองดังนี้ (รูปที่ 4.2 ประกอบ)

เทน้ำเดือด 10 ลิตร ลงในถังกวนที่ใส่ใบมะขามแขกบดละเอียดชุดที่ 1 (S_1)
 ไว้ 100 กรัม ใบมะขามแขกที่ถูทำให้ชุ่ม (moist) แล้วด้วยน้ำ 200 มิลลิเมตร ควบคุมอุณหภูมิ
 ของน้ำในถังให้คงที่ที่ 70°C ปิดฝาถัง เปิดเครื่องให้ใบพัดหมุน นาน 10 นาที เปิดวาล์ว
 ที่อยู่ก้นถังให้ของผลัมของสารละลายและฟิซิลออกมา แยกสารละลายสกัดออกจาก S_1 ด้วย
 เครื่องบีบน้ำแบบเกลียว (screw press) เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 N ลงไปประมาณ 20
 หยด จนเปลี่ยนสี ได้สารละลายสกัดชุดที่ 1 (E_1) วัดอุณหภูมิ (T_1) และเก็บตัวอย่างไปหา
 ปริมาณเช่นโซลิต จากนั้นนำไปสกัดใบมะขามแขกชุดที่ 2 (S_2) ในถังกวนนาน 10 นาที แยก
 สารละลายสกัดชุดที่ 2 (E_2) จาก S_2 วัดอุณหภูมิ (T_2) และเก็บตัวอย่าง E_2 ไปหาปริมาณ
 เช่นโซลิต เป็นอันเสร็จสิ้นการทำงานในแถวที่ 1 เริ่มการทำงานในแถวที่ 2 โดยการสกัด S_2
 ด้วยน้ำเดือด 10 ลิตร ทำเช่นเดียวกับแถวแรก เรื่อย ๆ ไป จนถึงแถวที่ 6 เก็บตัวอย่าง E_3 ,
 E_4 , E_5 , E_5' , E_6 , E_6' และ E_7 ไปวิเคราะห์หาปริมาณเช่นโซลิต ทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง
 หาค่าเฉลี่ย เก็บตัวอย่างครั้งละ 10 มิลลิตร (นำไปวิเคราะห์ในขั้นตอนไฮโครโลซิล)



รูปที่ 4.2 แผนภาพแสดงการทำงานของเครื่องสกัดอย่างต่อเนื่องแบบ
ส่วนทางกัน 2 ขั้นตอน

4.5 การวิเคราะห์หาปริมาณเช่นโนไซด์

ทำการวิเคราะห์ตามวิธีของ Muller, Christ และ Kuhn (20) การวิเคราะห์หาปริมาณเช่นโนไซด์ในใบมะขามแขกบด ไข่ตัวอย่างหนัก 1 กรัม ซึ่งอย่างละเอียด ส่วนการวิเคราะห์หาปริมาณเช่นโนไซด์ในสารละลายสกัด ไข่ตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำ ครบ 100 มิลลิลิตร นำไปทำไฮโดรไลซิส ทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง ขั้นตอนการวิเคราะห์มีดังนี้

การสกัด

ใส่ผงมะขามแขกบดละเอียดลงใน Volumetric flask 100 มิลลิลิตร เติมน้ำเดือด 90 มิลลิเมตร ลงไป ลูบ flask ในอ่างน้ำร้อน 70° ซ. เขย่าตลอดเวลานาน 10 นาที ทำให้เย็นลงทันที เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 N ลงไปประมาณ 5 หยด จนเปลี่ยนสี เติมน้ำลงไปจนครบปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน

การไฮโดรไลซิส (hydrolysis)

ทำการเปิดสารละลายที่สกัดได้มา 10 มิลลิลิตร ใส่ในปิเปตเตอร์ 10 มิลลิลิตร เติมกรดเกลือเข้มข้น (ร้อยละ 36) ลงไป 5 มิลลิลิตร ทำการไฮโดรไลซิสโดยวางปิเปตเตอร์ในอ่างน้ำร้อน 70° ซ นาน 25 นาที ของเหลวที่ผ่านการไฮโดรไลซ์ (hydrolyze) แล้ว จะถูกทำให้เย็น หยดโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้นร้อยละ 30 ลงไปที่ละหยด เขย่า จนเปลี่ยนสี ทำให้เย็น ทำให้เป็นกรดโดยการเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 50 ลงไปประมาณ 5 หยด นำไปแยกชั้นด้วยอีเทอร์ 50 มิลลิลิตร ใน separating funnel ใบที่ 1 เขย่าแยกชั้นอีเทอร์ เก็บไว้ใน separating funnel ใบที่ 2 ทำการสกัดซ้ำด้วยอีเทอร์อีกครั้งละ 30 มิลลิลิตร ใน separating funnel ใบแรก และเก็บชั้นอีเทอร์ที่สกัดแล้วไว้ใน separating funnel ใบที่ 2 สกัดจนกระทั่งชั้นของอีเทอร์ใน funnel ใบแรกไม่มี

NaHCO₃ Cleaning

เติมโซเดียมโบคาร์บอเนตอิ่มตัว 30 มิลลิลิตร ลงใน separating funnel ใบที่ 2 ซึ่งบรรจุอีเทอร์ที่สกัดแล้วไว้ เขย่า แยกเอาชั้นน้ำสีแดงใส่ใน separating funnel ใบที่ 3 ซึ่งใส่อีเทอร์ 30 มิลลิลิตร และกรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 50 10 มิลลิลิตร เอาไว้ ทำการสกัด

อีเทอร์ใน funnel ใบที่ 2 ซ้ำ ด้วยโซเดียมไบคาร์บอเนตอิ่มตัวครั้งละ 15 มิลลิลิตร จนกระทั่ง
ชั้นน้ำที่ใสไม่มีสี นำ funnel ใบที่ 3 มาแยกเอาชั้นอีเทอร์ออกจากชั้นน้ำที่เป็นกรด เก็บไว้ใน
flask ทำการสกัดชั้นน้ำใน funnel ใบที่ 3 ซ้ำ ด้วยอีเทอร์ครั้งละ 20 มิลลิลิตร จนกระทั่ง
ชั้นของอีเทอร์ไม่มีสี นำอีเทอร์ใน flask ทั้งหมดมากรองด้วยสำลีใส่ลงใน volumetric
flask ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำอีเทอร์ลงไปจนปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร

Oxidation

ทำการปิเปต อีเทอร์จาก volumetric flask มา 10 มิลลิลิตร ใส่ใน separating
funnel ใบที่ 4 เติมน้ำโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 N 10 มิลลิลิตร เขย่า แยกชั้นต่างออกมาผสม
กับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เข้มข้นร้อยละ 3 ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง
จุ่มหลอดลงในน้ำที่กำส้งเพื่อตายนาน 4 นาที จะได้สารละลายสีแดงนำมาทำให้เป็น

Photometric

นำสารละลายสีแดงมาวัดค่าความสามารถในการดูดกลืนแสง (absorbance) (E)
ที่ความยาวคลื่น (λ) = 510 และ 800 นาโนเมตร (มีค่า $d=1$ เซนติเมตร) โดยใช้น้ำเป็น
ตัวเปรียบเทียบ

นำค่าที่ได้ของ E_{510} - E_{800} ไปหาปริมาณเซโนโซลิต จากกราฟมาตรฐาน
(standard curve) ที่สร้างขึ้นจากเซโนโซลิต เอ มาตรฐาน (ดูภาคผนวก ก.) ค่าที่ได้เป็น
อัตราส่วนร้อยละโดยน้ำหนัก สำหรับตัวอย่างใบมะขามแขกบดใช้ 1 กรัม คำนวณปริมาณเซโน-
โซลิต เป็นอัตราส่วนร้อยละ โดยน้ำหนัก เช่น ใบมะขามแขกนี้มีปริมาณเซโนโซลิตอยู่ร้อยละ 2.88
เป็นต้น ตัวอย่างที่เป็นสารละลายสกัด นำมา 10 มิลลิลิตร คำนวณปริมาณเซโนโซลิตเป็นอัตราส่วน
ร้อยละโดยน้ำหนัก เทียบเป็นน้ำหนักมะขามแขกแห้ง เช่น สารละลายสกัด 10 มิลลิลิตร มีปริมาณ
เซโนโซลิต ร้อยละ 2.0 เป็นต้น หรืออ่านค่าออกมาเป็น มิลลิกรัม/10 มิลลิลิตร เช่น สารละลาย
สกัดนี้มีปริมาณเซโนโซลิต 20 มิลลิกรัมในสารละลายตั้งต้น 10 มิลลิลิตร