

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์เครื่องมือทดลอง3.1.1 อุปกรณ์สำหรับการทดลองการสกัดแบบแช่ครั้งเดียวไม่มีการกวนผสม

การทดลองสกัดแบบแช่ครั้งเดียวไม่มีการกวน เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัด โดยใช้เครื่องมือที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการเคมีทั่ว ๆ ไปดังมีรายละเอียดดังต่อไปนี้คือ ใช้ขวดแก้ว (Erlenmeyer) ขนาด 250 มิลลิลิตร เป็นภาชนะใส่เปลือกเงาะที่ชั่งน้ำหนัก และ เติมน้ำละลาย ดังจะ ได้กล่าวในรายละเอียดต่อไป วางขวดแก้วลงในเครื่องอังไอน้ำ (water bath) ที่ สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ ดังแสดงในภาพที่ 3.1 โดยแช่ตามเวลาที่กำหนดแล้วนำไป วิเคราะห์หาปริมาณแทนนิน ในสารละลายที่สกัดได้

3.1.2 อุปกรณ์สำหรับหาค่าสัมประสิทธิ์ของการแพร่

การสกัดเพื่อหาค่าสัมประสิทธิ์ของการแพร่ โดยใช้ภาชนะเช่นเดียวกับการสกัดแบบแช่ครั้งเดียวดังกล่าวข้างต้น การทดลองสกัดที่อุณหภูมิสูง โดยใช้เตาให้ความร้อน (hot plate) ที่มีแท่งแม่เหล็กกวน และควบคุมความร้อนได้ ดังแสดงในภาพที่ 3.2

3.1.3 อุปกรณ์เครื่องมือสำหรับการทดลองสกัดแบบกึ่งต่อเนื่องส่วนทางกัน

ประกอบด้วยชุดถังสกัดสเตนเลสทรงกระบอกจำนวน 6 ใบ ขนาดความจุประมาณ 3 ลิตร เส้นผ่านศูนย์กลางของถัง 15 เซนติเมตร ความสูงของถัง 25 เซนติเมตร ด้านบนมีฝาปิด ภายในถังประกอบด้วยกระบอกสเตนเลสเส้นผ่านศูนย์กลาง 13 เซนติเมตร ความสูง 15 เซนติเมตร ด้านล่างเชื่อมปิดด้วยแผ่นสเตนเลส และด้านข้างเจาะ รูขนาด 5 มิลลิเมตรรอบถัง ถังทั้งหมด โดยอุปกรณ์ทั้งหมดวางอยู่ในเครื่องอังไอน้ำที่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ระหว่าง 30 ถึง 100 °เซลเซียส ดังแสดงในภาพที่ 3.3



ภาพที่ 3.1 แสดงอุปกรณ์เครื่องมือการสกัดแบบแช่ครั้งเดียวไม่มีการกวน



ภาพที่ 3.2 แสดงอุปกรณ์เครื่องมือการสกัดแบบที่มีการกวนผสม





ภาพที่ 3.3 แสดงอุปกรณ์เครื่องมือการสกัดแบบกึ่งอัตโนมัติของสวนทางกัน

3.2 ขั้นตอนและวิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 การเตรียมเปลือกเงาะ

เปลือกเงาะที่ศึกษาเป็นเปลือกเงาะโรงเรียน Nephelium lappaceum Linn ที่เก็บมาจากโรงงานผลิตผลไม้กระป๋อง Food and Drink LTD. โรงงานอาหารสยาม จังหวัดชลบุรี โรงงานมาลี จังหวัดนครปฐม และ ส่วนผลไม้จังหวัดจันทบุรี โดยนำเปลือกเงาะทั้งหมดมาตากแห้งและผสมเป็นตัวอย่างเดียวกัน จากนั้นเป็นการเตรียมขนาดเปลือกเงาะให้เหมาะสมกับการทดลอง โดยใช้เครื่องบดของบริษัท Wiley ซึ่งใช้หลักการเพื่อยังแกนเหล็กที่เป็นใบมีดไปตัดเปลือกเงาะให้มีขนาดเล็กลง จากนั้นเปลือกเงาะที่บดแล้วจะนำไปผ่านตะแกรง (sieve) ขนาดช่องตะแกรง 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 และ 2.8 มิลลิเมตรตามลำดับ เพื่อให้ได้ขนาดของเปลือกเงาะ 4 ช่วงขนาด คือ เล็กกว่า 0.1, 0.5 - 1.0, 1.0 - 2.0, และ 2.0 - 2.8 มิลลิเมตร จากนั้นเก็บรักษาเปลือกเงาะโดยการแช่แข็งที่อุณหภูมิ 0° เซลเซียสเพื่อควบคุมเปลือกเงาะให้มีคุณสมบัติคงที่สำหรับการสกัดทุกครั้ง และก่อนสกัดให้ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 2 ชั่วโมง ปริมาณเปลือกเงาะนั้นมีมากเพียงพอต่อการทดลอง เพื่อให้มั่นใจว่าลักษณะสมบัติเปลือกเงาะที่ใช้ในการทดลองไม่แปรเปลี่ยนตลอดการทดลอง

เปลือกเงาะที่ผ่านการคัดเลือกขนาดแล้ว จะนำไปหาปริมาณแทนนินทั้งหมดที่มีอยู่

ในเปลือกเงาะโดยเครื่องมือสกัด soxhlet apparatus ซึ่งประกอบด้วยขวดกันกลม ขนาด 500 ลูกบาศก์เซนติเมตรที่บรรจุตัวทำละลาย 50 % เอทานอล เพื่อสกัดแทนนิน ให้ความร้อนโดยเตาที่ควบคุมอุณหภูมิได้ (heating mantle) ท่อเปลือกเงาะโดยบรรจุอยู่ใน soxhlet apparatus ซึ่งต่อกับขวดกันกลม และนำเครื่องควบแน่น (condenser) มาต่อกับส่วนบนสุดของ soxhlet เพื่อทำให้ตัวทำละลายที่ระเหยกลับตัวโดยความเย็นที่ condenser เป็นของเหลวกลับสู่ขวดกันกลม ในการสกัดนี้ใช้เวลาประมาณ 12 ชั่วโมง หลังการกลั่นนำขวดกันกลมที่มีผลิตภัณฑ์แทนนินที่ถูกสกัดได้ ไปวิเคราะห์หาปริมาณแทนนินโดยใช้เครื่องมือ spectrophotometer ของบริษัท LKB BIOCHROM MODEL 4050 Cambridge ประเทศอังกฤษ ค่าที่วิเคราะห์ได้จะบ่งบอกปริมาณแทนนินทั้งหมดที่อยู่ในเปลือกเงาะ ส่วนรายละเอียดการวิเคราะห์แทนนินจะกล่าวในรายละเอียดในหัวข้อ 3.3

3.2.2 การสกัดแบบแช่ครั้งเดียวไม่มีการกวนผสม (Batch Extraction)

การสกัดแบบแช่ครั้งเดียวไม่มีการกวนผสม คือแช่สกัดเพียงครั้งเดียว และไม่มีการกวนผสม การทดลองนี้มีตัวแปร คือ ชนิดของตัวทำละลาย ขนาดของเปลือกเงาะ อัตราส่วนเปลือกเงาะต่อตัวทำละลาย และ อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด ตารางที่ 3.1 แสดงตัวแปรต่าง ๆ ในการทดลองนี้

ตารางที่ 3.1 ตัวแปรที่ศึกษาของการสกัดแบบแช่ครั้งเดียวไม่มีการกวนผสม

ขนาดของเปลือกเงาะ (มิลลิเมตร)	0.5 - 1, 1 - 2, 2 - 2.8
อัตราส่วน (เปลือกเงาะต่อตัวทำละลาย)	1:5, 1:8, 1:10, 1:20
อุณหภูมิของตัวทำละลาย (°เซลเซียส)	30, 50, 70, 90
ตัวทำละลาย	น้ำ และ สารละลายเอทานอล (10%, 50%, 80%)

โดยในการทดลองนี้แบ่งเป็นการทดลองหลัก 2 การทดลองคือ

- การใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย โดยแต่ละการทดลองย่อยได้ใช้ขวดแก้วสกัด 6 ขวดแต่ละขวดเติมเปลือกเงาะหนัก 5 กรัม ซึ่งมีขนาดช่วงหนึ่งแล้วเติมน้ำให้ได้อัตราส่วนที่กำหนด แล้วควบคุมอุณหภูมิการสกัดตามกำหนด จากนั้นเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ปริมาณแทนนินที่เวลาต่าง ๆ คือ 1, 2, 3, 6, 9 และ 24 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนตัวแปรอื่น ๆ จนครบตามตารางที่ 3.1

- การใช้เอธานอลเป็นตัวทำละลาย ทำการทดลองเช่นเดียวกับตัวทำละลายน้ำ โดยอาศัย ข้อมูลตัวแปรที่เหมาะสมจากการศึกษาการสกัดโดยใช้ น้ำ เช่นอัตราส่วนเปลือกเงาะ ต่อตัวทำละลายที่เหมาะสม โดยการทดลองเน้นการหาความเข้มข้นของเอธานอลที่เหมาะสม และ อุณหภูมิของการสกัดที่เหมาะสมด้วย

จากข้อมูลปริมาณแทนนินที่สกัดได้ของแต่ละเวลาสกัด จะนำมาสร้างกราฟของ ประสิทธิภาพของการสกัด (% tannin extraction) กับ เวลา เพื่อศึกษาเวลาและความเข้มข้นของสารสกัดแทนนินที่สภาวะคงตัว (steady time) เพื่อจะนำค่าความเข้มข้นของสารสกัดแทนนินที่สภาวะคงตัวมาเปรียบเทียบผลของตัวแปรต่าง ๆ ที่มีต่อประสิทธิภาพของการสกัด

3.2.3 การทดลองหาค่าสัมประสิทธิ์ของการแพร่

การทดลองเพื่อหาค่าสัมประสิทธิ์ของการแพร่ หรือ สัมประสิทธิ์ของการถ่ายโอนมวล ($k'A/b$) กระทำได้โดยใช้การสกัดแบบมีการกวน โดยศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อประสิทธิภาพการสกัด และ หาค่าความสัมพันธ์ของค่า ($k'A/b$) กับอุณหภูมิในรูปของสมการเส้นตรง สภาวะการทดลองได้แสดงในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 สภาวะการทดลองเพื่อหาค่า ($k'A/b$)

ขนาดของเปลือกเงาะ (มิลลิเมตร)	1 - 2
อัตราส่วนเปลือกเงาะต่อตัวทำละลาย	1 : 10
อุณหภูมิของตัวทำละลาย (องศาเซลเซียส)	30, 40, 50, 60, 70
เวลาที่ใช้ในการสกัด (นาที)	1, 3, 5, 7, 9
สารสกัด	50 % สารละลายเอธานอล

การทดลองเริ่มโดยการชั่งเปลือกเงาะหนัก 5 กรัม ใส่ลงในขวดแก้วจำนวน 5 ใบ แล้วเติมตัวทำละลาย 50% เอธานอล ลงในขวดสกัดจำนวน 50 มิลลิลิตร วางขวดลงบนอ่างแก้วที่มีน้ำซึ่งควบคุมอุณหภูมิได้ โดยเตาให้ความร้อนที่มีแท่งแม่เหล็กกวน และ อุปกรณ์ควบคุมอุณหภูมิ ควบคุมความเร็วของการกวนที่ 500 รอบ/นาที เก็บสารสกัดแทนนินที่เวลาต่าง ๆ คือ 1, 3, 5, 7 และ 9 นาที วิเคราะห์หาปริมาณแทนนินที่สกัดที่อุณหภูมิ 30° เซลเซียส จากนั้นทำการทดลองที่อุณหภูมิต่าง ๆ 40, 50, 60 และ 70° เซลเซียส การสกัดของแต่ละอุณหภูมิถูกนำไปสร้างความสัมพันธ์ระหว่าง ค่า $\ln[(C_{\infty}/C_{\infty} - C)]$ กับเวลาที่ใช้ในการสกัดจากกราฟจะได้ค่า $k'A/b$ ซึ่งก็คือค่าสัมประสิทธิ์ของการแพร่

3.2.4 ศึกษาการสกัดแบบกึ่งต่อเนื่องสวนทางกัน (Semi - Continuous Counter Current)

การศึกษาทดลองนี้เพื่อหาจำนวนขั้นตอนและประสิทธิภาพในการสกัด โดยมีสภาวะการทดลองดังสรุปในตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 แสดงสภาวะการทดลอง เพื่อศึกษาการสกัดแบบกึ่งต่อเนื่องสวนทางกัน

ขนาดของอนุภาคเปลือกเงาะ	1 - 2 มิลลิเมตร
อัตราส่วนเปลือกเงาะต่อตัวทำละลาย	1:20
อุณหภูมิของตัวทำละลาย	30, 70 องศาเซลเซียส
ชนิดของตัวทำละลาย	น้ำ, 50% เอทานอล, 1%, 3% Na_2SO_3
เวลาที่ใช้ในการสกัดครั้งละ	1/2 ชั่วโมง

วางถังสกัดจำนวน 6 ใบลงในเครื่องอังไอน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิสกัดได้แล้วโดยการทดลองแรกเป็นที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บรรจุตัวทำละลาย (น้ำ) ลงในถังสกัดทั้ง 6 ใบ ละ 500 มิลลิลิตร ซึ่งเปลือกเงาะ 25 กรัม ลงในถุงผ้าจำนวน 15 ใบ นำถุงผ้าใบที่ 1 ใส่ลงในถังใบที่ 1 แล้วยกขึ้นครึ่งชั่วโมงเมื่อครบเวลายกถุงผ้าขึ้น รอให้น้ำหยดไหลนำถุงผ้าใบที่ 2 ใส่ลงในถังใบที่ 1 พร้อมทั้งย้ายถุงใบที่ 1 ใส่ลงในถังใบที่ 2 ทำการสกัดลักษณะนี้จนกระทั่งถุงผ้าถูกสกัดครบ 6 ใบ เก็บสารละลายตัวอย่างใน ถังใบที่ 1 ซึ่งเป็นถังที่เข้มข้นที่สุดวิเคราะห์หาปริมาณแทนนิน เกลือละลายในถังใบที่ 1 ใส่ถัง สำหรับเก็บสารละลายแทนนิน พร้อมทั้งย้ายถึงใบที่ 2 มาอยู่ที่ตำแหน่งของใบที่ 1, ย้ายถึงใบที่ 3 มาที่ตำแหน่งใบที่ 2, ย้ายถึงใบที่ 4 มาที่ตำแหน่งใบที่ 3, ย้ายถึงใบที่ 5 มาที่ตำแหน่งใบที่ 4, ย้ายถึงใบที่ 6 มาตำแหน่งใบที่ 5 และตำแหน่งของใบที่ 6 ซึ่งว่างลง นำถังที่ใส่สารสกัดใหม่ (fresh solvent) มาวางไว้แทน จากนั้นเริ่มใส่ถุงผ้าใหม่ลงในถังใบที่ 1 ย้ายถุงผ้าเดิมจากถังใบที่ 1 มายังถึงใบที่ 2, ย้ายถุงผ้าใบที่ 2 มายังถึงใบที่ 3, ย้ายถุงผ้าใบที่ 3 มายังถึงใบที่ 4, ย้าย ถุงผ้าใบที่ 4 มายังถึงใบที่ 5 และย้ายถุงผ้าใบที่ 5 มายังถึงใบที่ 6 ซึ่งลักษณะการสกัดแบบนี้เป็นแบบกึ่งต่อเนื่องสวนทางกัน โดยกำหนดให้เวลาสกัดแต่ละครั้งเท่ากับครึ่งชั่วโมง แล้วเก็บสารละลายตัวอย่างจากถังใบที่ 1 ใหม่ ซึ่งได้ผ่านการสกัดมาแล้ว 6 ครั้ง จึงเป็นถังที่ความเข้มข้นแทนนินสูงสุด ทำการสกัดในลักษณะนี้ จนกระทั่งวิเคราะห์ได้ว่าปริมาณแทนนินในถังใบที่ 1 คงที่ แล้วทำการวิเคราะห์ปริมาณแทนนินในถังที่เหลือทั้ง 5 ใบ จะสามารถสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง ปริมาณ

แทนนินในสารละลาย (overflow) กับปริมาณแทนนินที่เหลืออยู่ในเปลือกเงาะ (solid phase) หรือเรียกว่าเส้น operating line ได้

การตรวจสอบความถูกต้อง ในการวิเคราะห์ปริมาณแทนนิน โดยใช้วิธีสมดุลมวลสาร (material balance) คือ ปริมาณแทนนินทั้งหมดที่มีอยู่ในเปลือกเงาะ เท่ากับปริมาณแทนนินในสารละลาย (overflow) รวมกับปริมาณแทนนินในกากเงาะ (solid phase) เมื่อทำสมดุลมวลสารแล้ว ค่าที่ได้ควรจะเท่ากันหรือใกล้เคียงกันตามกฎอนุรักษ์มวลสาร (law of conservation of mass) ซึ่งใช้เป็นหลักอ้างอิงในการคำนวณ (กัญญา, 2531) จากนั้นได้ทำการทดลองเหมือนที่กล่าวมาแล้วแต่เปลี่ยนเป็นอุณหภูมิ 70°เซลเซียส และทำการทดลอง โดยใช้ตัวทำละลายต่าง ๆ ดังกล่าวในตารางที่ 3.3

3.2.5 ศึกษาความเข้มข้นของสารสกัดแทนนินที่สภาวะสมดุล

การศึกษานี้เพื่อหากราฟสมดุลการละลาย (solubility curve) โดยสภาวะการทดลองได้สรุปในตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.4 แสดงสภาวะการทดลองเพื่อหากราฟสมดุลการละลาย

ขนาดของเปลือกเงาะ (มิลลิเมตร)	< 0.1
ชนิดของตัวทำละลาย	น้ำ, 50% เอทานอล 1% & 3% Na_2SO_3
อุณหภูมิ (°เซลเซียส)	30 และ 70
อัตราส่วนเปลือกเงาะต่อตัวทำละลาย	1:5, 1:10, 1:15, 1:20 1:40, 1:60 และ 1:80

ในการทดลองนี้ โดยเลือกเปลือกเงาะที่มีขนาดเล็กมาก ๆ ซึ่งมีขนาดเล็กกว่า 0.355 มิลลิเมตร และใช้วิธีการกวนเพื่อให้แทนนินแพร่ออกมาสู่ตัวทำละลายได้ทั้งหมด โดยใช้เวลาการสกัดต่าง ๆ คือ 12, 24, 30, 54 และ 72 ชั่วโมง เพื่อดูระบบสกัดเข้าสู่สภาวะสมดุลที่เวลาใด ถ้าความเข้มข้นมีแนวโน้มเข้าสู่สภาวะสมดุลจะเก็บสารสกัดทุก ๆ 2 ชั่วโมง และหาค่าเฉลี่ยความเข้มข้นที่สภาวะสมดุลเพื่อใช้เปรียบเทียบกับ operating line ที่ได้ทำการทดลองแล้วตามข้อ 3.2.4 ซึ่งจะสามารถใช้เส้นกราฟทั้งสองเส้นคำนวณหาจำนวนขั้นตอนของการสกัด และประสิทธิภาพของการสกัดที่สภาวะต่าง ๆ ได้

3.3 วิธีการวิเคราะห์

3.3.1 วิเคราะห์ปริมาณแทนนิน ในผลิตภัณฑ์แทนนิน

ผลิตภัณฑ์แทนนินที่สกัดได้จะประกอบด้วยแทนนินหลายชนิดรวมกันอยู่ยากที่จะสกัดออกมาหรือทำให้บริสุทธิ์ จึงต้องใช้ปฏิกิริยาทางเคมีในการวิเคราะห์ปริมาณแทนนิน ปฏิกิริยาจะเกิดที่กลุ่มไฮดรอกซิลของกรดฟีนอลลิก รวมตัวเป็นสารประกอบเชิงซ้อน ดังนั้นการหาปริมาณแทนนินจึงต้องใช้สารที่เป็นมาตรฐานในการเปรียบเทียบ ได้แก่กรดแทนนิก (tannic acid) เพราะเป็นสารที่มีมวลโมเลกุลต่ำ โครงสร้างของโมเลกุลประกอบด้วยกรดฟีนอลลิกรวมตัวเป็นสารประกอบเชิงซ้อนเท่านั้น จึงเหมาะสมที่จะเป็นสารมาตรฐานในการวิเคราะห์หาปริมาณแทนนิน ในผลิตภัณฑ์แทนนินต่าง ๆ วิธีวิเคราะห์ในงานวิจัยนี้คือ วิธี Colorimetric method

Colorimetric method (AOAC, 1990) เป็นวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณแทนนิน โดยเติมสารที่ทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนและเกิดสี แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์มีดังนี้

- กรดแทนนิก (Lab grade ของบริษัท Merck)
- โซเดียมทังสเตท (Lab grade ของบริษัท Merck)
- กรดฟอสโฟโมลิบดิก (Analytical grade ของบริษัท Merck)
- กรดฟอสฟอริก (Analytical grade ของบริษัท Carlo ERBA)
- โซเดียมคาร์บอเนต (Analytical grade ของบริษัท Merck)
- โซเดียมซัลไฟด์ (Lab grade ของบริษัท BDH)

ในการวิเคราะห์นี้มีการเตรียมสารวิเคราะห์ (Reagents) ดังต่อไปนี้

- สารละลายฟีนอล (Phenol reagent or Folin Denis reagent) เตรียมโดยชั่งสารโซเดียมทังสเตท 100 กรัม ผสมกับกรดฟอสโฟโมลิบดิก 20 กรัม และกรดฟอสฟอริกเข้มข้น 50 มิลลิลิตร น้ำ 750 มิลลิลิตร Reflux 2 ชั่วโมงแล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

- สารละลายอิมตัวโซเดียมคาร์บอเนต ประกอบด้วยโซเดียมคาร์บอเนตชนิด anhydrous 35 กรัม น้ำ 100 มิลลิลิตร ละลายที่อุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียส ปล่อยให้เย็นทิ้งไว้ตลอดคืน จากนั้นนำมาใส่ผลึกโซเดียมคาร์บอเนตลงไป ถ้าตกผลึกให้กรองผ่านใยแก้ว

- สารละลายกรดแทนนิก เตรียมโดยละลายกรดแทนนิก 100 มิลลิกรัมในน้ำ 1 ลิตร หรือ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งเมื่อต้องการทดลอง

(1.) เตรียม standard curve

ไปเปิดสารละลายกรดแทนนิกมาตรฐาน 2, 4, 6, 8 และ 10 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร มีน้ำอยู่ 75 มิลลิลิตรแต่ละ flask เติมสารละลายฟีนอล 5 มิลลิลิตร และ สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที จึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร

(2.) หาปริมาณแทนนินในสารละลายแทนนินที่สกัดได้

นำสารละลายตัวอย่างมา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร ที่มีน้ำอยู่ 75 มิลลิลิตร เติมสารละลายฟีนอล 5 มิลลิลิตร และสารละลายอิมตัวโซเดียมคาร์บอเนต 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร เช่นเดียวกับข้อ 1 ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ถ้ามากเกินไปต้องเจือจางให้มีความเข้มข้นเป็น $1/25$ เท่าของสารละลายตัวอย่าง แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบกับ standard curve ก็จะทราบปริมาณแทนนินในสารละลายแทนนิน

3.3.2 ปริมาณความชื้นในเปลือกเงาะหรือในผลิตภัณฑ์แทนนิน (AOAC, 1990)

ชั่งเปลือกเงาะ หรือผลิตภัณฑ์แทนนิน ให้ได้น้ำหนักประมาณ 0.2 กรัม ใส่ลงในขวดชั่ง (weighting bottle) ที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอนแล้วโดยเครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง อบขวดชั่งที่อุณหภูมิ 105 ± 5 องศาเซลเซียส นำขวดชั่งออกจากตู้อบและใส่ลงใน desicator เมื่อ desicator เย็นแล้วชั่งน้ำหนักขวดชั่งเพื่อหาน้ำหนักที่หายไป ซึ่งก็คือปริมาณความชื้นของเปลือกเงาะ หรือของผลิตภัณฑ์แทนนิน

3.3.3 ปริมาณผลิตภัณฑ์แทนนินในสารละลายแทนนิน

ไปเปิดสารละลายแทนนิน 20 มิลลิลิตรใส่ลงใน besin ที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอนแล้วนำ besin ไปประเหยสารสกัดออกโดยเครื่องอังไอน้ำ จนกระทั่งสารละลายใกล้แห้ง จึงอบ besin ที่อุณหภูมิ 105 ± 5 องศาเซลเซียส ชั่งน้ำหนัก besin ที่มีผลิตภัณฑ์แทนนินอยู่บนน้ำหนักที่อ่านได้คือ ปริมาณผลิตภัณฑ์แทนนินในสารละลายแทนนิน