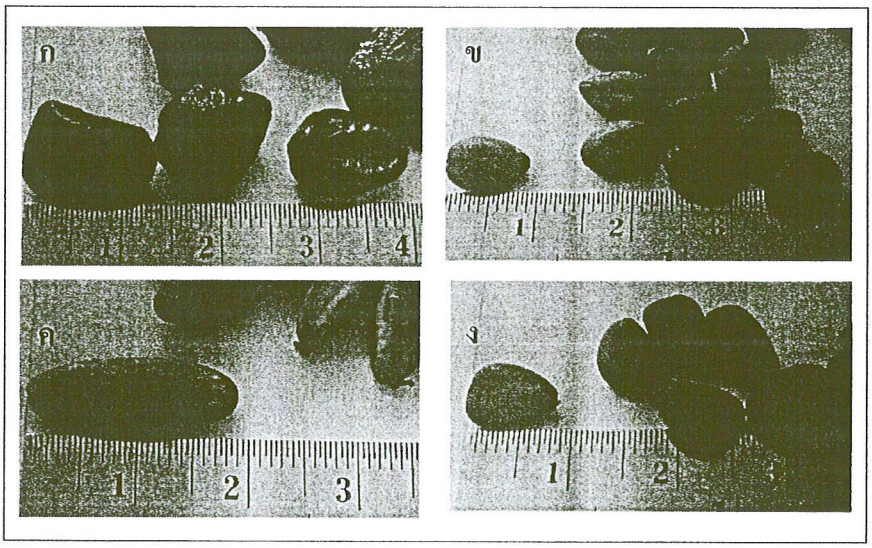
สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

บทที่ 3
วัตถุดิบและวิธีการทดลอง

3.1 การเตรียมวัตถุดิบ

3.1.1 เมล็ดพืชที่ใช้ในการศึกษา

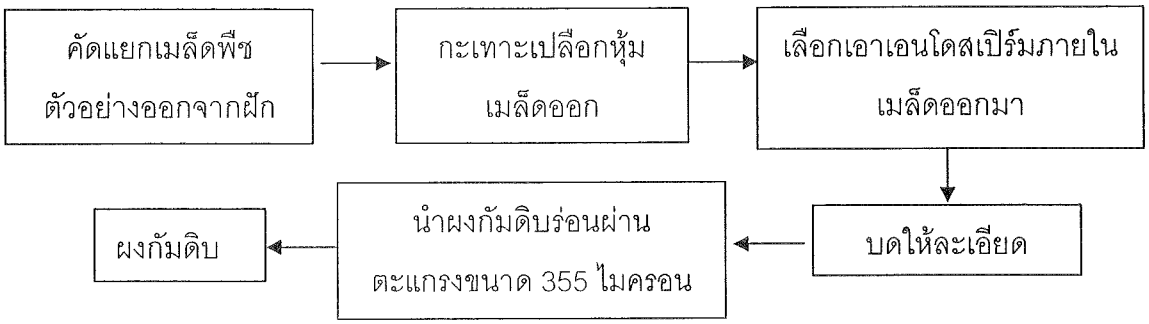
เมล็ดพืชตัวอย่างที่นำมาใช้ในการสกัดกัมในโครงการวิจัยนี้ ได้แก่ เมล็ดมะขาม (*Tamarindus indica* L.) จากจังหวัดกาฬสินธุ์ เมล็ดราชพฤกษ์ (*Cassia fistula*) จากจังหวัดนครสวรรค์ เมล็ดหางนกยูงฝรั่ง (*Delonix regia*) และเมล็ดหางนกยูงไทย (*Caesalpinia pulcherrima*) จากจังหวัดชลบุรี ซึ่งแสดงดังรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 เมล็ดพืชตัวอย่างที่ใช้ในโครงการวิจัย ได้แก่เมล็ดมะขาม (*Tamarindus indica* L.) (ก) เมล็ดราชพฤกษ์ (*Cassia fistula*) (ข) เมล็ดหางนกยูงฝรั่ง (*Delonix regia*) (ค) และเมล็ดหางนกยูงไทย (*Caesalpinia pulcherrima*) (ง)

3.1.2 การเตรียมผงกัมดิบ

ขั้นตอนในการเตรียมผงกัมดิบจากเมล็ดพืชตัวอย่าง มีกระบวนการตามรูปที่ 3.2



รูปที่ 3.2 กระบวนการเตรียมผงกัมดิบจากเมล็ดพืช

3.1.3 การสกัดกัมด้วยวิธีการตกตะกอนด้วยสารละลายไอโซโพรพานอล

1. ละลายผงกัมดิบในน้ำกลั่นกวนสารละลายที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลาแปรจาก 0.5 ถึง 3.5 ชั่วโมง
2. หยดสารละลายโซเดียมเอไซด์ (Sodium Aside, 5ppm) 1-2 หยด
3. กวนสารละลายตัวอย่างต่อเนื่องที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ เพื่อกำจัดสิ่งเจือปนออกจากกัมดิบ ระยะเวลาแปรจาก 0.5 ถึง 3 ชั่วโมง
4. ตั้งสารละลายทิ้งไว้ให้เย็น
5. กรองกากทิ้งด้วยผ้ากรองขนาด 150 ไมครอน
6. นำสารละลายที่ผ่านการกรอง มาตกตะกอนด้วยสารละลายไอโซโพรพานอล 3 ครั้ง
7. ล้างสารที่ได้ด้วยสารละลายอะซีโตน 1 ครั้ง
8. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนแห้ง และนำไปบดให้ละเอียด
9. นำไปร่อนผ่านตะแกรงขนาด 355 ไมครอน
10. ชั่งน้ำหนักผงกัมสกัด และบันทึกผล

3.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของกัม

3.2.1 การหาปริมาณความชื้น

วิธีการหาปริมาณความชื้นของกัมจะทำตามมาตราฐาน ASTM-D2974-87 โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. อบถ้วยกระเบื้องที่แห้งและสะอาดในตู้อบ ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบ และปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักและบันทึกผล
2. ชั่งน้ำหนักสารตัวอย่างประมาณ 2 กรัม ลงในถ้วยกระเบื้องและบันทึกผล
3. นำสารตัวอย่างที่ชั่งเรียบร้อยแล้วไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง
4. นำออกจากตู้อบ และปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักและบันทึกน้ำหนัก

5. นำกลับไปอบต่ออีกประมาณครึ่งชั่วโมง และนำมาชั่งน้ำหนัก (กรณีน้ำหนักไม่คงที่ให้นำกลับไปอบใหม่จนน้ำหนักที่ได้มีค่าคงที่) จากนั้นคำนวณหาค่าความชื้นดังนี้

$$W = \frac{(W_1 - W_2)}{W_1} x100 \qquad (3.1)$$

เมื่อ W คือ ร้อยละของความชื้น

W_1 คือ น้ำหนักของสารตัวอย่างก่อนอบ (กรัม)

W_2 คือ น้ำหนักของสารตัวอย่างหลังอบ (กรัม)

หมายเหตุ ทำการทดลองซ้ำสามครั้งสำหรับ 1 ตัวอย่าง

3.2.2 การหาปริมาณเถ้า

วิธีการหาปริมาณเถ้าของกัมจะทำตามมาตราฐาน AOAC 923.03 โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. อบถ้วยกระเบื้องที่แห้งและสะอาดในตู้อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาใส่ในโถดูดความชื้น ปล่อยทิ้งให้เย็นแล้วนำไปชั่งน้ำหนักพร้อมทั้งบันทึกผล
2. ชั่งน้ำหนักสารตัวอย่างประมาณ 3 กรัม ลงในถ้วยกระเบื้อง และบันทึกผล
3. นำสารตัวอย่างที่ชั่งเรียบร้อยแล้วไปเผาในเตาเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง
4. นำตัวอย่างที่แห้งแล้วใส่ในโถดูดความชื้น ทิ้งไว้ให้เย็น นำไปชั่งน้ำหนัก และบันทึกผล
5. คำนวณปริมาณเถ้าดังนี้

$$A = \frac{T\,x100}{M_2} \qquad (3.2)$$

เมื่อให้ A คือ ร้อยละของเถ้า

T คือ ของแข็งทั้งหมด (Total Solids) หาได้จาก $T = 100 - W$ เมื่อ W คือ ร้อยละของความชื้น

M_2 คือ น้ำหนักของสารตัวอย่างหลังเผา (กรัม)

หมายเหตุ ทำการทดลองซ้ำสามครั้งสำหรับ 1 ตัวอย่าง

3.2.3 การหาปริมาณโปรตีน

วิธีการหาปริมาณโปรตีนของกัมจะเป็นการหาปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจน (-NH) ทั้งหมด ซึ่งทำตามมาตราฐาน AOAC 981.10 สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนประกอบด้วย 4 ขั้นตอนหลักดังนี้คือ

1. การย่อยตัวอย่าง (Digestion) เป็นการย่อยตัวอย่างสารด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น โดยมีสารเร่งปฏิกิริยาภายใต้สภาวะอุณหภูมิสูง ไนโตรเจนที่เป็นของโปรตีนแท้ (True Protein) และไม่ใช่โปรตีน (Non Protein Nitrogen, NPN) จะถูกเปลี่ยนเป็นแอมโมเนียมซัลเฟต (Ammonium Sulfate, $(NH_4)_2SO_4$)
2. การกลั่นแอมโมเนียม (Distillation) เมื่อนำโซเดียมไฮดรอกไซด์ มาทำปฏิกิริยากับเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ได้จากการย่อยตัวอย่างสารแล้วจะได้ก๊าซแอมโมเนียซึ่งจับก๊าซนี้ได้ด้วยสารละลายบอริค
3. การไตเตรทเพื่อหาปริมาณไนโตรเจน (Titration) เป็นการนำสารละลายกรดบอริคซึ่งจับก๊าซแอมโมเนียไว้มาไตเตรทกับสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก
4. การคำนวณ นำปริมาณสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกที่ใช้ในการไตเตรทไปคำนวณหาปริมาณไนโตรเจน แล้วคูณกับ Kjeldahl Factor (5.7) ได้เป็นค่าโปรตีน

$$\%\text{Total Nitrogen} = \frac{(A-B)xCx0.014x100}{D} \tag{3.3}$$

$$\%\text{ Crude Protein, CP} = \%N \times 6.25 \tag{3.4}$$

เมื่อให้ A = มิลลิกรัมของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก 0.1 นอร์มอล ที่ไตรเตรทกับตัวอย่าง

B = มิลลิกรัมของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก 0.1 นอร์มอล ที่ไตรเตรทกับ Blank

C = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก

D = น้ำหนักตัวอย่างสาร (กรัม)

<u>วิธีการ</u>

1. ชั่งตัวอย่างสาร 0.25 กรัม ใส่หลอดแก้วก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตร
2. ใส่ตัวเร่งปฏิกิริยา (Kjelblet) จำนวน 1 เม็ด และกรดซัลฟูริกเข้มข้น 10 มิลลิลิตรลงในหลอดแก้วก้นกลม

3. นำตัวอย่างสารไปย่อยด้วยเครื่อง 2020 Digestion System ที่อุณหภูมิ 420 องศาเซลเซียส นาน 45 นาที
4. ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
5. นำตัวอย่างสารที่ผ่านการย่อยแล้วเข้าเครื่องกลั่น Kjeltec System 1026 Distilling Unit จากนั้นเติมกรดบอริกร้อยละ 2 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร และหยดอินดิเคเตอร์ (NaOH) 2-3 หยด ลงในขวดลูกชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร
6. กลั่นด้วยระบบอัตโนมัติ ใช้เวลา 3.5 นาที
7. นำตัวอย่างที่ผ่านการกลั่น มาไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล
8. คำนวณหาปริมาณโปรตีนหยาบจากสมการ 3.4

3.2.4 การหาปริมาณไขมัน

วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณไขมันของกัมจะทำตามมาตราฐาน AOAC 922.06 ด้วยชุดสกัดแบบซอกเลต (Soxhlet Apparatus)

1. ล้างเครื่องแก้วที่ต้องใช้ด้วยปิโตรเลียม จากนั้นทำให้แห้งโดยอบที่อุณหภูมิ 102 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น
2. วางชิ้นผ้าฝ้ายใส่ในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร อุดสำลีไว้ที่ก้นของทิมเบิล (Thimble)
3. ชั่งตัวอย่าง 5 กรัมใส่ในทิมเบิล เติมทราย 1-1.5 กรัม และคนให้เข้ากันด้วยแท่งคน เช็ดแท่งคนด้วยชิ้นผ้าฝ้ายแล้วนำไปวางบนทิมเบิล อบให้แห้งด้วยอุณหภูมิ 102 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง
4. ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น
5. นำชิ้นผ้าฝ้ายจากก้นบีกเกอร์ไปวางด้านบนของทิมเบิล
6. นำทิมเบิลใส่ในชุดสกัดแบบซอกเลตดังรูปที่ 3.3
7. ทำความสะอาดขวดวัดปริมาตรขนาด 150 มิลลิลิตร แล้วใส่ปิโตรเลียมประมาณ 90 มิลลิลิตร
8. ทำการสกัดโดยให้ความร้อนโดยอุปกรณ์ให้ความร้อนหรือ อ่างควบคุมความร้อน
9. ให้ความร้อนกับตัวทำละลายจนเดือดเปลี่ยนค่าความร้อนซึ่งหยดตัวทำละลายจากคอนเดนเซอร์ใส่ในตัวอย่าง อย่างต่อเนื่องประมาณ 6 หยด ต่อวินาที

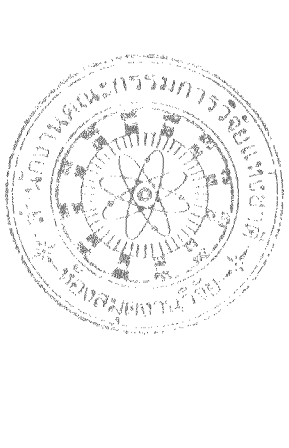
10. ย้ายการสกัดจากการให้ความร้อนและแยกออกจากเครื่องสกัดและคอนเดนเซอร์ แล้วนำขวดแก้วไปให้ความร้อนและป้องกันการระเหยของตัวทำละลาย
11. นำขวดแก้วไปอบที่ 102 องศาเซลเซียส ทำให้แห้งจนกระทั่งน้ำหนักคงที่ประมาณ 1-2 ชั่วโมง
12. ทำให้เย็นในโถดูดความชื้นและสามารถคำนวณปริมาณไขมันจากสมการที่ 3.5 ข้างล่าง

$$\% \, Fat = \frac{(W_2 - W_1) \times 100}{S} \tag{3.5}$$

เมื่อให้ W_1= น้ำหนักของขวดแก้ว

W_2= น้ำหนักของขวดแก้ว และปริมาณไขมันที่สกัดได้

S =น้ำหนักตัวอย่าง



รูปที่ 3.3 เครื่องสกัดแบบซอกเลต (1 แท่งกวน 2 ขวดกลั่น 3 คอนเดนเซอร์ 4 ทิมเบิล และ 5 สารที่จะทำการสกัด หรือสารที่เหลือจากการสกัด)

3.2.5 การหาปริมาณน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว

ปริมาณน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวของกัมหาได้ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ Gas-Liqu Chromatography (GC-FID) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ (Coimbra, Delgadillo, Waldron, and Selvendr 1996)

1. ชั่งสารตัวอย่างประมาณ 2-3 มิลลิกรัม ในหลอดทดลองที่มีฝาปิด
2. เติมกรดซัลฟูริก (Sulfuric Acid) ความเข้มข้นร้อยละ 72 โดยน้ำหนัก ปริมาณ 200 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

3. เติมน้ำกลั่นปริมาณ 2.2 มิลลิลิตร และให้ความร้อนโดยผ่านอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2.5 ชั่วโมง
4. นำหลอดทดลองไปแช่ในอ่างน้ำแข็งเพื่อทำให้ลดอุณหภูมิ จากนั้นเติมสารละลายมาตรฐาน (2-Deoxiglucose) ปริมาณ 200 ไมโครลิตร
5. นำสารตัวอย่างจากข้อข้างต้นปริมาณ 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลอง และเติมสารละลายแอมโมเนียความเข้มข้นร้อยละ 25 โดยน้ำหนัก ปริมาณ 200 ไมโครลิตร เพื่อทำให้ค่าความเป็นกรดด่างเป็นกลาง จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมเตตระไฮโดรโบเรต (Sodiumtetrahydroborate) ความเข้มข้นร้อยละ 15 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ใน 3 โมลแอมโมเนียปริมาณ 100 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง (หมายเหตุ สารละลายโซเดียมเตตระไฮโดรโบเรตที่ใช้ต้องเตรียมขึ้นใหม่ (150 มิลลิกัรมใน 1 มิลลิลิตร)
6. นำไปแช่ในอ่างน้ำแข็งเพื่อทำให้ลดอุณหภูมิและหยุดปฏิกิริยาโดยการเติมกรดอะซิตริกปริมาณ 50 ไมโครลิตร
7. นำสารตัวอย่างจากข้อข้างต้นมาปริมาณ 300 มิลลิลิตรใส่หลอดทดลองแบบ SOVIREL จากนั้นนำหลอดทดลองดังกล่าวไปแช่ในอ่างน้ำแข็ง แล้วเติม 1-เมทิลมิดาซอล (1-Methyimidazole) ปริมาณ 450 มิลลิลิตร และสารละลายอะซิติกแอนไฮไดร์ (Acetic anhydride) ปริมาณ 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
8. เติมน้ำปริมาณ 4 มิลลิลิตร และไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane) ปริมาณ 2.5 มิลลิลิตร ปิดฝาให้สนิท เขย่าให้เข้ากันประมาณ 20 ครั้งด้วยมือ เพื่อสกัดออดิตอล อะซิเตท
9. ตั้งหลอดทดลองทิ้งไว้ 15 นาที และนำไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วที่ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที แยกของเหลวชั้นบนออก
10. เติมน้ำปริมาณ 3 มิลลิลิตร และสารละลายไดคลอโรมีเทน 2.5 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยง จากนั้นแยกของเหลวชั้นบนออก
11. ล้างสารที่ได้ 2 ครั้งด้วยน้ำปริมาณ 3 มิลลิลิตร โดยการผสม และนำเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยง จากนั้นแยกของเหลวที่อยู่ด้านบนออก ล้างจนกระทั้งไม่พบของเหลวที่อยู่ชั้นบน
12. นำส่วนของไดคลอโรมีเทนใส่ในหลอดทดลอง และทำให้ระเหยกลายเป็นไอด้วย nitrogen stream ที่ 40 องศาเซลเซียส
13. ดึงน้ำที่เหลือออกโดยการเติมสารละลายแอนไฮดรัส อะซิโตนปริมาณ 1 มิลลิลิตร และระเหยออกให้แห้ง (2 ครั้ง)

สำหรับการวิเคราะห์โดยโครมาโตกราฟฟี สารออดิตอล อะซิเตทจะถูกละลายในสารละลายแอนไฮดรัส อะซิโตนปริมาณ 50 ไมโครลิตร โดยการวิเคราะห์จะใช้ Flame- Ionization detector กับคอลัมน์แบบคะปิลลารีชนิด DB-225 ใช้แก๊สฮีเลียมเป็นตัวพา

3.3 การวิเคราะห์ค่าความหนืดแบบอินทริกซิค

การหาค่าความหนืดแบบอินทริกซิค (Intrinsic Viscosity) ใช้เครื่องวัดความหนืดแบบ Oswald Viscometer ตามมาตราฐาน ASTM-D2515, ISO3105, Series 100 โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. ล้างเครื่องวัดความหนืดด้วยน้ำกลั่น
2. จับเครื่องวัดความหนืดด้วยแคลมป์ จุ่มเครื่องวัดความหนืดลงในโหลแก้วที่มีน้ำอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ให้ระดับน้ำอยู่เหนือสารละลายตัวอย่าง และควบคุมอุณหภูมิน้ำในโหลแก้วให้คงที่ตลอดการทดลอง
3. ใส่น้ำกลั่นปริมาณ 10 มิลลิลิตร ลงในเครื่องวัดความหนืด ทิ้งไว้ประมาณ 3 นาทีเพื่อให้อุณหภูมิเท่ากับ 20 องศาเซลเซียส
4. ใช้จุกยางดูดของเหลวในเครื่องวัดความหนืด จนผิวของเหลวที่ดูดขึ้นมาอยู่เหนือขีด แล้วปล่อยให้ของเหลวไหลลงมา โดยดึงจุกยางออกและเริ่มจับเวลาโดยให้ของเหลวผ่านขีดบนจนกระทั่งผ่านขีดล่าง บันทึกเวลาในหน่วยวินาที
5. ทำการทดลองซ้ำตามข้อ 3 และ 4 โดยเปลี่ยนน้ำกลั่นเป็นสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้น 0.010-0.060 ตามลำดับ
6. นำผลที่ได้มาคำนวณหาค่าความหนืด ตามสมการที่ 3.5 และ 3.6 ตามที่กล่าวไว้แล้ว

สำหรับการประมาณค่าความหนืดจะใช้สมการของ Huggins' (1942) (สมการที่ 3.6) และสมการของ Kraemer (สมการที่ 3.7)

$$\frac{\eta_{sp}}{C} = [\eta] + k'[\eta]^2 C \tag{3.6}$$

$$\frac{(\ln \eta_{rel})}{C} = [\eta] + k''[\eta]^2 C \tag{3.7}$$

เมื่อ $[\eta]$ คือ ค่าความหนืดแบบ Intrinsic

$[\eta]_{sp}$ คือ ค่าความหนืดจำเพาะ(Specific Viscosity)

$[\eta]_{rel}$ คือ ค่าความหนืดสัมพัทธ์(Relative Viscosity)

C คือ ความเข้มข้นของสารละลาย

k' และ k'' คือค่าคงที่สัมประสิทธิ์ของ Huggins' และ Kraemer ตามลำดับ

3.4 **การคำนวณค่ามวลโมเลกุลเฉลี่ยแบบ** Viscosity average molecular weight

ค่ามวลโมเลกุลเฉลี่ยแบบ Viscosity average molecular weight, $\overline{M_v}$ ของสารละลายกัมตัวอย่างสามารถคำนวณได้จากค่าความหนืดแบบอินทริกซิคที่วัดได้ ซึ่งเป็นที่นิยมมากในปัจจุบัน สำหรับกัมตัวอย่างนั้นจะสามารถคำนวณค่า $\overline{M_v}$ ได้จากสมการความสัมพันธ์ของ Mark-Houwink (สมการที่ 3.8) (Hill, Ledward, and Mitchell, 1998)

$$[\eta] = K\overline{M}_v^{\infty} \tag{3.8}$$

เมื่อ K คือ ค่า exclude volume ของสายโพลิเมอร์

α คือ ค่าที่มีความสัมพันธ์กับความคงรูป (Stiffness) ความยืดหยุ่นของสายโพลิเมอร์ (0.5 – 0.8 สำหรับสารประเภทโพลีเมอร์) (Harding, 1992)

สำหรับกัมจากเมล็ดมะขามนั้นสามารถหาค่า $\overline{M_v}$ ได้จากสมการที่ 3.9 เมื่อให้ค่า α เท่ากับ 0.55 (Patel et al., 2008)

$$\overline{M}_1 = \left([\eta]_1 \times \frac{\overline{M}_2^{\alpha}}{[\eta]_2} \right)^{\frac{1}{\alpha}} \tag{3.9}$$

ในขณะที่ค่า $\overline{M_v}$ ของกัมจากเมล็ดราชพฤกษ์ หางนกยูงไทย และหางนกยูงฝรั่งนั้นจะมีโครงสร้างที่เรียกว่ากาแลคโตแมนแนน สามารถหาได้จากสมการที่ 3.10 และ 3.11 (Goncalves et al., 2004; Cerqueira et al., 2008)

$$[\eta] = 11.55 \times 10^{-6} [(1-\alpha)\overline{M}_v]^{0.98} \tag{3.10}$$

$$\alpha = \frac{1}{[(M/G)+1]} \tag{3.11}$$

เมื่อ M/G คือ ค่าอัตราส่วนระหว่างน้ำตาลแมนโนสต่อน้ำตาลกาแลคโตส