

การทดลอง เรื่องการสกัดสตีโรไฮด์จากหญ้าหวาน โดยใช้ไดออกเซนเป็นตัวทำละลาย

4.1 การสกัดไขมันจากหญ้าหวานด้วยวิธี Soxhlet โดยใช้คลอโรฟอร์มเป็นตัวทำละลาย

หญ้าหวานแห้งบดละเอียดแล้ว ชั่งอย่างละเอียด 20 กรัม ใส่ในส่วนของ Soxhlet Thimble เต็มคลอโรฟอร์ม 400 มิลลิลิตร ต้มคลอโรฟอร์มให้เดือดใน Heating Mantle คลอโรฟอร์มจะระเหยและกลั่นเป็นของเหลว อยู่ในส่วนของ Soxhlet จะทำหน้าที่สกัดไขมัน, โปรตีน สารที่ทำให้เกิดสี เช่น คลอโรฟิลล์และส่วนที่เป็น Non-Polar ออกจากหญ้าหวาน คลอโรฟอร์มเมื่ออยู่ในส่วนของ Soxhlet จนได้ระดับหนึ่งแล้วจะเกิดการไหลย้อน กลับที่ขวดกันกลม ซึ่งจะมีอัตราการไหล 3 ครั้ง / ชั่วโมง สำหรับคลอโรฟอร์มเป็นตัวทำละลาย โดยใช้ Soxhlet Extractor ขนาดเล็ก ศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการสกัดไขมันจากหญ้าหวาน โดยใช้คลอโรฟอร์มเป็น ตัวทำละลาย

ตัวทำละลายที่สกัดไขมันจากหญ้าหวานมีหลายชนิด แต่ที่ใช้น้อยที่สุด (32) สำหรับการสกัดไขมันจากหญ้าหวานได้แก่ คลอโรฟอร์ม ซึ่งใช้เวลาในการสกัดต่าง ๆ ดังนี้

เวลา (ชม.)	5	10	15	20	25
จำนวนครั้งในการไหลย้อน (Syphon)	15	30	45	60	75

หญ้าหวานหลังจากสกัดด้วยคลอโรฟอร์มแล้ว นำไปตากให้แห้ง ชั่งน้ำหนัก และนำสารละลายคลอโรฟอร์มที่ได้ไประเหย คลอโรฟอร์มกลั่นมาใช้ใหม่โดยใช้เครื่อง Vacuum Rotary Evaporator นำส่วนที่เหลือจากการระเหยคลอโรฟอร์มออกไปทำให้แห้ง จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ ชั่งน้ำหนักส่วนที่เหลือ ทำการทดลองซ้ำ หากค่าเฉลี่ยปริมาณร้อยละของสิ่งที่สกัดได้ด้วยคลอโรฟอร์ม

4.2 การสกัดลีสทีโรไลต์จากหญ้าหวาน ด้วยวิธี Soxhlet โดยใช้ได้อ็อกเซนเป็นตัวทำละลาย (32)

หญ้าหวานที่ผ่านการสกัดไขมันด้วยคลอโรฟอร์ม ใช้อย่างละเย็บ 20 กรัม ใส่น้ำในส่วนของ Soxhlet Thimble เติมได้อ็อกเซน 400 มิลลิลิตร ต้มได้อ็อกเซนให้เดือดใน Heating Mantle ได้อ็อกเซนจะระเหยและกลั่นเป็นของเหลวอยู่ในส่วนของ Soxhlet จะทำหน้าที่สกัดลีสทีโรไลต์ออกจากหญ้าหวาน ได้อ็อกเซนเมื่ออยู่ในส่วนของ Soxhlet จนได้ระดับหนึ่งแล้วก็จะเกิดการไหลย้อน กลับที่ขวดกักกลั่น ซึ่งจะมีอัตราการไหลย้อน 3 ครั้ง / ชั่วโมง สำหรับได้อ็อกเซนเป็นตัวทำละลาย โดยใช้ Soxhlet Extractor ขนาดเล็ก ศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการสกัดลีสทีโรไลต์จากหญ้าหวาน โดยใช้ได้อ็อกเซน เป็นตัวทำละลาย

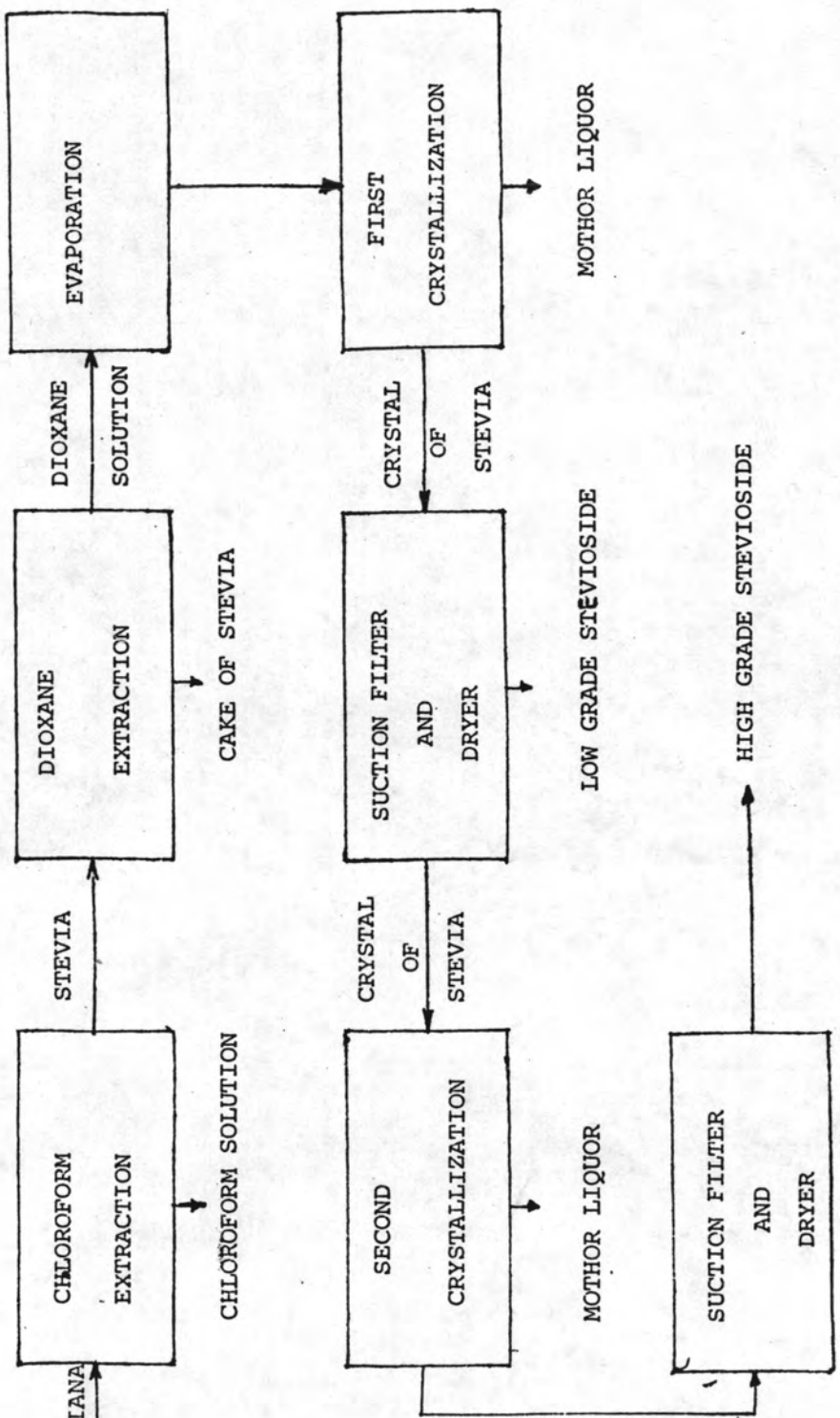
การสกัดลีสทีโรไลต์จากหญ้าหวาน โดยใช้ได้อ็อกเซนเป็นตัวทำละลาย ใช้เวลาในการสกัดต่าง ๆ กันดังนี้

เวลา (ชม.)	1	2	3	4	5	10	15
จำนวนครั้งการไหลย้อน (Syphon)	3	6	9	12	15	30	45

หญ้าหวานหลังจากสกัดด้วยได้อ็อกเซน ตากให้แห้งแล้วยังน้ำหนัก นำสารละลายได้อ็อกเซนที่ได้ไประเหยได้อ็อกเซนกลับมาใช้ใหม่ โดยใช้เครื่อง Vacuum Rotary Evaporator น้ำล้นที่เหลือจากการระเหยได้อ็อกเซนไปทำให้แห้ง จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ ยังน้ำหนักล้นที่เหลือทำการทดลองซ้ำ หากค่าเฉลี่ยปริมาณร้อยละของสิ่งที่สกัดได้ด้วยได้อ็อกเซน

4.3 การตกผลึกลีสทีโรไลต์ในเมธานอล

สิ่งที่สกัดได้ด้วยได้อ็อกเซนเวลาต่าง ๆ กัน จากข้อ 4.2.1 นำมาตกผลึกในเมธานอล โดยเติมเมธานอลครั้งละ 5 มิลลิลิตร ต้มในอ่างน้ำร้อน และเติมเมธานอลอีกทีละ 5 มิลลิลิตร จนกระทั่งสิ่งที่สกัดได้ด้วยได้อ็อกเซนละลายจนหมดในขณะร้อน (32, 51) นำสารละลายเมธานอลที่ได้ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 28° เซลเซียส ก็จะเกิดผลึกเกิดขึ้น นำผลึกและสารละลายไปกรอง โดยการ Suction ล้างผลึกด้วยเมธานอลเย็น นำผลึกลีสทีโรไลต์ที่ได้ไปอบแห้ง จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ ยังน้ำหนักผลึกลีสทีโรไลต์ที่ได้ ทำการทดลองซ้ำ หากค่าเฉลี่ยปริมาณร้อยละของผลึกลีสทีโรไลต์



รูปที่ 4.1 แสดงแผนผังกระบวนการสกัดสตีโรไซด์ จากหญ้าหวาน โดยใช้ไดออกเซนเป็นตัวทำละลาย

4.4 กระบวนการสกัดสีวีโอไฮด์จากหญ้าหวาน โดยใช้ไดออกเซนเป็นตัวทำละลายขยายส่วน

จากรูปที่ 4.1 แผนภาพแสดงกระบวนการสกัดสีวีโอไฮด์จากหญ้าหวาน โดยใช้ไดออกเซนเป็นตัวทำละลาย จะแบ่งกระบวนการแยก ได้หลายกระบวนการดังนี้

4.4.1 หน่วยบด นำหญ้าหวานตากแห้งประมาณ 1 กิโลกรัม บดด้วยเครื่อง Cutter Mill ให้เป็นผงละเอียด

4.4.2 หน่วยสกัดไขมันด้วยคลอโรฟอร์ม (Chloroform Extraction) (32)

หญ้าหวานที่บดละเอียดแล้วมีขนาดอนุภาค 2 มิลลิเมตร 1 กิโลกรัม ใส่ในส่วนหนึ่งของ Soxhlet Thimble เติมคลอโรฟอร์ม 10 ลิตร ต้มคลอโรฟอร์มให้เดือดใน Heating Mantle คลอโรฟอร์มเป็นตัวทำละลาย Non-Polar จะระเหยและกลั่นเป็นของเหลวอยู่ในส่วนหนึ่งของ Soxhlet จะทำหน้าที่สกัดไขมันและสิ่งเจือปนอื่น ๆ ที่เป็นสารอินทรีย์พวก non-polar ออกจากหญ้าหวาน แต่สีวีโอไฮด์ไม่ถูกสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม จากผลการทดลองข้อ 4.1.1 ในเครื่อง Soxhlet Extractor ขนาดเล็กมีอัตราการไหลเวียน 3 ครั้ง / ชั่วโมง เวลาที่เหมาะสมในการสกัด 20 ชั่วโมง จำนวนครั้งในการไหลเวียน 60 ครั้ง ดังนั้นในการสกัดด้วยเครื่อง Soxhlet Extractor ขนาดใหญ่ ซึ่งมีอัตราการไหลเวียน 2 ครั้ง / ชั่วโมง สำหรับตัวทำละลายที่เป็นคลอโรฟอร์มจะต้องใช้เวลาในการสกัด 30 ชั่วโมง จะได้จำนวนครั้งในการไหลเวียน 60 ครั้ง บันทึกผลการทดลองสิ่งที่สกัดได้ด้วยคลอโรฟอร์ม

4.4.3 หน่วยทำหญ้าหวานให้แห้ง

หญ้าหวานหลังจากผ่านการสกัดไขมันด้วยคลอโรฟอร์ม นำไปตากแดดทำให้แห้ง แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิประมาณ 40° เซลเซียส จนกระทั่งหญ้าหวานที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์มแล้วมีน้ำหนักคงที่ บันทึกผลการทดลอง

4.4.4 หน่วยสกัดสีวีโอไฮด์ด้วยไดออกเซน (Dioxane Extraction) (32)

หญ้าหวานที่สกัดไขมันด้วยคลอโรฟอร์มและทำให้แห้งแล้ว นำมาใส่ในส่วนหนึ่งของ Soxhlet Thimble เติมไดออกเซน 10 ลิตร ต้มไดออกเซนให้เดือดใน Heating Mantle ไดออกเซนเป็นตัวทำละลายชนิดหนึ่งที่ใช้ในการสกัดสีวีโอไฮด์จากหญ้าหวาน จะระเหยและกลั่นเป็นของเหลวอยู่ในส่วนหนึ่งของ Soxhlet จะทำหน้าที่สกัดสีวีโอไฮด์ออกจากหญ้าหวาน จากผลการทดลอง 4.2.1 ในเครื่อง Soxhlet Extractor ขนาดเล็ก มีอัตราการไหลเวียน 3 ครั้ง / ชั่วโมง

เวลาที่เหมาะสมในการสกัด 5 ชั่วโมง จำนวนครั้งในการไซฟอน เท่ากับ 15 ครั้ง ดังนั้น ในการสกัดด้วยเครื่อง Soxhlet Extractor ขนาดใหญ่ ซึ่งมีอัตราการไซฟอน เท่ากับ 1 ครั้ง/45 นาที สำหรับตัวทำละลายที่เป็นไดออกเซน จะต้องสกัดเพื่อให้จำนวนครั้งในการไซฟอน ไซฟอน = 15 ครั้ง แต่ในการทดลองใช้เวลาในการสกัดสตีโรไซด์ 15 ชั่วโมง จำนวนครั้ง ในการไซฟอน เท่ากับ 20 ครั้ง เพื่อให้แน่ใจว่าสกัดสตีโรไซด์ออกจากหญ้าหวานได้มากที่สุด บันทึกผลการทดลองสิ่งที่สกัดได้ด้วยไดออกเซน

4.4.5 หน่วยทำให้เข้มข้น (Concentration Unit)

ในกระบวนการนี้แบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน คือ

4.4.5.1 ส่วนของสารละลายคลอโรฟอร์ม

สารละลายคลอโรฟอร์มที่ได้จากข้อ 4.4.2 นำมาระเหยคลอโรฟอร์มกลับมาใช้ใหม่ โดยใช้เครื่อง Rotary Evaporator ที่อุณหภูมิประมาณ 50° เซลเซียส ระเหยจนถึงที่สกัดได้ด้วย คลอโรฟอร์มจนแห้ง วัดปริมาตรคลอโรฟอร์มที่ระเหยกลับมาใช้ใหม่ และนำสิ่งที่สกัดได้ด้วยคลอโรฟอร์ม ไปอบแห้งในเตาอบสูญญากาศที่อุณหภูมิประมาณ 40° เซลเซียส จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ ชั่งน้ำหนัก บันทึกผลการทดลอง

4.4.5.2 ส่วนของสารละลายไดออกเซน

สารละลายไดออกเซนที่ได้จากข้อ 4.4.4 นำมาระเหยไดออกเซนกลับมาใช้ใหม่ โดยใช้ เครื่อง Vacuum Rotary Evaporator ที่อุณหภูมิประมาณ 50° เซลเซียส ระเหยจนถึงที่สกัดได้ด้วย ไดออกเซนจนแห้ง วัดปริมาตรไดออกเซนที่ระเหยกลับมาใช้ใหม่ และนำสิ่งที่สกัดได้ด้วยไดออกเซน ไปอบแห้งในเตาอบสูญญากาศที่อุณหภูมิประมาณ 40° เซลเซียส จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ ชั่งน้ำหนัก บันทึกผลการทดลอง

4.4.6 หน่วยการตกผลึก (Crystallization Unit) (51,52)

ในกระบวนการนี้แบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน คือ

4.4.6.1 การตกผลึกครั้งที่ 1 (First Crystallization)

นำส่วนที่สกัดได้ด้วยไดออกเซนที่ทำให้แห้งแล้วจากข้อ 4.4.5.2 ต้มกับไดออกเซน ปริมาณ 150 มิลลิลิตร ในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 50° - 60° เซลเซียส จนกระทั่งสิ่งที่สกัดได้ด้วยไดออกเซน

ละลายหมด เติมเมธานอล ปริมาณเท่าตัว ประมาณ 150 มิลลิลิตร (อัตราส่วนเมธานอล : ไดออกเซน = 1:1) (52) กวนจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน นำสารละลายที่ได้ตั้งทิ้งไว้ค้างคืนที่อุณหภูมิประมาณ 28° เซลเซียส จะเกิดผลึกสตีโรโพลด์เกิดขึ้น นำสารละลายที่ได้ไปกรองแยกผลึกออก

4.4.6.2 การตกผลึกครั้งที่ 2 (Second Crystallization)

นำผลึกสตีโรโพลด์ที่ได้จากการตกผลึกครั้งที่ 1 จากข้อ 4.4.6.1 ต้มกับไดออกเซนในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 50° - 60° เซลเซียส ในการตกผลึกครั้งที่ 2 นี้ ผลึกสตีโรโพลด์จะละลายในไดออกเซนได้ช้า สิ่งต้องค่อย ๆ เติมไดออกเซนทีละน้อย ๆ จนกระทั่งผลึกละลายได้หมด นำสารละลายไดออกเซนในส่วนที่ไปกรอง เพื่อแยกเอาสิ่งที่ไม่ละลายออก เติมเมธานอลในอัตราส่วน 1:1 แล้วตั้งสารละลายทิ้งไว้ค้างคืนที่อุณหภูมิห้องประมาณ 28° เซลเซียส จะเกิดผลึกสตีโรโพลด์เกิดขึ้น นำสารละลายที่ได้ไปกรองแยกผลึกออก

4.4.7 หน่วยท่าผลึกสตีโรโพลด์ให้แห้ง ผลึกสตีโรโพลด์ที่ได้จากข้อ 4.4.6.1, และ 4.4.6.2 ผ่านการกรอง แยกออกจากสารละลายด้วย Suction ล้างผลึกด้วยเมธานอลเย็น (32) นำผลึกสตีโรโพลด์ไปอบแห้งในเตาอบสูญญากาศที่อุณหภูมิ 40° เซลเซียส จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ ยั่งน้ำหนักและบันทึกผลการทดลอง

4.5 การวิเคราะห์หาปริมาณสตีโรโพลด์

ทำการวิเคราะห์ตามวิธีของ Maruzen (25) การวิเคราะห์หาปริมาณสตีโรโพลด์จากหย้าหวานบดละเอียด ใช้ตัวอย่างหย้าหวานหนัก 5 กรัม ชั่งอย่างละเอียด ส่วนการวิเคราะห์หาปริมาณสตีโรโพลด์ในสารละลายสกัด ใช้ตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร และผลึกสตีโรโพลด์และส่วนที่สกัดทำให้แห้งที่ได้ ใช้ตัวอย่างละ 12 มิลลิกรัม ผสมกับน้ำจนครบ 20 มิลลิลิตร นำไปทำไฮโดรไลซิส ทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง ขึ้นตอนการวิเคราะห์มีดังนี้

การสกัด

ใส่ผงหย้าหวานบดละเอียด 5 กรัม ชั่งอย่างละเอียด ใส่ในขวดรูปกรวยขนาด 1000 มิลลิลิตร เติมน้ำ 500 มิลลิลิตร เขย่าในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 80° เซลเซียสทุก ๆ 30-60 นาที แยกไว้เป็นเวลา 5 ชั่วโมง เมื่อสารละลายได้ที่แล้วนำมาทำให้เย็น เทลงในกรวยแก้วที่มีกระดาษกรองเบอร์ 2 เอาสารละลายที่ได้ใส่ใน Volumetric Flask 1000 มิลลิลิตร ล้างกระดาษกรองด้วยน้ำหลาย ๆ ครั้ง เติมน้ำลงไปจนครบปริมาตร 1000 มิลลิลิตร เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน

การไฮโดรไลซิส (Hydrolysis)

ทำการปีเปตสารละลายสกัดมา 20 มิลลิลิตรใส่ในขวด Kjeldahl เติมกรดเกลือ ความเข้มข้น 8 นอร์มอล 20 มิลลิลิตร ทำการไฮโดรไลซิสตั้งขวด Kjeldahl ในอ่างน้ำร้อนอุณหภูมิประมาณ 100° เซลเซียส ต้มประมาณ 60 นาที ของเหลวที่ผ่านการไฮโดรไลซิส (Hydrolyze) แล้วจะถูกทำให้เย็น

การรีฟลักซ์ (Refluxes)

สารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซิส ถูกทำให้เย็นแล้ว เติมคลอโรฟอร์ม 30 มิลลิลิตร ฉุนแบบรีฟลักซ์ในอ่างน้ำร้อน ที่มีอุณหภูมิ 80° เซลเซียส ประมาณ 30 นาที จากนั้นทั้งสารละลายให้เป็นแล้วถ่ายใส่ขวดแยก (Separating Funnel) ขนาด 200 มิลลิลิตร เขย่าให้สารละลายเข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้นไซเอชันคลอโรฟอร์มออก เติมคลอโรฟอร์มอีก 2 ครั้ง ๆ ละ 20 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันอีกตั้งทิ้งไว้แยกชั้น ไซชันคลอโรฟอร์มออกไปรวมกับครั้งแรก เติม 10 กรัม โซเดียมซัลเฟต แอนไฮดรัส (Na_2SO_4 Anhydrous) เขย่าอย่างแรง กรองสารละลายด้วยกระดาษกรองเบอร์ 5 แล้วล้างกระดาษกรองด้วยคลอโรฟอร์ม

การเตรียมสารละลายไปฉีดหาปริมาณลีสโตรโอไซด์

สารละลายคลอโรฟอร์มที่ได้จากการรีฟลักซ์ (Refluxes) นำมาระเหยภายใต้สูญญากาศ ให้เหลือปริมาตร 2 มิลลิลิตร เติม 2 มิลลิลิตร อย่างถูกต้องของ Squalane-Chloroform 0.5 มิลลิลิตร ใน 300 มิลลิลิตร เพื่อใช้เป็นตัวมาตรฐานภายใน และหยด 1 มิลลิลิตร ของ Diazomethane-Ether นำสารละลายทั้งหมดให้เป็น 10 มิลลิลิตร ด้วยคลอโรฟอร์ม ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที แล้วจึงฉีดกับ Gas-Chromatography ด้วยปริมาณ 1.6 ไมโครลิตร

Gas Chromatography

Gas Chromatography ที่ใช้วิเคราะห์หาปริมาณลีสโตรโอไซด์จากหญ้าหวาน เป็นระบบ FID (Flame Ionization Detector) มีคอลัมน์เป็นแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร ยาว 1 เมตร ภายในบรรจุด้วย 3% Silicone OV 17 เคลือบบน Chromosorb WAW (DMCS)

สภาวะการทำงานของ Gas chromatography

อุณหภูมิคอลัมน์	220 ⁰	เซลเซียส
อุณหภูมิของ Injector	250 ⁰	เซลเซียส
อุณหภูมิของ Detector	230 ⁰	เซลเซียส
ปริมาณที่ฉีด	1.6	ไมโครลิตร
ความเร็วของกระดาษกราฟที่ Recorder		0.25 เซนติเมตร / นาที
Attenuator of Recorder	8	
Attenuator of Detector	16	
Amplifier	10 ⁻¹¹	mv
ความดันของอีตราสดีด	150	psig
ความดันของไฮโดรเจน	30	psig
ความดันก๊าซไนโตรเจน	30	psig

4.6 การวิเคราะห์

ทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง ทุกการทดลอง

4.6.1 การหาปริมาณความชื้น วิเคราะห์ตามวิธี AOAC ซี 1980 (26)

4.6.2 การวิเคราะห์หาปริมาณลีสทีรีโอไซด์ ใช้วิธีเดียวกับข้อ 4.5 (25)

โดยทำการวิเคราะห์ตัวอย่างทุกขั้นตอน ในกระบวนการสกัดลีสทีรีโอไซด์จากหญ้าหวาน โดยใช้ไดออกเซนเป็นตัวทำละลาย ซึ่งตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์มีดังนี้

หญ้าหวานก่อนสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม

หญ้าหวานหลังสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม

หญ้าหวานหลังสกัดด้วยไดออกเซน

สิ่งสกัดได้ด้วยคลอโรฟอร์ม

สิ่งสกัดได้ด้วยไดออกเซน

ผลลีสทีรีโอไซด์จากการตกผลึกครั้งที่ 1

ผลลีสทีรีโอไซด์จากการตกผลึกครั้งที่ 2

Mothor Liquor จากการตกผลึกครั้งที่ 1

Mothor Liquor จากการตกผลึกครั้งที่ 2