

บทที่ 3

วิธีการวิจัย

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. UV-Vis spectrophotometer (JASCO V-650)
2. IR spectrometer
3. เครื่องชั่งละเอียด ทศนิยม 2 ตำแหน่ง และ 4 ตำแหน่ง
4. เครื่องตรวจวัดค่าความเป็นกรด เบส (pH meter)
5. ขวดวัดปริมาตร (Volumetric flask) ขนาด 25, 50, 100, 250 และ 500 ลูกบาศก์เซนติเมตร
6. ขวดกั่นกลม
7. เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary Evaporator)
8. เทอร์โมมิเตอร์
9. เตาไฟฟ้า (Hotplate)
10. เครื่องแก้วพื้นฐานที่มีในห้องปฏิบัติการ เช่น หลอดทดลอง ขวดรูปชมพู่ ปีกเกอร์ แท่งแก้วคน
11. ขวดแก้วสีชาแบบมีฝา

3.2 สารเคมี

1. เหล็กคลอไรด์ (FeCl_3)
2. Tannic acid
3. โพแทสเซียมโบรไมด์ (KBr)
4. เปลือกมะพร้าวสดและแห้ง
5. เอทานอล
6. เมทานอล
7. กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid: HCl 37 %, Grade AR)
8. น้ำกลั่นปราศจากไอออน (Deionized water)

3.3 วิธีดำเนินการวิจัย

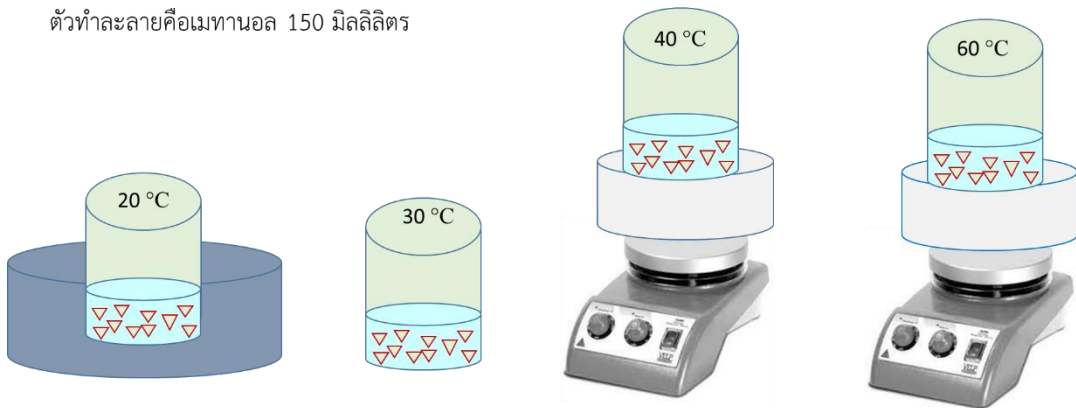
3.3.1 การเตรียมกาบมะพร้าวสำหรับการสกัด

นำกาบมะพร้าวทั้งสดและแห้งมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำเปล่า 2-3 ครั้ง จากนั้นนำมาผึ่งให้แห้งในที่ร่ม ก่อนทำการสกัด นำเปลือกมะพร้าวทั้งแห้งและสดมาสับหรือหั่นให้ละเอียด

3.3.2 การสกัดแทนนินจากเปลือกมะพร้าวสด และเปลือกมะพร้าวแห้ง

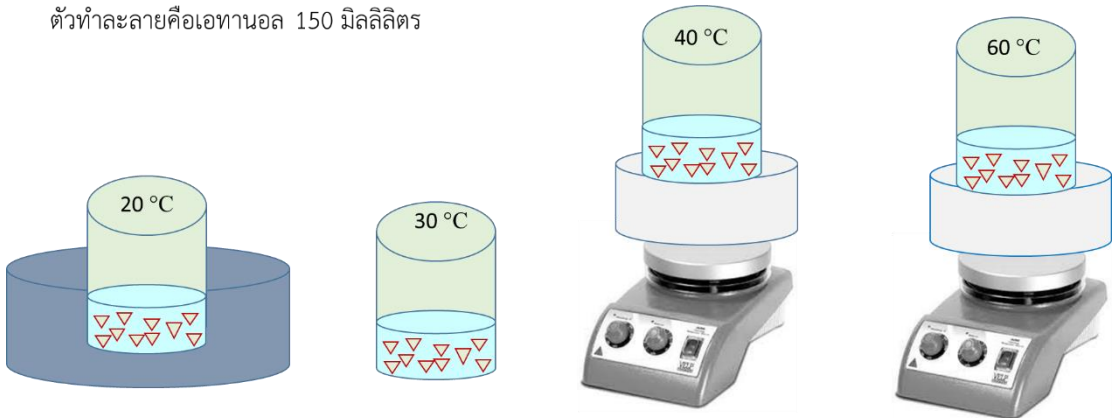
ซึ่งเปลือกมะพร้าวสดที่สับละเอียดแล้วจำนวน 10 กรัม ใส่ในขวดแก้วมีฝาปิด กรณีเปลือกมะพร้าวแห้งให้ชั่งจำนวน 5 กรัม จากนั้นเติมตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด (เอทานอล หรือ เมทานอล) อย่างละ 150 มิลลิลิตร แล้วทดลองสกัดที่เวลา สองชั่วโมงที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 20, 30, 40 และ 60

ตัวทำละลายคือเมทานอล 150 มิลลิลิตร



องศาเซลเซียส ดังแผนภาพ

ตัวทำละลายคือเอทานอล 150 มิลลิลิตร



ภาพที่ 3.1 แสดงการสกัดด้วยตัวทำละลายสองชนิด เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

ซึ่งทำการทดลองเช่นเดียวกันในการสกัดแทนนินจากกาบมะพร้าวสด หลังจากสกัดเป็นเวลา 2 ชั่วโมงแล้ว ให้กรองเพื่อแยกเอาสารละลายออกมาและนำกาบมะพร้าวหลังการสกัดทิ้งไป นำสารที่กรองได้ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องกลั่นระเหยแบบหมุน (Rotary Evaporator) จนเกือบแห้ง นำไปละลายสารที่สกัดได้ด้วยตัวทำละลายจำนวน 3 มิลลิลิตร และดูดสารสกัดแทนนินเก็บใส่ vial เก็บไว้ทำการทดสอบต่อไป



ภาพที่ 3.2 แสดงการดูดสารสกัดเพื่อเก็บใส่ vial

3.3.3 การทดสอบคุณลักษณะของสารสกัดแทนนิน

การทดสอบคุณลักษณะของแทนนินทำได้หลายวิธี ดังนี้

1. การตรวจสอบ Hydrolysable tannin และ Condensed tannin ด้วย 1% FeCl_3

การตรวจสอบ Hydrolysable tannin และ Condensed tannin ด้วย 1% FeCl_3 ทำได้โดยการเตรียมสารละลาย 1% FeCl_3 โดยชั่ง 0.25 g ของ anhydrous FeCl_3 ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร จากนั้น นำสารสกัดแทนนินในตัวทำละลายจำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองและเติมน้ำลงไปจำนวน 2 มิลลิลิตร จากนั้นหยดสารละลาย 1% FeCl_3 ลงไปจำนวน 2 หยด สังเกตการเปลี่ยนแปลงและบันทึกผลการทดลอง

2. การตรวจสอบหมู่ฟังก์ชันด้วย IR spectrometry

การตรวจสอบสามารถทำได้โดยนำสารสกัดแทนนินไปผสมกับ KBr จากนั้นนำไปวัดด้วยเครื่อง IR spectrometer เทียบกับ Tannic acid

3.3.4 การตรวจสอบเชิงปริมาณ

การตรวจสอบเชิงปริมาณสารสกัดแทนนินสามารถทำได้โดยการวัดเทียบกับ Tannic acid แล้วนำมาหา % Tannic acid โดยใช้เครื่อง UV-vis spectrometer โดยมีวิธีการเตรียมสารดังนี้

การเตรียมสารละลาย 2.5 %g/v KIO_3 โดยชั่ง KIO_3 2.5 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 100 มิลลิลิตร

สารสกัดแทนนิน จำนวน 1 มิลลิลิตร นำมาเจือจางด้วยตัวทำละลาย 5 เท่า จากนั้นนำไปผสมกับ 2.5 %g/v KIO_3 จำนวน 5 มิลลิลิตร จะได้สารละลายสีแดง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 nm จากนั้นสารละลายจะเริ่มเปลี่ยนเป็นสีเหลือง โดยเทียบกับสารละลายมาตรฐานกรดแทนนิก

การเตรียมสารละลาย Stock solution ของ 5000 mg L⁻¹ โดยละลายกรดแทนนิก 0.25 กรัม ในตัวทำละลาย 50 mL โดยเตรียมสารละลายที่ประกอบด้วยสารละลายมาตรฐานกรดแทนนิก 0, 100, 200, 400, 600, 800 and 1000 mg L⁻¹ แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงเพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน