บทที่ 2
การทดลอง

2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องกาซโครมาโตกราฟี

   - Perkin-Elmer gas chromatograph F17
   - Shimadzu gAs chromatograph 9A with chromatopac C-R3A

2. เครื่องกาซโครมาโตกราฟี-แมสสเปคโตรเมตรี

   (GC) Hewlet packard Model 5790 A

   (MS) JEOL-DX 300

   (Data treatment system) JEOL JAM-DA 5000

3. เครื่องมือสกัดแบบกลั่น และสกัดพร้อมกัน (Simultaneous steam distillation and extraction)

2.2 สารเคมีที่ใช้

1. กาซไนโตรเจนบริสุทธิ์
2. Diethyl ether Zur Analyse $(C_2H_5)_2O$ บริษัท E.Merck
3. Sodium Sulphate Anhydrous Na_2SO_4 บริษัท E.Merck

2.3 วัตถุดิบที่ใช้ในการทดลอง

1. เมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.5 จากภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. วัสดุที่ใช้ในการหมักถั่วเหลือง

- กระสอบป่าน
- ใบตองกล้วย
- ใบตองเหียง
- ใบตองตึง

2.4 <u>วิธีการทดลอง</u>[5]

2.4.1 <u>การหมักถั่วเหลือง (ถั่วเน่า)</u>

นำเมล็ดถั่วเหลืองมาแยกสิ่งจือปนและสิ่งสกปรกออก

↓

ล้างน้ำ

↓

ต้มในน้ำเดือดประมาณ 4-5 ชั่วโมง

↓

นำถั่วต้มสุกยังร้อนอยู่มาหมักในวัสดุที่เตรียมไว้ปิดให้มิดชิดแล้วใส่ตะกร้าหรือเข่งหมักไว้ 3 วัน

↓

บดและห่อเป็นห่อเล็ก ๆ

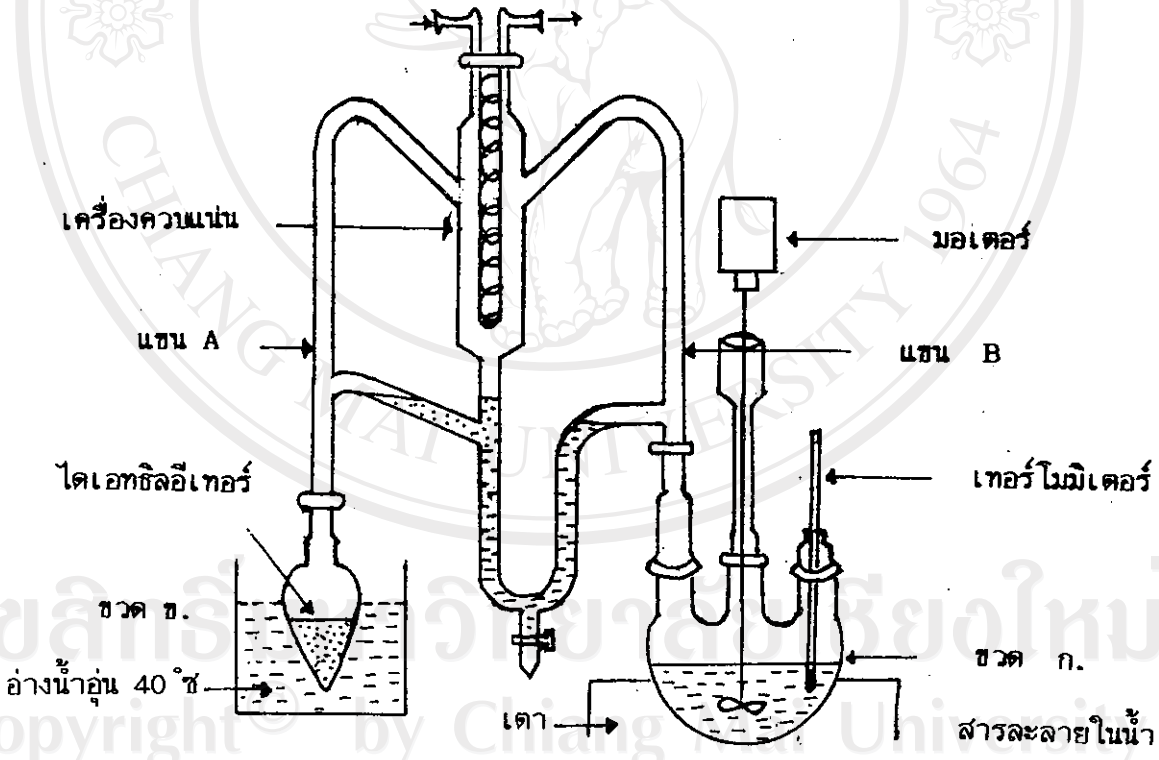
↓

นึ่งจะได้ถั่วเน่า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.4.2 <u>การสกัดแยกสารให้กลั่น</u>[9]

การสกัดแยกสารให้กลั่นถั่วเหลืองหมัก (ถั่วเน่า) ในงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้วิธีกลั่นโดยใช้เครื่องมือที่เรียกว่า Nickerson and Linkens apparatus สำหรับเครื่องมือในการกลั่นแบบนี้ได้ออกแบบโดย Nickerson and Likens หรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า เครื่องมือสกัดแบบกลั่น และสกัดพร้อมกัน (Simultaneous steam distillation and extraction apparatus) ดังแสดงในรูปที่ 2.1



<u>รูปที่ 2.1</u> แสดงเครื่องมือสกัดแบบกลั่นและสกัดพร้อมกัน (Simultaneous steam distillation and extraction apparatus)[9]

การทำงานของเครื่องมือจะมีรายละเอียดดังนี้ นำถั่วเหลืองหมัก (ถั่วเน่า) มาบดประมาณ 200 กรัม ละลายน้ำ 500 ซม^3 บรรจุลงในขวด ก. เมื่อให้ความร้อนและ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ปั่นสารในขวดกลั่นอย่างสม่ำเสมอจะทำให้สารให้กลิ่นระเหยเป็นไอออกมากับไอน้ำ ผ่านไปตามแขน B ของเครื่องมือไปยังเครื่องควบแน่น

ส่วนในขวด ข. จะบรรจุตัวทำละลายคือ ไดเอทธิลอีเทอร์ (diethyl ether) 50 ซม^3 จากนั้นทำให้ร้อนอย่างสม่ำเสมอที่อุณหภูมิ 40 °ซ ไอของไดเอทธิล-อีเทอร์จะผ่านไปตามแขน A ของเครื่องมือไปยังเครื่องควบแน่น แล้วไปรวมกับไอระเหยของสารให้กลิ่นซึ่งมาจากแขน B ในตอนต้น กลายเป็นของเหลวไหลผ่านลงมาส่วนล่าง และเกิดการแยกชั้นของน้ำ และตัวทำละลายที่มีสารให้กลิ่นละลายอยู่โดยตัวทำละลายอยู่ชั้นบน เมื่อล้นออกก็จะไหลกลับสู่ขวด ข. ตามเดิม ส่วนน้ำที่ล้นก็จะไหลกลับสู่ขวด ก. หมุนเวียนไปเรื่อย ๆ สารระเหยให้กลิ่นจะสะสมอยู่ในตัวทำละลายเมื่อเวลาผ่านไป 2 ชั่วโมง จึงนำถั่วเหลืองหมักจากขวด ก. ออกมาเททิ้ง แล้วนำถั่วเหลืองหมักที่เตรียมไว้เติมลงไปในขวด ก. อีกครั้งละ 200 กรัม ละลายในน้ำ 500 ซม^3 จนกระทั่งใช้ถั่วเหลืองหมักถึง 800 กรัม ก็จะได้สารให้กลิ่นเพียงพอที่จะนำไปวิเคราะห์

2.4.3 <u>การทำสารให้กลิ่นที่สกัดได้เข้มข้นขึ้น</u>[9]

จาก distillate ที่กลั่นได้ในข้อ 2.4.2 มาทำให้เข้มข้นขึ้น โดยนำ distillate ที่ได้แต่ละตัวอย่างมากำจัดน้ำซึ่งอาจเหลืออยู่ในชั้นของ diethyl ether ออกโดยเติม sodium sulphate anhydrous ประมาณ 2 ช้อน เบอร์ 2 เขย่าแล้วปล่อยให้ตกตะกอนจากนั้นก็เทสารละลายแยกออกจากตะกอน เพื่อที่จะเอาไปทำให้เข้มข้นโดยการไล่ Diethyl ether ออกอีกด้วยการเป่าด้วยกาซไนโตรเจน จนเหลือปริมาตรประมาณ 10 µl จากนั้นจึงนำไปศึกษาต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.4.4 <u>การศึกษาสารให้กลิ่นโดยวิธีกาซโครมาโตกราฟี</u> (Gas Chromatography)

นำสารสารละลายเข้มข้นที่ได้จากข้อ 2.4.3 มาศึกษาโดยการใช้สารแต่ละตัวอย่าง ๆ ละ 0.5 µl ฉีดเข้าเครื่องกาซโครมาโตกราฟีโดยตรง โดยมีเงื่อนไขการทดลองดังนี้

2.4.4.1 <u>เครื่องกาซโครมาโตกราฟี</u> Perkin-Elmer Gas Chromatograph F17

ใช้ระบบตรวจสอบเป็นแบบ flame ionization detector (FID) Column ที่ใช้คือ stainless steel ความยาว 175 ซม. บรรจุด้วย 10 % carbowax 20 M บน chromosorb W มีเงื่อนไขการทดลองคือ

Injection and Detector temperature	225 °ซ
Carrier gas	26 ปอนด์/ตารางนิ้ว
Air pressure	25 ปอนด์/ตารางนิ้ว
Hydrogen pressure	18 ปอนด์/ตารางนิ้ว
Program with initial	0 นาที
Rate	10 °ซ/นาที
Final Temperature	180 °ซ
Attenuator	128
Recorder chart speed	1 ซม./นาที
Range	1 มิลลิโวลต์ (mV)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.4.4.2 <u>เครื่องกาซโครมาโตกราฟี</u> GC 9A ของ **Shimadzu with Chromatopac C-R3A**

Column ที่ใช้ PEG 20 M 0.25 mm x 50 m FS-WCOT มีเงื่อนไขการทดลองดังนี้

Injection and detector temperature	200 °ซ
Program 60 °ซ (5 min hold)---------->	180 °ซ
Rate	2 °ซ/นาที

เมื่อได้โครมาโตแกรมจะสามารถหาเปอร์เซ็นต์สัมพัทธ์ของสารแต่ละตัวได้

2.4.5 <u>การศึกษาสารให้กลิ่นโดยวิธีกาซโครมาโตกราฟี-แมสสเปคโตรเมตรี</u> **(Gas chromatography-mass spectrometry)**

นำสารสารละลายเข้มข้นในข้อ 2.4.3 มาศึกษาโดยใช้สารแต่ตัวอย่าง ๆ ละ 0.5 µl ฉีดเข้าไปในเครื่อง GS-MS (GC) Hewlet packard 5790A Model (MS) JEOL-DX300 (Data Treatment system) JEOL JAM-DA 5000 โดยมีเงื่อนไขการทดลองดังนี้

Column PEG 20 M (J & W 10 DB-Wax 0.25 mm x 60 m FS-WCOT)

Injection temperature	200 °ซ
Program 60 °ซ (4 min hold) ---------->	180 °ซ
Rate	2 °ซ/นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved