บทที่ 2

การทดลอง

2.1 สารเคมีและวัสดุอุปกรณ์

2.1.1 สารเคมี

ชื่อสาร	บริษัทผู้ผลิต
Acetic acid (MW 60.05, d=1.05 kg/l)	Carlo Erba
Acetonitrile (HPLC grade)	Lab-Scan
Ammonium molybdate	BHD
Ammonium vanadate	Carlo Erba
L-Arabinose	Fluka
Boric acid	BHD
Cadmium nitrate solution (1,000 ppm)	Fluka
Copper sulfate anhydrous	Merck
Copper nitrate solution (1,000 ppm)	Fluka
3,5-Dimethylphenol	Acros Organics
Ethanol 95 %	Merck
D-Galactose	Merck
D-Glucose	Merck
D-Glucuronic acid	Fluka
Hydrochloric acid 37 % (MW 36.46, d=1.19 kg/l)	Merck
D-Mannose	Fluka
Lead nitrate solution (1,000 ppm)	Fluka
Magnesium nitrate solution (1,000 ppm)	Fluka

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อสาร	บริษัทผู้ผลิต
Manganese nitrate solution (1,000 ppm)	Spectosols
Methanol (HPLC grade)	Fisher
Methyl red	BDH
Nitric acid (MW 63.01, d=1.40 kg/l)	Merck
Phenolphthalein	Merck
Potassium bromide (IR grade)	BHD
Potassium chloride, 99.5%	Carlo Erba
Potassium hydrogen phthalate (MW 204.23), 99.5%	BDH
Potassium hydroxide (MW 56.11)	Merck, Lab-Scan
Potassium phosphate (MW 136.09), 99.5%	Carlo Erba
D-Rhamnose	Difco
Sodium chloride (MW 58.44)	BHD
Sodium chlorite	BHD
Sodium hydroxide (MW 40.00)	Merck
Sulfuric acid 98 % (MW 98.08 d=1.84 kg/l)	Merck
Toluene	Merck
D-Xylose	Fisher
Zinc nitrate solution (1,000 ppm)	BDH

2.1.2 อุปกรณ์

ชื่ออุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต
Atomic absorption spectrophotometer (AAS)	Jenway
Balance	Sartorlus
Blender	Philips
Centrifuge, model 6800	Kubota
Conductivity meter	Radiometer
Dialysis membrane	Spectrum Medical Industries
Flame photometer	Jenway

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่ออุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต
FT-IR Spectrometer, model 501	Nicolet
Freeze-dryer	Snijders
Heating mental	Electromentle
HPLC, model HP1100	Agilent Technology
- Column, Zorbax carbohydrate	Agilent Technology
- Column temperature controller	Waters
- Detector, Refractive index	Agilent Technology
Microwave solvent extractor, model Ethos	Milestone
Nylon filter membrane (0.2 และ 0.45 μm)	Aura Industries
Oven	Memmert
pH meter	Metrohm
Spectrophotometer 6400	Jenway
Tray-drier	ภาควิชาเคมี ม.ช.
Water bath	Ecotemp
X-Rite CDM	Cielab

2.1.3 วัตถุดิบ

เปลือกและเนื้อมะละกอดิบได้จากการปอกผลมะละกอดิบที่ซื้อมาจากตลาดโดยไม่เจาะจงสายพันธุ์ และได้จากร้านส้มตำอีกส่วนหนึ่ง

2.2 วิธีการทดลอง

2.2.1 การวิเคราะห์หาปริมาณสารต่างๆ ในเปลือกและเนื้อมะละกอ

การหาปริมาณสารต่างๆ ซึ่งได้แก่ โปรตีน ลิปิด ขี้เถ้า ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม และโลหะหนัก ทำเพื่อหาปริมาณสารซึ่งเป็นองค์ประกอบอื่นๆ ที่นอกเหนือจากส่วนของคาร์โบไฮเดรต (เฮมิเซลลูโลส เซลลูโลส เพกติน และแซ็กคาไรด์ต่างๆ) ในเปลือกและเนื้อมะละกอ ทำได้โดยการนำเปลือกและเนื้อมะละกออบแห้งมาสกัดแยกสารเหล่านี้ แล้วนำไปหาปริมาณด้วยวิธีต่างๆ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2.1.1 วิธีอบแห้งเปลือกและเนื้อมะละกอดิบ

นำเปลือกและเนื้อมะละกอดิบที่ถูกปอกเป็นแผ่นบางๆ วางบนตะแกรงอะลูมิเนียม เกลี่ยให้ทั่วแล้วนำไปอบในแบบ tray dryer ที่อุณหภูมิ 55°C เปลือกและเนื้อมะละกอที่แห้งแล้วจะมีลักษณะกรอบและแข็ง ชั่งน้ำหนักหลังอบ เก็บใส่ถุงพลาสติกและปิดปากถุงแล้วเก็บรักษาไว้ในตู้เย็น

2.2.1.2 วิธีวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Kjeldahl (AOAC, 2000)

ก. การหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

ปิเปตสารละลายมาตรฐาน Potassium hydrogen phthalate (KHP) 0.1000 โมลาร์ (KHP 5.1314 กรัม ละลายในน้ำให้ปริมาตรครบ 250 มล.) 20 มล ใส่ในขวด หยดเมธิลเรด (1% w/v ในเอธานอล) 2-3 หยด นำไปไทเทรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้นประมาณ 0.1 โมลาร์ (ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4.04 กรัม ในน้ำให้ปริมาตรครบ 1ลิตร) จนถึงจุดยุติซึ่งสารละลายเปลี่ยนจากสีชมพูเป็นสีเหลือง บันทึกปริมาตรสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ ทำการทดลองซ้ำอีก 2 ครั้ง

ข. การหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายกรดไฮโดรคลอริก

ปิเปตสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนแล้ว 20 มล ใส่ในขวด หยดสารละลายฟีนอล์ฟทาลีน (0.1% w/v ในเอธานอล) 2-3 หยด นำไปไทเทรตกับสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้นประมาณ 0.1 โมลาร์ (ผสมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 4.15 มล กับน้ำกลั่นให้ปริมาตรครบ 500 มล.) จนถึงจุดยุติซึ่งสารละลายเปลี่ยนจากสีชมพูเป็นไม่มีสี บันทึกปริมาตรสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ ทำการทดลองซ้ำอีก 2 ครั้ง

ค. วิธีหาปริมาณโปรตีน

ชั่งเปลือกหรือเนื้อมะละกอแห้ง 0.50 กรัม ใส่ในขวดก้นกลมที่มี boiling chip และ คอปเปอร์ซัลเฟต แอนไฮดรัส (copper sulfate anhydrous) 1.0 กรัม เติมสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 20 มล นำไปรีฟลักซ์ (reflux) จนได้สารละลายสีเขียวใส ทิ้งไว้ให้เย็นจึงเติมน้ำกลั่น 100 มล และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40 เปอร์เซ็นต์ 90 มล. นำไปกลั่นและผ่านก๊าซแอมโมเนียที่เกิดขึ้นจากการกลั่นลงในขวดรองรับที่มีสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.1 โมลาร์ 50 มล. ซึ่งมีเมธิลเรด 2-3 หยด กลั่นจนก๊าซแอมโมเนียหมด นำสารละลายกรดไฮโดรคลอริกหลังการกลั่น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ไปไทเทรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน และนำปริมาณที่ใช้ไปคำนวณหาปริมาณโปรตีน

2.2.1.3 วิธีวิเคราะห์หาปริมาณลิปิด

ชั่งเปลือกหรือเนื้อมะละกอ 15-20 กรัม ใส่ลงใน trimble วางใส่ใน Soxhlet ต่อกับขวดก้นกลมที่มีเฮกเซน 150 มล และ boiling chip 10-15 เม็ด นำไปรีฟลักซ์ 6 ชั่วโมง ตั้งไว้ให้เย็น เทสารละลายใส่ในบีกเกอร์ ล้างขวดก้นกลมด้วยเฮกเซนอีก 10 มล เทรวมลงในบีกเกอร์ ระเหยเฮกเซนจนเหลือแต่ลิปิดที่ไม่ระเหยอีกต่อไป นำไปชั่งน้ำหนัก

2.2.1.4 วิธีวิเคราะห์ปริมาณขี้เถ้า

ชั่งเปลือกหรือเนื้อมะละกอ 2 กรัม ใส่ในถ้วยกระเบื้องที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอน เผาที่ 150 °C จนเปลือกหรือเนื้อมะละกอเป็นสีดำ นำไปเผาต่อไปอีกในเตาเผาที่อุณหภูมิ 600°C จนเป็นขี้เถ้าสีขาวซึ่งใช้เวลาประมาณ 4 ชั่วโมง นำขี้เถ้าที่ได้ไปตั้งไว้ให้เย็นในเดสซิเคเตอร์แล้วชั่งหาน้ำหนักขี้เถ้าที่ได้

2.2.1.5 วิธีวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัส

การหาปริมาณฟอสฟอรัสทำโดยวิธี Spectrophotometric โดยวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 400 nm ของสารประกอบที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างฟอสฟอรัสกับสารละลายโมลิบโดวานาเดต (molybdovanadate) (AOAC, 1995)

ก. วิธีเตรียมสารละลาย

สารละลายโมลิบโดวานาเดต

ละลายแอมโมเนียมโมลิบเดต (ammonium molybdate) 60 กรัม ในน้ำร้อน 900 มล ตั้งไว้ให้เย็นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ชั่งแอมโมเนียมวานาเดต (ammonium vanadate) 1.5 กรัม ละลายในน้ำร้อน 690 มล และเติมกรดไนตริก 300 มล ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร เทสารละลายแอมโมเนียมโมลิบเดตลงไปผสมผสมกับสารละลายแอมโมเนียมวานาเดต แล้วคนให้เข้ากันและทิ้งไว้ให้เย็น ก่อนนำสารละลายโมลิบโดวานาเดตไปใช้

สารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต

อบโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 99.5 % ให้แห้งในตู้อบอุณหภูมิ 100°C จนได้น้ำหนักคงที่ ชั่งน้ำหนัก 0.2409 กรัม และละลายทันทีในน้ำกลั่นให้ปริมาตรครบ 250 มล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

สารละลายที่ได้นี้มีความเข้มข้นของ P_2O_5 0.50 มก /มล เจือจางให้ได้ความเข้มข้นของ P_2O_5 5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0, 30.0 และ 35.0 ไมโครกรัม /มล โดยใช้สารละลาย P_2O_5 0.50 มก/มล ปริมาตร 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 และ 7.0 มล มาเติมน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ครบ 100 มล ตามลำดับ

สารละลายจากเปลือกและเนื้อมะละกอ

ชั่งเปลือกหรือเนื้อมะละกอแห้ง 2 กรัม ใส่ในถ้วยกระเบื้อง นำไปเผาที่ 150°C จนเปลือกหรือเนื้อเป็นสีดำ จากนั้นเผาต่อไปในเตาเผาที่อุณหภูมิ 600°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำขี้เถ้าที่ได้ใส่ในบีกเกอร์ เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 3.1 โมลาร์ 10 มล แล้วระเหยให้แห้งในอ่างไอน้ำร้อน (steam bath) จากนั้นเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 1.25 โมลาร์ 10 มล ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำที่ปราศจากไอออนให้ครบ 100 มล. ถ้ามีตะกอนให้กรองด้วยกระดาษกรองแห้งเก็บสารละลายไปวิเคราะห์หาปริมาณฟอสฟอรัส

ข. วิธีวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัส

ใช้สารละลายมาตรฐานหรือสารละลายจากเปลือกหรือเนื้อมะละกอ 10 มล. ผสมกับสารละลายโมลิบโดวานาเดต 5 มล. ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 400 นาโนเมตร โดยใช้น้ำปราศจากไอออน 10 มล. ผสมกับสารละลายโมลิบโดวานาเดต 5 มล ปรับศูนย์

กราฟมาตรฐานเตรียมได้จากการใช้สารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมฟอสเฟตที่ความเข้มข้นฟอสฟอรัส 5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0, 30.0 และ 35.0 ไมโครกรัม /มล อย่างละ 10 มล ผสมกับสารละลายโมลิบโดวานาเดต 5 มล ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 400 นาโนเมตร

2.2.1.6 วิธีวิเคราะห์หาปริมาณโพแทสเซียม

ก. วิธีเตรียมสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมคลอไรด์

อบโพแทสเซียมคลอไรด์ 99.5% 100 มก ให้แห้งในตู้อบอุณหภูมิ 100°C จนได้น้ำหนักคงที่ ชั่งน้ำหนัก 1.9068 กรัม และละลายทันทีในน้ำกลั่นให้ปริมาตรครบ 1 ลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้นของโพแทสเซียม 1000 พีพีเอ็ม นำไปเจือจางเพื่อให้ได้สารละลายมาตรฐานที่มีโพแทสเซียมเข้มข้น 1, 2, 4, 6, 8 และ 10 พีพีเอ็ม นำไปวิเคราะห์หาค่าความเข้มของเปลวไฟด้วยเครื่อง Flame photometer เพื่อใช้ในการหาปริมาณโพแทสเซียมในสารตัวอย่าง โดยเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมกับค่าความเข้มของเปลวไฟ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ข. วิธีเตรียมสารละลายตัวอย่าง

ชั่งเปลือกหรือเนื้อมะละกอแห้ง 2 กรัม ใส่ในถ้วยกระเบื้อง นำไปเผาที่ 150°C จนเปลือกหรือเนื้อเป็นสีดำ จากนั้นเผาต่อไปในเตาเผาที่อุณหภูมิ 600°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำขี้เถ้าที่ได้ใส่ในบีกเกอร์ เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 3.1 โมลาร์ 10 มล แล้วระเหยให้แห้งในอ่างไอน้ำร้อน จากนั้นเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 1.25 โมลาร์ 10 มล ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำที่ปราศจากไอออนให้ครบ 100 มล. ถ้ามีตะกอนให้กรองด้วยกระดาษกรองแห้ง เก็บสารละลายไปวิเคราะห์ค่าการคายแสงของเปลวไฟจากการเผาไหม้โพแทสเซียมด้วยเครื่อง Flame photometer ใช้ค่าเฉลี่ยของค่าความเข้มของเปลวไฟของสารละลายตัวอย่าง 3 ครั้งไปคำนวณปริมาณโพแทสเซียม

2.2.1.7 วิธีวิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนักและแร่ธาตุธาตุบางชนิด (Laing *et al*., 2003)

โลหะหนักและแร่ธาตุที่วิเคราะห์ในที่นี้ ได้แก่ Cd^{2+}, Cu^{2+}, Pb^{2+}, Zn^{2+}, Mg^{2+} และ Mn^{2+}

การเตรียมกราฟมาตรฐาน

ใช้สารละลายเกลือมาตรฐานชนิดต่างๆ ซึ่งได้แก่ แคดเมียมไนเตรท คอปเปอร์ไนเตรท แมกนีเซียมไนเตรท แมงกานีสไนเตรท เลดไนเตรท และซิงค์ไนเตรท ความเข้มข้นเริ่มต้น 1000 พีพีเอ็ม ทุกชนิด เจือจางสารละลายเกลือมาตรฐานทุกชนิดเพื่อให้ได้สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 100 และ 10 พีพีเอ็ม แบ่งสารละลายนี้นำไปวิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนักด้วย AAS โดยใช้สารละลายเกลือแต่ละชนิด 3 ตัวอย่างๆ ละ 10 มล นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของเปลวไฟจากการเผาไหม้ของ Cd^{2+}, Cu^{2+}, Pb^{2+}, Zn^{2+}, Mg^{2+} และ Mn^{2+} ที่ความยาวคลื่น 228.8, 324.8, 283.3, 213.9, 285.2 และ 279.5นาโนเมตร ตามลำดับ

การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

ชั่งเปลือกหรือเนื้อมะละกอแห้ง 0.5 กรัม ใส่ในหลอดใส่สารตัวอย่าง เติมกรดไนตริกเข้มข้น 10 มล. ให้ความร้อนด้วยเครื่อง microwave solvent extraction ที่กำลังไฟ 1000 วัตต์ ที่ 120°C 10 นาที จากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นแล้วปรับปริมาตรเป็น 50 มล ด้วยน้ำที่ปราศจากไอออน กรองสารละลายตัวอย่างด้วยเมมเบรนไนลอนขนาดรูพรุน 0.45 μm ใช้สารละลายใสที่ได้จากการกรอง 3 ตัวอย่างๆ ละ 20 มล ไปวิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนักด้วย AAS โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของเปลวไฟที่ความยาวคลื่นต่างๆ ดังกล่าวข้างต้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2.2 วิธีแยกเฮมิเซลลูโลสจากเปลือกและเนื้อมะละกอธรรมชาติ

การแยกเฮมิเซลลูโลสจากเปลือกและเนื้อมะละกอมีวิธีการทำดังแผนผังในรูปที่ 2.1 โดยเริ่มจากการแยกเอารงควัตถุและองค์ประกอบอื่นๆ ที่ละลายน้ำได้ของเซลล์ออกไปโดยใช้การล้างด้วยเอธานอลร้อน กากที่ได้จากเปลือกและเนื้อส่วนนี้เมื่ออบแห้งแล้วเรียกว่า Alcohol Insoluble Solid (AIS) จากนั้นใช้ AIS ของเปลือกหรือเนื้อส่วนหนึ่งไปสกัดเฮมิเซลลูโลสโดยตรงด้วยสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ และอีกส่วนหนึ่งนำไปสกัดแยกเพกตินออกด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกก่อนที่จะสกัดเฮมิเซลลูโลสด้วยสารละลายด่าง สารละลายเฮมิเซลลูโลสในด่างที่สกัดได้นี้ถูกนำไปปรับพีเอชให้เป็นกลาง และแยกไอออนต่างๆ ออกด้วยไดอะไลซิส (dialysis) ก่อนทำแห้งเฮมิเซลลูโลสด้วยการทำไลโอฟิไลเซชัน

ในกรณีของเปลือกมะละกอนั้น อีกส่วนหนึ่งได้ทดลองฟอกสีพร้อมกับสกัดองค์ประกอบต่างๆ ในเซลล์ที่ละลายน้ำออกไป ซึ่งทำให้ได้ AIS เพื่อนำไปสกัดแยกเฮมิเซลลูโลสต่อไป

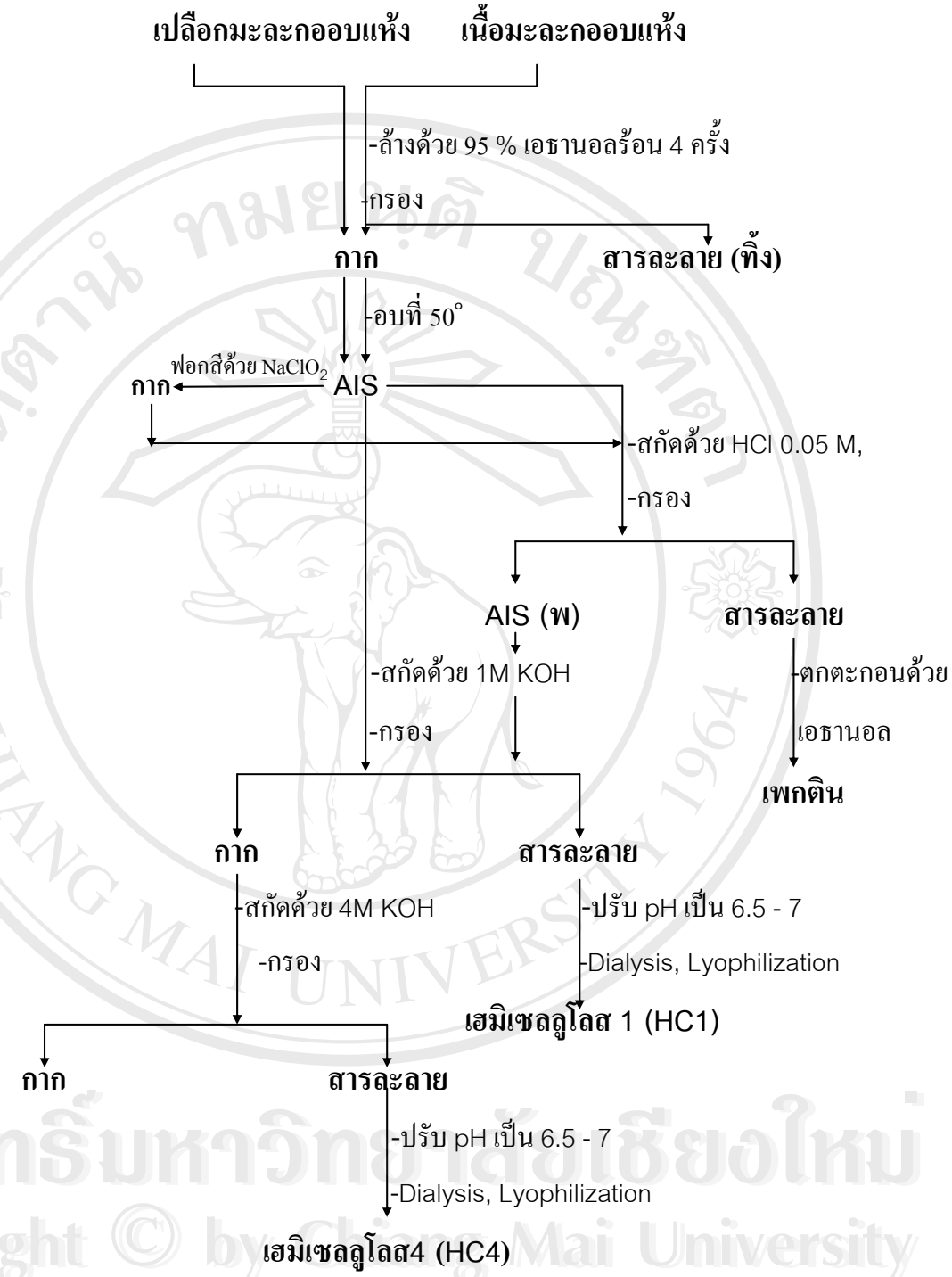
2.2.2.1 วิธีเตรียม Alcohol Insoluble Solid

บดเปลือกหรือเนื้อมะละกออบแห้งด้วยเครื่องปั่นและแบ่งมา 50 กรัม แช่ในเอธานอล 70 % 100 มล. เป็นเวลา 10 นาที ใช้ผ้าขาวบางกรองสารละลายทิ้งแล้วนำเปลือกหรือเนื้อไปต้มในเอธานอล 95 % 100 มล. เป็นเวลา 30 นาที กรองแยกกากไปต้มกับเอธานอลซ้ำอีก 2 ครั้ง แล้วล้างกากที่ได้ด้วยเอธานอล 70 % 50 มล. อีก 3 ครั้ง นำกากที่ได้ไปอบให้แห้งที่ 50 °C ชั่งน้ำหนักกากแห้งที่ได้ซึ่งในที่นี้เรียกกากส่วนนี้ว่า AIS

ก. วิธีแยกเฮมิเซลลูโลสจากเปลือกที่ผ่านการฟอกสี

เนื่องจากในเปลือกมะละกอประกอบด้วยคลอโรฟิลล์ซึ่งเป็นรงควัตถุที่มีสีเขียว ซึ่งทำให้เฮมิเซลลูโลสที่ได้จากเปลือกมะละกอมีสีเข้มกว่าเฮมิเซลลูโลสจากเนื้อมะละกอ ดังนั้นจึงได้ฟอกสีเปลือกมะละกอด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรท์ซึ่งเป็นสารที่ใช้ในการฟอกสีทั่วไป นอกจากนั้นลิกนินซึ่งเป็นส่วนประกอบหนึ่งในเปลือกผลไม้ต่างๆ จะถูกกำจัดออกไป พร้อมกันกับคลอโรฟิลล์ (Sun *et al*., 2001)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved



รูปที่ 2.1 แผนผังการสกัดเฮมิเซลลูโลสจากเปลือกและเนื้อมะละกอ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

AIS จากเปลือกแห้งบด 50 กรัม นำมาเติมสารละลายโซเดียมคลอไรท์ (ชั่งโซเดียมคลอไรท์ 15 กรัม ละลายในน้ำ 700 มล. เติมกรดอะซิติกเข้มข้นให้ได้พีเอช 4.2 และเติมน้ำให้ปริมาตรครบ 1 ลิตร) ปริมาตร 200 มล. แช่ในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 75 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมงและกวนสารผสมเป็นครั้งคราว จากนั้นกรองสารละลายทิ้ง ล้าง AIS จากเปลือกด้วยเอธานอล 70 % ปริมาตร 150 มล แล้วนำกาก AIS ที่ได้ไปสกัดเฮมิเซลลูโลสด้วยสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 1 และ 4 โมลาร์

ข. การแยกเพกตินออกจาก AIS

เนื่องจากเพกตินเป็นสารที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรม และมีอยู่ในเนื้อและเปลือกมะละกอ ดังนั้นจึงได้ทำการแยกเพกตินออกจาก AIS ก่อนนำไปแยกเฮมิเซลลูโลส ทั้งนี้เพื่อเพิ่มมูลค่าให้กับเปลือกและเนื้อมะละกอได้มากยิ่งขึ้น การแยกเฮมิเซลลูโลสจากเปลือกและเนื้อมะละกอที่แยกเพกติน ออกไปดังแสดงในรูป 2.1 ทำโดยวิธีที่ที่ดัดแปลงจากการสกัดเฮมิเซลลูโลสจากมะตูมญี่ปุ่น (Thomas และ Thibault, 2002)

ชั่ง AIS จากเปลือกหรือเนื้อมะละกอ 50 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ สกัดเพกตินออกจากเปลือกและเนื้อมะละกอโดยเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.05 โมลาร์ (กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 4 มล ผสมกับน้ำให้ปริมาตรครบ 1 ลิตร) ปริมาตร 200 มล. กวนสารผสมนี้ที่อุณหภูมิ 80-90 °C ประมาณ 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปรับพีเอชให้เป็น 5.5-6 ด้วยสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์ แล้วจึงกรองแยกสารละลายเพกตินออก กากที่ได้คือ **AIS(พ)**

2.2.2.2 วิธีแยกเฮมิเซลลูโลสด้วยสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์

ชั่ง AIS จากเปลือกหรือจากเนื้อมะละกอ 50 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ เติมสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์ ปริมาตร 200 มล. กวนสารละลายตลอด 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง กรองด้วยผ้าขาวบางและเก็บสารละลายเรียกสารละลายนี้ว่า **เฮมิเซลลูโลส 1 (**HC1**)** จากนั้นนำกากที่เหลือมาเติมสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 4 โมลาร์ ปริมาตร 200 มล กวนสารผสมตลอด 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง กรองแล้วเก็บสาระลายไว้เรียกส่วนสารละลายนี้ว่า **เฮมิเซลลูโลส 4 (**HC4**)** (เก็บกากที่เหลือจากการสกัดซึ่งคาดว่าเป็นส่วนของเซลลูโลสนำไปล้างด้วยน้ำจนค่าพีเอชเป็นกลาง ล้างด้วยเอธานอล 70 % ครั้งละ 50 มล 3 ครั้ง แล้วนำไปอบที่ 50 °C ชั่งน้ำหนักเซลลูโลสที่แห้ง)

นำสารละลายเฮมิเซลลูโลสที่ได้จากการสกัดด้วยสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์มาเติมกรดไฮโดรคลอริก 6 โมลาร์ (กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 480 มล ผสมกับน้ำกลั่น 520 มล) ให้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

มีพีเอช อยู่ในช่วง 6.5-7 แยกตะกอนออกทิ้งด้วยเครื่องเหวี่ยง (centrifuge) ที่ 6000 x g จากนั้นแยกไอออนต่างๆ ในสารละลายออกไปด้วยการทำไดอะไลซิส โดยใช้ถุงเมมเบรนที่มี MW cut-off 6000-8000 แช่ถุงของสารละลายนี้ในน้ำกลั่นและกวนตลอดเวลา เปลี่ยนน้ำกลั่นทุกๆ 3 ชั่วโมง จนกระทั่งน้ำที่ถูกเปลี่ยนมีค่าการนำไฟฟ้าต่ำกว่า 3 microsemens (μS) นำสารละลายเฮมิเซลลูโลสในถุงไปทำให้แห้งด้วยการทำไลโอฟิไลเซชัน ซึ่งใช้เวลาประมาณ 48 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักเฮมิเซลลูโลสที่แห้ง

2.2.3 วิธีหาน้ำตาลองค์ประกอบของเฮมิเซลลูโลส

การหาน้ำตาลองค์ประกอบของเฮมิเซลลูโลสนั้นทำโดยการสลายเฮมิเซลลูโลสในสารละลายกรดที่อุณหภูมิสูง เพื่อแตกพันธะไกลโคไซด์ (glycosidic bond) ระหว่างน้ำตาลองค์ประกอบของเฮมิเซลลูโลส แล้ววิเคราะห์ชนิดและปริมาณของน้ำตาลองค์ประกอบของเฮมิเซลลูโลสด้วย HPLC และ colorimetry

2.2.3.1 การสลายเฮมิเซลลูโลสด้วยกรด (Mullin and Xu, 2000)

ชั่งเฮมิเซลลูโลสจากเปลือกหรือเนื้อมะละกอ 20 มก. ใส่ในขวด เติมกรดซัลฟิวริก 1 โมลาร์ (กรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5.3 มล. ผสมกับน้ำกลั่นให้ปริมาตรครบ 100 มล.) ปริมาตร 3 มล. ปิดฝาให้สนิท นำไปควบคุมอุณหภูมิที่ 97-100°C เป็นเวลา 5 ชั่วโมงโดยเขย่าทุกๆ 30 นาที จากนั้นทำให้เย็นและเจือจางด้วยน้ำกลั่น 9 มล. กรองสารละลายที่ได้ด้วยเมมเบรนที่มีขนาดรูพรุน 2 ไมโครเมตร และนำไปวิเคราะห์ ชนิดและปริมาณของน้ำตาลองค์ประกอบ

2.2.3.2 การวิเคราะห์น้ำตาลองค์ประกอบด้วย HPLC

การวิเคราะห์หาน้ำตาลองค์ประกอบของสารละลายที่ได้จากการสลายเฮมิเซลลูโลสด้วย HPLC ทำโดยใช้คอลัมน์ Zorbax carbohydrate ซึ่งควบคุมอุณหภูมิที่ 30°C และใช้สารละลายผสมของอะซิโตไนไตรล์และน้ำในอัตราส่วน 75 ต่อ 25 โดยปริมาตร เป็นตัวชะด้วยอัตราการไหล 1.4 มลต่อนาที ตรวจวัดน้ำตาลด้วย refractive index และใช้สารละลายตัวอย่าง 5 ไมโครลิตร

การเตรียมกราฟมาตรฐาน

ชั่งน้ำตาล อะราบิโนส กลูโคส กาแลคโตส แมนโนส ไซโลส และแรมโนส ชนิดละ 10 มก. ละลายในน้ำและปรับปริมาตรให้ครบ 10 มล จะได้สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 1 มก/มล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

จากนั้นเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมกับสารละลายตัวอย่างดังต่อไปนี้ แล้วใช้สารละลายมาตรฐานของน้ำตาลแต่ละชนิด 5 ไมโครลิตร ไปวิเคราะห์หาพื้นที่ใต้พีคของโครมาโตแกรมจาก HPLC ในสภาวะเดียวกับการวิเคราะห์สารตัวอย่าง

สารละลายมาตรฐานกลูโคส ใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 1 มก/มล ปริมาตร 0.0625, 0.125, 0.5, 1.0 และ 2.0 มล. เติมน้ำให้ปริมาตรครบ 10 มล ซึ่งทำให้ได้สารละลายกลูโคสเข้มข้น 6.25, 12.5, 50.0, 100.0 และ 200.0 ไมโครกรัม/มล. ตามลำดับ

สารละลายมาตรฐานกาแล็กโทส ใช้สารละลายน้ำตาลกาแล็กโทสความเข้มข้น 1 มก/มล ปริมาตร 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 และ 5.0 มล. เติมน้ำให้ปริมาตรครบ 10 มล ซึ่งทำให้ได้สารละลายกาแล็กโทสเข้มข้น 100, 125, 500, 1000 และ 2000 ไมโครกรัม/มล. ตามลำดับ

สารละลายมาตรฐานไซโลส ใช้สารละลายน้ำตาลไซโลสความเข้มข้น 1 มก/มล ปริมาตร 0.25, 0.5, 1.0 และ 2.0 มล เติมน้ำให้ปริมาตรครบ 10 มล ซึ่งทำให้ได้สารละลายไซโลสความเข้มข้น 25, 50, 100 และ 200 ไมโครกรัม/มล ตามลำดับ

สารละลายมาตรฐานแมนโนส และอะราบิโนส ใช้สารละลายน้ำตาลแมนโนส และอะราบิโนสความเข้มข้นชนิดละ 1 มก/มล ปริมาตร 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 และ 3.0 มล เติมน้ำให้ปริมาตรครบ 10 มล ซึ่งทำให้ได้สารละลายอะราบิโนสและแมนโนสความเข้มข้น 10, 50, 100, 200 และ 300 ไมโครกรัม/มล ตามลำดับ

สารละลายมาตรฐานแรมโนส ใช้สารละลายน้ำตาลแรมโนสความเข้มข้น 1 มก/มล ปริมาตร 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 มล เติมน้ำให้ปริมาตรครบ 10 มล ซึ่งทำให้ได้สารละลายไซโลสความเข้มข้น 50, 100, 150 และ 200 ไมโครกรัม/มล ตามลำดับ

2.2.3.3 วิธีวิเคราะห์กรดยูโรนิกโดย colorimetric method (Englyst *et al*., 1992)

ก. วิธีเตรียมสารละลาย

สารละลายโซเดียมคลอไรด์ เตรียมโดยผสมโซเดียมคลอไรด์ 2 กรัม และกรดบอริก 3 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้ปริมาตรครบ 100 มล

สารละลายละลาย 3, 5-ไดเมธิลฟีนอล เตรียมโดยละลาย 3, 5-ไดเมธิลฟีนอล 0.1 กรัม ในกรดอะซิติกเข้มข้น 95 มล. ปรับปริมาตรเป็น 100 มล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ข. วิธีวิเคราะห์ปริมาณกรดยูโรนิก

การเตรียมกราฟมาตรฐานกรดกลูคูโรนิก

ละลายกรดกลูคูโรนิก 50 มก ในกรดซัลฟิวริก 2 โมลาร์ (กรดซัลฟิวริกเข้มข้น 53.3 มล. ผสมกับน้ำกลั่นให้ปริมาตรครบ 1 ลิตร) ให้ปริมาตรครบ 100 มล ใส่สารละลายนี้ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 3.0 มล ลงในหลอดทดลองแล้วเติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรครบ 10 มล นำมาใส่ในหลอดทดลองหลอดละ 0.3 มล แล้วเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.3 มล และเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นปริมาตร 5 มล ผสมกันอย่างรวดเร็ว นำไปแช่ในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นทำให้เย็นและทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วเติมสารละลาย 3, 5-ไดเมธิลฟีนอล 0.2 มล. เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ประมาณ 10-15 นาที วัดผลต่างของค่าดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดกลูคูโรนิกที่ 400 และ 450 นาโนเมตร ปรับศูนย์โดยใช้กรดซัลฟิวริก 2 โมลาร์ 0.3 มล. แทนสารละลายมาตรฐานกรดกลูคูโรนิกแล้วทำตามวิธีการข้างต้น

การวิเคราะห์ปริมาณกรดยูโรนิกในสารตัวอย่าง

ใส่สารละลายเฮมิเซลลูโลสจากการสลายด้วยกรด 0.3 มล. ลงในหลอดทดลอง นำไปเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์และสารละลายต่างๆ เช่นเดียวกับการเตรียมกราฟมาตรฐาน ผลต่างของค่าดูดกลืนแสงที่ 400 และ 450 นาโนเมตร นำไปหาปริมาณกรดยูโรนิกในสารตัวอย่างโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

2.2.4 วิธีวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันที่สำคัญของเฮมิเซลลูโลสจากเปลือกและเนื้อมะละกอด้วย FT-IR

บดเฮมิเซลลูโลสจากเปลือกหรือเนื้อ 1 มก. ผสมกับโพแทสเซียมโบรไมด์ที่แห้ง (อบที่อุณหภูมิ 100°C จนได้น้ำหนักคงที่) 10 มก. ให้ละเอียดในโกร่งหินอ่อน อัดส่วนผสมนี้ให้เป็นแผ่นวงกลม (disc) ภายใต้ความดันประมาณ 10 บาร์ 30 วินาที นำแผ่นวงกลมของเฮมิเซลลูโลสไปวิเคราะห์หา IR spectrum ด้วยเครื่อง FT-IR spectrometer บ่งชี้ชนิดของหมู่ฟังก์ชันของเฮมิเซลลูโลสจาก IR spectrum โดยเทียบกับค่า wave number ของการ vibrate ของหมู่ฟังก์ชันต่างๆ กับตารางมาตรฐาน (ภาคผนวก)

2.2.5 วิธีวิเคราะห์ปริมาณความชื้นของเฮมิเซลลูโลส

ชั่งเฮมิเซลลูโลสจากเปลือกหรือเนื้อมะละกอ 30 มก ใส่ในขวดแก้วขนาด 3 มล. บันทึกน้ำหนักรวมเฮมิเซลลูโลสและขวด จากนั้นนำขวดเฮมิเซลลูโลสไปอบที่อุณหภูมิ 100°C เอาออกมา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ทุกๆ 1 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในเดสซิเคเตอร์ (desicator) ที่มีซิลิกาเจลสำหรับดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักหลังอบแล้วนำกลับไปอบใหม่จนกระทั่งได้น้ำหนักคงที่

2.2.6 วิธีวิเคราะห์หาปริมาณขี้เถ้าของเฮมิเซลลูโลส

ชั่งเฮมิเซลลูโลสจากเปลือกหรือเนื้อมะละกอ 30 มก ใส่ในถ้วยกระเบื้องที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอน เผาที่ 150°C จนเปลือกหรือเนื้อมะละกอเป็นสีดำ นำไปเผาต่อไปอีกในเตาเผาที่อุณหภูมิ 60°C จนเป็นขี้เถ้าสีขาวซึ่งใช้เวลาประมาณ 4 ชั่วโมง นำขี้เถ้าที่ได้ไปตั้งไว้ให้เย็นในเดสซิเคเตอร์แล้วชั่งหาน้ำหนักขี้เถ้าที่ได้

2.2.7 วิธีวิเคราะห์หาความเข้มสีของเฮมิเซลลูโลส

นำเฮมิเซลลูโลสที่แยกได้จากเปลือกหรือเนื้อมะละกอ 0.50 กรัม 3 ตัวอย่าง ไปอัดในพิมพ์รูปวงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 ซม. ของเครื่องวัดความเข้มสี แล้ววัดค่าความเข้มสีด้วยเครื่อง X-Rite CDM

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved