

การสกัดและวิเคราะห์สารเมแทบอลิซึม

วัตถุประสงค์ เพื่อให้นักศึกษาฝึกทักษะการสกัดสารสี และวิเคราะห์หาปริมาณสารสีที่ถูกต้อง
เนื้อหา

สารสีจากเชื้อราโมแนสคัส

สารสีที่ได้จากการหมักด้วยเชื้อราแดงโมแนสคัสเป็นสารเมแทบอลิโตนทุติยภูมิจำพวกโพลีไคไทด์ (Polyketides) ที่มีกลุ่ม Araphilone เป็นองค์ประกอบ และมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำหรือละลายน้ำได้น้อยมาก สารสีโมแนสคัสส่วนใหญ่ละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เมทานอล เอทานอล ไตคลอโรมีเทน สารสีมีความเสถียรสูงสามารถทนต่อความร้อนในระดับการฆ่าเชื้อได้ทนต่อค่าความเป็นกรด-ด่างที่เปลี่ยนแปลงได้ (ตั้งแต่ค่าความเป็นกรด-ด่างในระดับ 3-10) กลุ่มของสารสีโมแนสคัสสามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มตามสีที่ปรากฏ คือกลุ่มสารสีเหลือง กลุ่มสารสีส้ม และกลุ่มสารสีแดง โดยแต่ละกลุ่มสียังประกอบด้วยสารประกอบโพลีไคไทด์อย่างน้อย 2 ชนิดที่แตกต่างกันตามความยาวของโซ่อะลิฟาติก (วาฬิสา เมืองแมน และคน, 2558)

1. กลุ่มสารสีเหลือง

กลุ่มสารสีเหลืองสามารถดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร ส่วนใหญ่ประกอบด้วยโมแนสกิน (Monascin; $C_{21}H_{26}O_5$) และอังคาฟลาวิน (Ankaflavin; $C_{23}H_{30}O_5$)

2. กลุ่มสารสีส้ม

กลุ่มสารสีส้มสามารถดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร และมีโครงสร้างเป็นวงแหวน oko-lactone ส่วนใหญ่ประกอบด้วยรูบรพังตาติน (Rubrepunctatin; $C_{21}H_{22}O_5$) และโมแนสโครูบรามิน (Monascorahrain; $C_{23}H_{26}O_5$)

3. กลุ่มสารสีแดง

กลุ่มสารสีแดงสามารถดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร กลุ่มสารสีแดงนี้เป็น nitrogen-analog ของกลุ่มสารสี ส้ม ส่วนใหญ่ ประกอบด้วยรูบรพังตามีน (Rubropunctainine; $C_{27}H_{23}O_4$) และโมแนสโครูบรามิน (Monascorubramin; $C_{21}H_{27}O_4$)

การสกัดด้วยตัวทำละลาย

การสกัดด้วยตัวทำละลาย (solvent extraction) เป็นวิธีที่ใช้กันอย่างกว้างขวาง ในอุตสาหกรรม เช่น การสกัดน้ำมันพืชเพื่อใช้ประกอบอาหาร โดยนำวัตถุดิบมาจากเมล็ดของพืชชนิดต่าง ๆ ได้แก่ เมล็ดทานตะวัน ถั่วเหลือง ปาล์ม ถั่วลิสง ข้าวโพด เมล็ดบัว งา และรำข้าว ในการสกัด

น้ำมันพืชนิยมใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลาย หลังการสกัดจะได้สารละลายที่มีน้ำมันพืชละลายอยู่ในเฮกเซน จากนั้นนำไปกรองเอากากเมล็ดพืชออก แล้วนำสารละลายไปกลั่นแยกลำดับส่วนเพื่อแยกเฮกเซนจะได้น้ำมันพืช ซึ่งต้องนำไป ฟอกสี ดูดกลิ่น และกำจัดสารอื่น ๆ ออกก่อน จึงจะได้น้ำมันพืชสำหรับใช้ปรุงอาหาร ทั้งนี้การสกัดด้วยตัวทำละลาย เป็นวิธีการแยกสารที่ใช้มากในชีวิตประจำวัน เป็นการแยกสาร ที่ต้องการออกจากส่วนต่าง ๆ ของพืชหรือจากของผสมต้องเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารที่ต้องการ

ตัวอย่างการเตรียมเอทิลแอลกอฮอล์

หากต้องเตรียมเอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากเอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 95 ต้องปิเปตเอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 95 กี่ มิลลิลิตร และปิเปตน้ำกลั่นกี่มิลลิลิตร

วิธีคำนวณ

1. คำนวณเอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ ที่ใช้ในปริมาตร 5 มิลลิลิตร ดังนี้

สูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

โดย C_1 คือความเข้มข้นเอทิลแอลกอฮอล์ร้อยละ 95

V_1 คือปริมาตรของเอทิลแอลกอฮอล์ร้อยละ 95 (มิลลิลิตร)

C_2 คือความเข้มข้นเอทิลแอลกอฮอล์ร้อยละ 10

V_2 คือปริมาตรของเอทิลแอลกอฮอล์ร้อยละ 10 (มิลลิลิตร)

คำนวณ $95 \times V_1 = 10 \times 5$

$$V_1 = \frac{10 \times 5}{95}$$

$$V_1 = 0.53 \quad \text{มิลลิลิตร}$$

2. คำนวณหาปริมาณน้ำที่ใช้ $= 5 - 0.53 = 4.47$ มิลลิลิตร

ดังนั้น ต้องปิเปตน้ำกลั่นปริมาตร 4.47 มิลลิลิตร และปิเปตเอทิลแอลกอฮอล์ร้อยละ 95 ปริมาตร 0.53 มิลลิลิตร

การคำนวณปริมาณสารสี

สูตร ปริมาณสารสี (OD unit/g) = $\frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสง (A)} \times \text{ค่าการเจือจาง}}{\text{น้ำหนักข้าวแดง (g)}}$

ตัวอย่างการคำนวณปริมาณสารสี

จงคำนวณปริมาณสารสีเหลือง สีส้มและสีแดง โดยค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 400 470 และ 500 นาโนเมตร เพื่อวัดสารสีเหลือง สีส้มและสีแดง เท่ากับ 0.54 0.55 และ 0.32 ตามลำดับ

การเจือจางตัวอย่าง คือปิเปตสารละลายส่วนในปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร และปิเปตน้ำกลั่น ปริมาตร 1.8 มิลลิลิตร ซึ่งเท่ากับ 10 เท่า

วิธีคำนวณ

$$\text{ปริมาณสารสี (OD unit/g)} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสง (A)} \times \text{ค่าการเจือจาง}}{\text{น้ำหนักข้าวแดง (g)}}$$

คำนวณ

$$\begin{aligned} \text{ปริมาณสารสีเหลือง} &= \frac{0.54 \times 10}{1.0023} \\ &= 5.39 \text{ OD unit/g} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{ปริมาณสารสีส้ม} &= \frac{0.55 \times 10}{1.0023} \\ &= 5.49 \text{ OD unit/g} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{ปริมาณสารสีแดง} &= \frac{0.32 \times 10}{1.0023} \\ &= 3.19 \text{ OD unit/g} \end{aligned}$$

ดังนั้น ปริมาณสารสีเหลือง สีส้มและสีแดงเท่ากับ 5.39 5.49 และ 3.19 OD unit/gds

อุปกรณ์/เครื่องมือ

1. ผงสีจากเชื้อรา *Monascus* sp. YRU01
2. เอทิลแอลกอฮอล์ 95-99%
3. ปิเปตขนาด 1 และ 10 มิลลิลิตร
4. หลอดเซนตริฟิวส์ขนาด 50 มิลลิลิตร
5. หลอดทดลองขนาด 20 มิลลิลิตร
6. ที่วางหลอดทดลอง (rack)
7. เครื่องเซนตริฟิวส์
8. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์
9. เครื่องเขย่า

10. Vortex
11. คิวเวต
12. จุกยางดูดตัวอย่าง
13. ปากกา label

การทดลองปฏิบัติการ

1. คำนวณปริมาตรเอทิลแอลกอฮอล์และน้ำกลั่นสำหรับสกัดสารสี โดยใช้ความเข้มข้นเอทิลแอลกอฮอล์เท่ากับร้อยละ 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 และ 90
2. เขียนฉลาก ได้แก่ ชื่อกลุ่ม ความเข้มข้นของเอทิลแอลกอฮอล์ วันเดือนปี บนหลอดเซนตริฟิวส์
3. ชั่งผงสีให้ได้ปริมาณ 1 กรัม ลงในหลอดเซนตริฟิวส์ บันทึกน้ำหนัก
4. ปิเปตเอทิลแอลกอฮอล์และน้ำกลั่นตามการคำนวณลงในหลอดเซนตริฟิวส์ข้างต้น โดยปริมาตรรวมเท่ากับ 5 มิลลิลิตร
5. นำไป vortex เป็นเวลา 30 นาที ทุก 10 นาทีพัก
6. ค่อยๆ รินส่วนใสลงในหลอดเซนตริฟิวส์หลอดใหม่
7. ปิเปตสารละลายส่วนใสปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองจำนวน 3 หลอด จากนั้นปิเปตน้ำกลั่นปริมาตร 1.8 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex
8. นำตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 400, 470 และ 500 นาโนเมตร เพื่อวัดสารสีเหลือง สีส้มและสีแดง ตามลำดับ
9. คำนวณปริมาณสารสีแต่ละสี และบันทึกผลการทดลอง

รายงานปฏิบัติการ

วันที่ทำการทดลอง.....

กลุ่มที่.....หมู่เรียนที่.....

ชื่อ-สกุล รหัส.....

บันทึกผลการทดลองและตอบคำถามต่อไปนี้

1. จงคำนวณหาปริมาตรเอทิลแอลกอฮอล์และน้ำกลั่นสำหรับสกัดสารสี
2. จงคำนวณหาปริมาณสารสีแต่ละค่าสี

บันทึกผลการทดลอง

ตารางที่ 1 ผลของความเข้มข้นของเอทิลแอลกอฮอล์

เอทิลแอลกอฮอล์ (%)	ค่าดูดกลืนแสง ของสีเหลือง (OD400)	ค่าเฉลี่ยค่าดูด กลืนแสงของสี เหลือง (OD400)	ค่าสีเหลือง (OD unit/g)	ค่าเฉลี่ยค่าสี เหลือง (OD unit/g)
เอทิลแอลกอฮอล์ (%)	ค่าดูดกลืนแสง ของสีส้ม (OD470)	ค่าเฉลี่ยค่าดูด กลืนแสงของสีส้ม (OD470)	ค่าสีส้ม (OD unit/g)	ค่าเฉลี่ยค่าสีส้ม (OD unit/g)
เอทิลแอลกอฮอล์ (%)	ค่าดูดกลืนแสง ของสีส้ม (OD470)	ค่าเฉลี่ยค่าดูด กลืนแสงของสีส้ม (OD470)	ค่าสีส้ม (OD unit/g)	ค่าเฉลี่ยค่าสีส้ม (OD unit/g)

สรุปผลการทดลอง
