บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 วัตถุดิบ สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 วัตถุดิบที่ใช้ในการทดลอง

- ใบชาสดจีนสด จากโครงการหลวงขุนวาง อำเภอแม่วาง จังหวัดเชียงใหม่
- ขมิ้นชันสด จากตลาดเมืองใหม่ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่

3.1.2 อุปกรณ์การผลิต

- เครื่องอบไมโครเวฟสุญญากาศ ผลิตโดยบริษัทมาร์ชคูล ประเทศไทย
- ตู้อบเบเกอรี่
- เครื่องผสมอาหารแบบสองแขน (double arm mixer, Thailand)
- ถาด
- ตะแกรง
- เครื่องชั่งสองตำแหน่ง (Sartorius, Italy)
- ที่ฝานผักผลไม้

3.1.3 อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ

- เครื่องวัดสี (Minolta Camera: ModelCR-310, Japan)
- ตู้อบลมร้อน (Memmert, Model : ULM500, Germany)
- เครื่องวัดค่าปริมาณน้ำอิสระ ยี่ห้อ (AQUA LAB, Model: series 3, USA)
- โถดูดความชื้น
- เครื่องชั่งสี่ตำแหน่ง (Sartorius, Model: CP224S, USA)
- ที่คีบกระป๋อง
- บีกเกอร์ ขนาด 50 ml

3.1.4 อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี

- เครื่องHPLC (Shimadzu, Model: FCV-10 ALVP, Japan)
- คอลัมน์HPLC (Column-HPLC) (Inertsil®ODS-3 (GL.Sciences), 5 μm 4.6 x 250 mm, Japan)
- เครื่อง UV/VIS Spectrometer (Perkin Elmer precisely, Model: Lambda 35, USA)
- เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator) (Büchi, Model: R-205, Switzerland)
- เครื่อง Freeze dry (LABCONCO Freeze dry sys/freezone®4.5, Model: 7751001, USA)

- เครื่องชั่งสี่ตำแหน่ง (Sartorius, Model: CP224S, USA)
- Cuvette Quartz
- ปิเปต
- บิวเรต
- ขวดรูปชมพู่ ขนาด 100 ml, 500 ml ,1000ml
- ขวดปรับปริมาตร ขนาด 100 ml, 500 ml ,1000ml
- บีกเกอร์ ขนาด 50 ml, 500 ml ,1000ml
- ขวดน้ำกลั่น
- กระดาษกรอง เบอร์ 4 (Whatman)
- กรวยกรอง
- แท่งแก้ว
- ตู้ดูดควัน
- กระบอกตวงขนาด 100 ml
- ลูกยางดูดสารเคมี

3.1.5สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

- สารมาตรฐาน curcumin (Fluka, India)
- สารมาตรฐาน EGCG (Sigma-Aldrich, Singapore)
- สารมาตรฐาน ECG (Sigma-Aldrich, Singapore)
- สารมาตรฐาน EC (Sigma-Aldrich, Singapore)
- Orthophosphoric acid ~85% (BDH Laboratory Supplies, England)
- Acetonitrile ยี่ห้อ LAB – SCAN (Analytical science, RCI, Thailand)
- Tetrahydrofuran (RCI Labscan Limited., Thailand)
- Methanol (RCI Labscan Limited., Thailand)
- 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl ($C_{18}H_{12}N_5O_6$) (Sigma life science จาก Sigma-Aldrich Pte. Ltd., Singapore)
- Folin – Ciocalteu's phenol reagent (MERCK, Darmstadt, Germany)
- Deionized water (RCI Labscan Limited., Thailand)

3.2 ขั้นตอนการทดลอง

3.2.1 ศึกษาคุณภาพทางกายภาพและทางเคมีของขมิ้นชันสด ได้แก่

- ค่าสี L, a*, b*
- ค่ากิจกรรมน้ำอิสระ (a_w)
- ความชื้น (AOAC, 2000)
- ปริมาณเถ้าทั้งหมด (AOAC, 2000)
- Antioxidant activity โดยวิธี DPPH assay ดัดแปลงวิธีจาก Masuda, 1999
- Total phenolic content โดยวิธี Folin –Ciocalten's colorimetric method ดัดแปลงวิธีจาก Ragazzi and Veronese,, 1973
- วิเคราะห์หาปริมาณ Cucumin ในขมิ้นชัน โดยใช้ Column C_{18} (250 X 4.6 mm.) reversed-phase Mobile phase เป็น 1% acetic acid : acetonitrile (45:55), UV detector วัดที่ λ = 425 nm, Injection 20μl flow rate 1.0 mL/min ดัดแปลงวิธีจาก ปรีชาและคณะ (2006)

3.2.2 ศึกษาคุณภาพทางกายภาพและทางเคมีของของใบชาสด ได้แก่

- ค่าสี L, a*, b*
- ค่ากิจกรรมน้ำอิสระ (a_w)
- ความชื้น (AOAC, 2000)
- ปริมาณเถ้าทั้งหมด (AOAC, 2000)
- Antioxidant activity โดยวิธี DPPH assay ดัดแปลงวิธีจาก Masuda, 1999
- Total phenolic content โดยวิธี Folin –Ciocalten's colorimetric method ดัดแปลงวิธีจาก Ragazzi and Veronese,, 1973
- วิเคราะห์หาปริมาณ Catechins ในชาเขียว โดยใช้ Column C_{18} (250 X 4.6 mm.) reversed-phase Mobile phase A ประกอบด้วย ร้อยละ0.2 (v/v) phosphoric acid ร้อยละ86.5 (v/v), acetonitrile ร้อยละ12 (v/v) และ tetrahydofuran ร้อยละ1.5 (v/v) และ Mobile phase B ประกอบด้วย ร้อยละ0.2 (v/v) phosphoric acid ร้อยละ73.5 (v/v), acetonitrile ร้อยละ 25 (v/v) และ tetrahydrofuran ร้อยละ 1.5 (v/v)ใช้เวลาทั้งหมด 90 นาที โดยเริ่มจาก mobile phase A ร้อยละ100 ที่เวลา 0-30 นาที จากนั้น mobile phase B จะเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 0 เป็นร้อยละ 100 ที่เวลา 31-40 นาที และที่เวลา 41-60 นาทีเป็น mobile phase B ร้อยละ 100 mobile phase B จะลดลงจากร้อยละ 100 เป็นร้อยละ 0 ที่เวลา 61-70 นาที และสุดท้ายเป็น mobile phase A ที่เวลา 71-90 นาที ฉีดตัวอย่าง

พร้อม internal satandard (4-amino salicylic acid) UV detector วัดที่ λ = 280 nm Injection 20μl flow rate 1.0 mL/min ดัดแปลงวิธีจาก Hirun and Roach (2011)

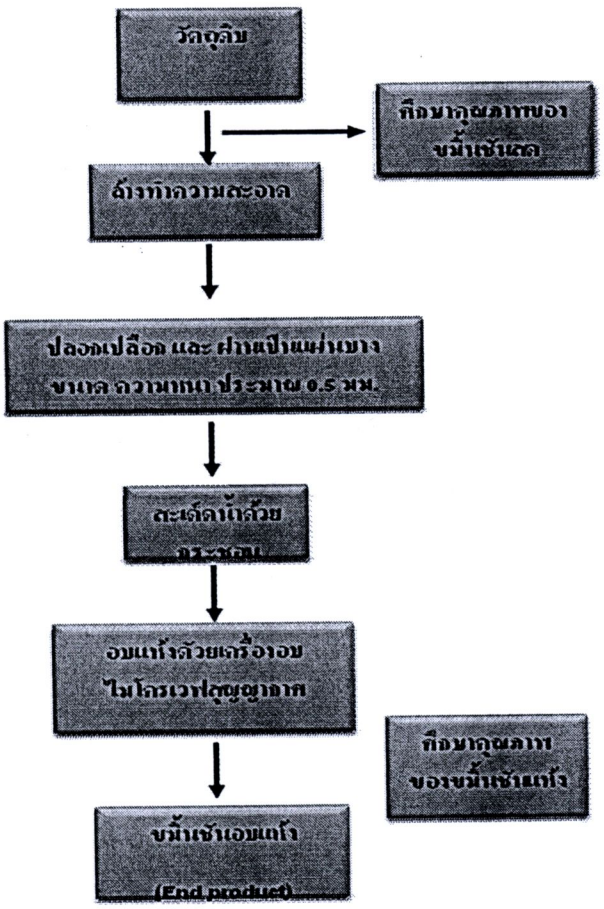
3.2.3 การพัฒนากรรมวิธีการทำแห้งสมุนไพรขมิ้นชัน โดยใช้เทคโนโลยีไมโครเวฟแบบสุญญากาศ

นำขมิ้นชันสดจากตลาดสด ในอำเภอเมืองจังหวัดเชียงมาล้างทำความสะอาดจากนั้นปอกเปลือกและฝานด้วยที่ฝานผลไม้ ขมิ้นชันที่ฝานแล้วจะมีความหนาประมาณ 0.5 มม. นำขมิ้นชันที่ฝานแล้วมาสะเด็ดน้ำให้แห้งด้วยกระชอน จากนั้นนำขมิ้นชัน 1 กิโลกรัม เขาตู้อบไมโครเวฟสุญญากาศโดยทำการผันแปรกำลังไมโครเวฟ ที่ระดับ 2400 – 4000 watt. และ เวลาการให้ความร้อน 10 - 30 นาที โดยวางแผนการทดลองแบบ Central Composite Design ประกอบด้วยสิ่งทดลอง 9 สิ่งทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 กำลังไฟ (X_1) ของตู้อบไมโครเวฟแบบสุญญากาศและเวลาที่ใช้ในการอบแห้ง (X_2) ขมิ้นชัน

หน่วยทดลองที่	X_1 (วัตถ์)	X_2 (นาที)
1	2400	10
2	2400	20
3	2400	30
4	3200	10
5	3200	20
6	3200	30
7	4000	10
8	4000	20
9	4000	30

* 3^2 Factorial Design with Central point was employed to design the experiment.



รูปที่ 3.1 กรรมวิธีการอบแห้งขมิ้นชัน

3.2.4 การตรวจสอบคุณภาพของขมิ้นชัน ที่ผ่านการทำแห้งโดยใช้เทคโนโลยีไมโครเวฟสุญญากาศ

ขมิ้นชันแห้งทุกสิ่งทดลองนำมาตรวจสอบคุณภาพกายภาพและทางเคมี ได้แก่

- ค่าสี L, a*, b*
- ค่ากิจกรรมน้ำอิสระ (a_w)
- ความชื้น (AOAC, 2000)
- ปริมาณเถ้าทั้งหมด (AOAC, 2000)

Antioxidant activity โดยวิธี DPPH assay ดัดแปลงวิธีจาก Masuda, 1999

- Total phenolic content โดยวิธี Folin –Ciocalten's colorimetric method ดัดแปลงวิธีจาก Ragazzi and Veronese, 1973
- ปริมาณสาร Cucumin ในขมิ้นชัน ปรีชาและคณะ (2006)

3.2.5 การพัฒนากรรมวิธีการทำแห้งชาเขียวโดยใช้เทคโนโลยีไมโครเวฟแบบสุญญากาศ

ใบชาจีนสดมาล้าง ทำความสะอาด จากนั้นชั่งใบชา 1 กิโลกรัมแล้วนำไปอบที่อุณหภูมิประมาณ 200 °C นานประมาณ 2 นาที ใบชาที่นึ่งแล้วจะถูกนำมานวดด้วยเครื่องผสมอาหารแบบสองแขน นานประมาณ 1 นาที นำไปอบแห้งด้วยเครื่องไมโครเวฟสุญญากาศโดยทำการผันแปรกำลังไมโครเวฟ ที่ระดับ 3200 – 4000 watt. และ เวลาการให้ความร้อน 20 - 30 นาที โดยวางแผนการทดลองแบบ Central Composite Design ประกอบด้วยสิ่งทดลอง 9 สิ่งทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 3.2

ตาราง 3.2 กำลังไฟ (X_1) ของตู้อบไมโครเวฟแบบสุญญากาศและเวลาที่ใช้ในการอบแห้ง (X_2) ชาเขียว

หน่วยทดลองที่	X_1 (วัตถ์)	X_2 (นาที)
1	3200	20
2	3200	25
3	3200	30
4	3600	20
5	3600	25
6	3600	30
7	4000	20
8	4000	25
9	4000	30

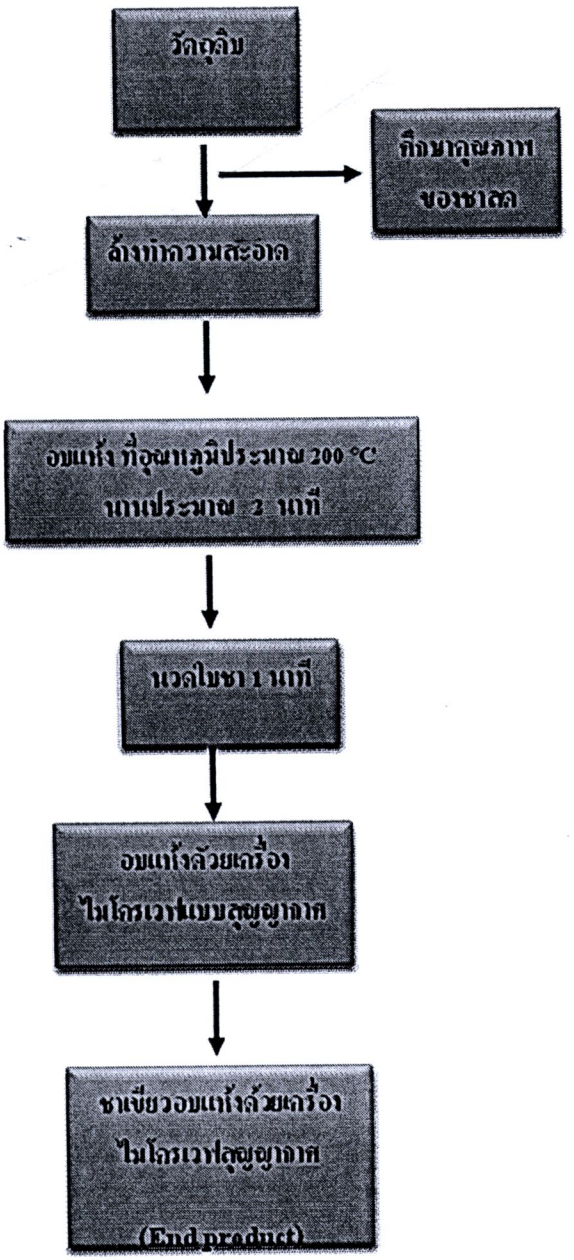
* 3^2 Factorial Design with Central point was employed to design the experiment.

3.2.6 การตรวจสอบคุณภาพของชาเขียว ที่ผ่านการทำแห้งโดยใช้เทคโนโลยีไมโครเวฟสุญญากาศ

ชาเขียวทุกสิ่งทดลองนำตรวจสอบคุณภาพกายภาพ และทางเคมี ได้แก่

- ค่าสี L, a*, b*
- ความชื้น (AOAC, 2000)
- ปริมาณเถ้าทั้งหมด (AOAC, 2000)

- Antioxidant activity โดยวิธี DPPH assay ดัดแปลงวิธีจาก Masuda, 1999
- Total phenolic content โดยวิธี Folin –Ciocalten's colorimetric method ดัดแปลงวิธีจาก Ragazzi and Veronese,, 1973
- วิเคราะห์หาปริมาณ Catechins ในชาเขียว Hirun and Roach (2011)



รูปที่ 3.2 แผนผังการผลิตชาเขียวอบแห้งด้วยเครื่องไมโครเวฟสุญญากาศ

3.2.7 การวิเคราะห์ทางสถิติ

จากแผนการทดลองแบบ Central Composite Design ประกอบ ด้วย 9 สิ่งทดลอง นำมาวิเคราะห์ Regression แบบ Quadratic model ดังสมการ

$$Y = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_{12} X_1 X_2 + b_{11} X_1^2 + b_{22} X_2^2$$

โดยที่ Y คือผลตอบสนอง ได้แก่ Yield ปริมาณ สารสำคัญในขมิ้นชันและชาเขียว

X_1, X_2 คือตัวแปรอิสระหรือปัจจัยที่ศึกษา คือ กำลังไมโครเวฟ และเวลา

b_0 คือค่าคงที่ของสมการ

b_1, b_2 คือสัมประสิทธิของ Linear effects

b_{11}, b_{22} คือสัมประสิทธิ์ของ Quadratic effects

b_{12} คือสัมประสิทธิ์ของ Interaction effect

จากโมเดลผลตอบสนองทั้งหมดจะทำ Response surface graphs เพื่อดูพื้นผิวตอบสนอง โดยใช้โปรแกรม Design- Expert Program (Design-Expert version 6.0.10, Stat-Ease Inc, MN) เพื่อหา Optimization ของค่าสูงสุดในแต่ละผลตอบสนอง ให้ได้สภาวะการทำแห้งด้วยไมโครเวฟที่เหมาะสม