

บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

3.1.1 วัตถุดิบ

มะระจีนลูกผสมพันธุ์เขียวหยก 16 (ผลิตโดยบริษัท East-West Seed CO,LTD. จังหวัดนนทบุรี) จากแปลงทดลองสถานีวิจัยเกษตรเขตชลประทานศูนย์วิจัยเพื่อเพิ่มผลผลิตทางเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3.1.2 สารเคมี

คาแรนทีน (charantin reference ; คุณ มลฤดี จันทร์ฉาย โครงการผลิตภัณฑ์สมุนไพร
คุณภาพ มหาวิทยาลัยมหิดล)

เอทานอล (95% Ethanol; Food grade, CM Chemical and Lab supplies, Thailand)

เมทานอล (CH_3OH ; Analytical reagent, Lab-Scan,Thailand)

กรดอะซิติก (glacial acetic acid; Analytical reagent, Lab-Scan,Thailand)

กรดซัลฟูริก (H_2SO_4 ; Analytical reagent, Lab-Scan,Thailand)

กรดฟอสฟอริก (H_3PO_4 ; Analytical reagent, J.T.Baker)

เฟอร์ริกคลอไรด์ ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; Analytical reagent, Merck, Germany)

คลอโรฟอร์ม (CHCl_3 ; Analytical reagent, Lab-Scan,Thailand)

3.1.3 วัสดุอุปกรณ์

เครื่องปั่นผสม (Blender, Imarflex : Model IF-308, Thailand)

เครื่องวัดค่า water activity (Aqualab : Model CX3TE, USA)

เครื่องวัดสี (Minolta chroma meter CR-300, Japan)

UV-Vis Spectrophotometer (Model V-530, Perkinelmer)

เตาอบลมร้อนแบบถาด (Tray dryer, Armfield Limited Ringwood, England)

เตาอบลมร้อนแบบถาด (Tray dryer, Model 160x180x200, Navaloy, Thailand)

เตาอบไมโครเวฟสุญญากาศแบบตั้งหมุน (Microwave-vacuum dryer : March Cool, Thailand)

3.2 วิธีการทดลอง

ตอนที่ 1 การศึกษาเพื่อหาระยะความแก่ของมะระจืดที่เหมาะสมต่อการสกัดสารคาเรนทิน

ศึกษาหาระยะความแก่ของมะระจืด 3 ระดับ คือ ผลมะระจืดอ่อน (มีอายุประมาณ 15 วัน หลังดอกบาน) มะระจืดแก่พอดี (มีอายุประมาณ 20 วัน หลังดอกบาน) และมะระจืดสุก (มีอายุประมาณ 25 วัน หลังดอกบาน) ซึ่งอายุการเก็บเกี่ยวของมะระจืดที่เหมาะสมต่อการเก็บเกี่ยวเพื่อนำไปจำหน่ายคือ 17 วัน หลังดอกบาน (กรมวิชาการเกษตร, 2550) ทำการทดลองดังนี้

วิธีการเก็บเกี่ยวมะระ

1. ตัดผลลูกดอกมะระจืดที่บ้านแล้วซึ่งจะมีสีเหลืองสด โดยเลือกดอกที่มีความสมบูรณ์ไม่โดนแมลงกัดกินและมีกลีบดอกครบ 5 กลีบ
2. เมื่อมะระจืดติดผลจนลูกโตยาวประมาณ 5 เซนติเมตร จะเริ่มห่อผลทันที โดยใช้กระดาษหนังสือพิมพ์ทำเป็นถุงขนาด 15×40 เซนติเมตร ปากถุงเปิดทั้งสองด้าน นำปากถุงด้านหนึ่งสวมผลมะระจืดแล้วใช้ที่เย็บกระดาษเย็บปากถุงให้แขวนอยู่บนก้านของผลมะระจืด การห่อผลจะช่วยไม่ให้มะระจืดถูกรบกวนจากแมลงศัตรูพืช
3. เมื่อผลมะระจืดมีอายุครบตามอายุที่กำหนดจะทำการเก็บเกี่ยวมะระจืด โดยทำการเก็บเกี่ยวในตอนเช้า ซึ่งในการเก็บเกี่ยวจะทำการเก็บเกี่ยวมะระจืดตามอายุที่กำหนด 2 ครั้ง (ทำการทดลองในช่วงเดือน สิงหาคม-ตุลาคม พ.ศ. 2549)
4. นำมะระจืดที่เก็บเกี่ยวแต่ละครั้งไปวิเคราะห์ปริมาณคาเรนทินด้วยเทคนิค HPLC โดยทำการวัดค่า 2 ซ้ำเพื่อหาค่าเฉลี่ย

การเตรียมตัวอย่าง

1. นำมะระจืดมาล้างให้สะอาด ผ่าครึ่งตามยาว และเอาเมล็ดออก แล้วนำมาหั่นตามขวางหนา 2 ± 0.1 มิลลิเมตร
2. นำมะระจืดที่หั่นเรียบร้อยแล้ววางเรียงบนถาดของเตาอบลมร้อน แล้วอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมงติดต่อกัน (Batran, 2006) นำมะระจืดที่ทำแห้งแล้วทั้งหมดไปทำให้เป็นผงโดยใช้เครื่องปั่นผสม ปั่นที่ความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 10 นาที

การวิเคราะห์ปริมาณ charantin ด้วยเทคนิค HPLC

วิเคราะห์ปริมาณคาแรนทินในมะระจีนที่มีอายุการเก็บเกี่ยว 15 วัน 20 วัน และ 25 วัน หลังดอกบาน ด้วยเทคนิค HPLC โดยส่งสารตัวอย่าง (มะระจีนผง) ไปวิเคราะห์ที่โครงการผลิตภัณฑ์สมุนไพรคุณภาพ มหาวิทยาลัยมหิดล มีวิธีการวิเคราะห์ดังนี้

1. นำมะระจีนผง 1 กรัม เติมเอทานอล 95% ปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำไป sonicate เป็นเวลา 30 นาที นำสารละลายที่ได้ไปกรองผ่าน millipore membrane filter (0.45 ไมโครเมตร) จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC

2. วิเคราะห์ปริมาณคาแรนทิน ด้วยเทคนิค HPLC โดยใช้คอลัมน์ C-18 Hyperbon ระบบตัวชะ (mobile phase) คือ น้ำ:เมทานอล ในอัตราส่วน 100:2 ใช้ flow rate 1 มิลลิลิตรต่อนาที injection volume คือ 20 ไมโครลิตร และใช้ UV detector โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 204 นาโนเมตร (มลฤดี, 2545)

วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 2 ซ้ำ โดยทำการเก็บเกี่ยวมะระจีนตามอายุที่กำหนด 2 ครั้ง นำผลการทดลองได้ไปวิเคราะห์ ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test โดยใช้โปรแกรม SPSS version 10 เพื่อคัดเลือกระดับความแก่ของมะระจีนที่เหมาะสมต่อการสกัดสารคาแรนทิน

ตอนที่ 2 การศึกษาวิธีการทำแห้งมะระจีนที่เหมาะสมต่อการสกัดสารคาแรนทิน

การเตรียมวัตถุดิบ

1. นำมะระจีนที่มีความแก่ที่เหมาะสมที่สุดจากตอนที่ 1 มาล้างให้สะอาด ผ่าครึ่งตามยาว และเอาเมล็ดออก

2. หั่นมะระจีนตามขวางหนา 2 ± 0.1 มิลลิเมตร

2.1 การศึกษาหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำแห้งมะระจีนด้วยเตาอบลมร้อน

1. ศึกษาหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำแห้งมะระจีนด้วยเตาอบลมร้อน โดยใช้เตาอบลมร้อนแบบถาด tray dryer, Armfield Limited Ringwood, England (ภาคผนวกภาพ จ-1) ซึ่งเป็นเตาอบลมร้อนมีทิศทางการเคลื่อนที่ของลมร้อนแบบขนานกับชิ้นอาหาร สามารถบรรจุภาคสแตนเลสขนาด 0.184×0.270 เมตร สำหรับทำแห้งได้จำนวน 4 ถาด ทำการทดลองโดยวางเรียงมะระจีนที่หั่นเรียบร้อยแล้วในภาคสแตนเลส ขนาด 0.184×0.270 เมตรให้เต็มถาด จำนวน 4 ถาด อบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (มลฤดี, 2545) จนกระทั่งนำหนักตัวอย่างคงที่ในระหว่างการ

ทำแห้งจะทำการบันทึกน้ำหนักตัวอย่างทุกๆ 20 นาที จนกระทั่งน้ำหนักเริ่มคงที่ นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาปริมาณความชื้น สร้างกราฟการทำแห้งเพื่อหาเวลาที่ใช้ในการทำแห้งที่เหมาะสม และสร้างกราฟอัตราการแห้ง

2. นำมะระจีนที่หั่นเรียบร้อยแล้วไปทำแห้งด้วยเตาอบลมร้อน tray dryer, Navaloy, Thailand (ภาคผนวกภาพ จ-2) ซึ่งเป็นเตาอบลมร้อนที่มีขนาด $1.6 \times 1.8 \times 2.0$ เมตร สามารถบรรจุ ถาดสแตนเลสขนาด 0.48×0.88 เมตร สำหรับทำแห้งได้จำนวน 14 ถาด ทำแห้งมะระจีนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ตามเวลาที่ได้จากกราฟการทำแห้ง (5 ชั่วโมง) และนำมะระจีนที่ทำแห้งแล้วทั้งหมดไปทำให้เป็นผง โดยใช้เครื่องปั่นผสมปั่นที่ความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 10 นาที เพื่อใช้เป็นตัวอย่างในการวิเคราะห์

2.2 การศึกษาวิธีการทำแห้งมะระจีนด้วยเตาอบไมโครเวฟแบบสุญญากาศ

นำมะระจีนที่หั่นเรียบร้อยแล้ว (1 กิโลกรัม) ทำแห้งด้วยเตาอบไมโครเวฟแบบสุญญากาศ (ภาคผนวกภาพ จ-3) ซึ่งเป็นเตาอบไมโครเวฟแบบสุญญากาศแบบถังหมุน ประกอบด้วยถังอบสุญญากาศ ชุดคักจับไอน้ำ และปั๊มสุญญากาศ อบมะระจีนที่กำลังเครื่อง 2880 วัตต์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาอบต่อที่กำลังเครื่อง 1440 วัตต์ เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาอบต่อที่กำลังเครื่อง 960 วัตต์ เป็นเวลา 60 นาที ที่ความดัน 600 มิลลิเมตรปรอท รวมเวลาในการทำแห้งทั้งหมด 2 ชั่วโมง (ดัดแปลงจาก Cui และคณะ, 2004) โดยอุณหภูมิภายในเตาอบอยู่ในช่วง 29-35 องศาเซลเซียส ในระหว่างการทำแห้งจะทำการสุ่มเก็บตัวอย่างจำนวน 10 กรัม เพื่อนำไปหาความชื้นทุกๆ 30 นาที นำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟการทำแห้ง และนำมะระจีนที่ทำแห้งแล้วทั้งหมดไปทำให้เป็นผงโดยใช้เครื่องปั่นผสมปั่นที่ความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 10 นาที เพื่อใช้เป็นตัวอย่างในการวิเคราะห์

วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 2 ซ้ำ นำมะระจีนที่ได้จากการทำแห้งทั้ง 2 วิธี มาตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ ทางเคมี และคำนวณและค่าใช้จ่ายในการทำแห้ง (ตามวิธีการในภาคผนวก ก)

การวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ

- หาค่า A_w (Aqualab : Model CX3TE, USA)
- วัตต์ค่าสี L^* , a^* , b^* , C^* , Hue angle (Minolta chroma meter : Model CR-300, Japan)
- การคืนรูป (Planinic, 2005)

การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี

- หาปริมาณความชื้น (Hot air oven, AOAC 1998)
- หาปริมาณคาเรนทิน (HPLC, โครงการผลิตภัณฑ์สมุนไพรคุณภาพ มหาวิทยาลัยมหิดล; มลฤดี, 2545)

2.3 การคัดเลือกวิธีการทำแห้ง

นำผลการวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ ทางเคมี และค่าใช้จ่ายในการทำแห้งมาพิจารณาเปรียบเทียบโดยใช้โปรแกรม SPSS version 10 วิเคราะห์ ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test

ตอนที่ 3 การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารคาเรนทินจากมะระจีน

ปัจจัยที่ศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารคาเรนทิน คือ อุณหภูมิของเอธานอลที่ใช้ในการสกัด เวลาที่ใช้ในการสกัด และปริมาตรตัวทำละลาย (มิลลิลิตรต่อกรัมมะระจีนผง) วางแผนการทดลองแบบ CCD (central composite design) กำหนดระดับสูงต่ำของแต่ละปัจจัย โดยศึกษาการสกัดที่อุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียส (ดัดแปลงจาก Pitipanpong, 2007 และ Schugerl, 1994) เวลาในการสกัด 3-9 ชั่วโมง (ดัดแปลงจาก สายสุนีย์, 2539) และปริมาตรตัวทำละลาย 12-20 มิลลิลิตรต่อกรัมมะระจีนผง (ดัดแปลงจาก กฤษณา, 2540 และ สุรัตน์, 2522) ดังตาราง 3.1 และได้สิ่งทดลองดังตาราง 3.2

การเตรียมตัวอย่าง

1. นำมะระจีนที่มีความแก่ที่เหมาะสมที่สุดจากตอนที่ 1 มาล้างให้สะอาด ผ่าครึ่งตามยาว และเอาเมล็ดออก แล้วนำมาหั่นตามขวางหนา 2 ± 0.1 มิลลิเมตร
2. นำมะระจีนที่หั่นแล้วไปทำแห้งตามวิธีการที่ได้จากการทดลองตอนที่ 2 จากนั้นนำมะระจีนที่ทำแห้งแล้วทั้งหมดไปทำให้เป็นผงด้วยเครื่องปั่นผสมที่ความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 10 นาที

วิธีการสกัด

1. ชั่งมะระจีนผง 10 กรัมนำไปสกัดโดยใช้ soxhlet ด้วยเอธานอล 95% โดยนำมะระจีนผงที่ชั่งเรียบร้อยแล้วใส่ลงใน thimble และใส่ตัวทำละลายลงในขวดก้นกลม ที่มีช่องสำหรับเสียบเทอร์โมมิเตอร์ จากนั้นทำการประกอบชุดเครื่องมือ และสกัดสารคาเรนทินตามสภาวะที่กำหนด

โดยปริมาตรของตัวทำละลาย อุณหภูมิ และเวลาที่ใช้ในการสกัดกำหนดไว้ดังตาราง 3.1 และ 3.2 นำสารสกัดไปวัดค่าสี L^* , a^* , b^* , C^* และค่า Hue angle (ภาคผนวก ก) วัดตัวอย่างละ 2 ซ้ำ

2. นำสารสกัดที่ได้ในแต่ละสิ่งทดลอง ไปทำให้เข้มข้นให้เหลือตัวทำละลายน้อยที่สุดด้วย rotary evaporator จะได้สารสกัดหยาบ (crude extract)

3. นำสารสกัดหยาบที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ขึ้น เพื่อลดปริมาณสารที่เจือปนในตัวอย่างให้น้อยลง โดยเติมเมทานอล 50% ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในสารสกัดหยาบนำไป sonicate เป็นเวลา 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 6,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสทิ้งไป นำตะกอนที่ได้ผสมกับเมทานอล 70% ทำการทดลองซ้ำอีกครั้ง ซึ่งในขั้นตอนนี้จะเป็นการกำจัดน้ำตาลและคลอโรฟิลล์ออกจากตัวอย่างจากนั้นนำตะกอนที่ได้มาสกัดด้วยเฮกเซน ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไป sonicate เป็นเวลา 15 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 6,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เพื่อกำจัดสารไม่มีขั้วที่เจือปนอยู่ออกไป ซึ่ง Pitipanapong และคณะ (2007) รายงานว่าการทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีนี้จะไม่เกิดการสูญเสียสารคาเรนทินแต่อย่างใด นำตะกอนที่ได้มาละลายในสารละลายผสมของคลอโรฟอร์ม:เมทานอล(1:1) ปริมาตร 5 มิลลิลิตรปรับปริมาตรให้เป็น 20 มิลลิลิตรโดยใช้เมทานอล (มลฤดี, 2545)แล้วนำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณคาเรนทินด้วยเทคนิค spectro-photometry โดยใช้ $FeCl_3-H_2SO_4$ reaction (Henry, 1974) รายละเอียดดังภาคผนวก ก

เนื่องจากการวิเคราะห์ปริมาณคาเรนทินด้วยเทคนิค HPLC นั้นต้องส่งไปวิเคราะห์ที่โครงการผลิตภัณฑ์สมุนไพรคุณภาพ มหาวิทยาลัยมหิดลทำให้มีค่าใช้จ่ายสูง และในการทดลองนี้มีจำนวนตัวอย่างถึง 20 ตัวอย่าง ดังนั้นเพื่อเป็นการลดค่าใช้จ่ายจึงทำการวิเคราะห์ปริมาณคาเรนทินโดยใช้ $FeCl_3-H_2SO_4$ reaction แทน

ตาราง 3.1 ปัจจัยที่ศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารคาเรนทิน

ปัจจัย	ตัวแปร	ระดับ				
		-1.68	-1	0	1	1.68
อุณหภูมิเอทานอล (°C)	T	66.59	70	75	80	83.41
เวลา (ชั่วโมง)	t	0.95	3	6	9	11.05
ปริมาตรเอทานอล (ml)	V	9.27	12	16	20	22.73
ต่อมะระจีนผง 1 กรัม						

นำผลการวัดค่าสี (L^* , a^* , b^* , C^* และ Hue angle) และผลการวิเคราะห์ปริมาณคาเรนทินมาวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Design-Expert Version 6.0.2 เพื่อหาความสัมพันธ์

ของค่าตอบสนองกับปัจจัยต่างๆที่ทำการศึกษาและหาสภาวะในการสกัดที่เหมาะสมโดยใช้ response surface methodology เพื่อทำการคัดเลือกหาสภาวะในการสกัดที่เหมาะสมที่สุด ทำการทดลองซ้ำโดยใช้สภาวะการสกัดที่เหมาะสมที่สุดและนำสารสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณสารคาเรนทินด้วยเทคนิค HPLC (มลฤดี, 2545) อีกครั้ง โดยส่งวิเคราะห์ที่โครงการผลิตภัณฑ์สมุนไพรคุณภาพ มหาวิทยาลัยมหิดล

ตาราง 3.2 สิ่งทดลองของปัจจัยที่ศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารคาเรนทิน

สิ่งทดลอง	ระดับความแปรปรวน		
	อุณหภูมิ (T)	เวลา (t)	ปริมาตร (V)
1	70.00 (-1)	3.00 (-1)	12.00 (-1)
2	80.00 (-1)	3.00 (-1)	12.00 (-1)
3	70.00 (-1)	9.00 (1)	12.00 (-1)
4	80.00 (1)	9.00 (1)	12.00 (-1)
5	70.00 (-1)	3.00 (-1)	20.00 (1)
6	80.00 (1)	3.00 (-1)	20.00 (1)
7	70.00 (-1)	9.00 (1)	20.00 (1)
8	80.00 (1)	9.00 (1)	20.00 (1)
9	66.59 (-1.68)	6.00 (0)	16.00 (0)
10	83.41 (1.68)	6.00 (0)	16.00 (0)
11	75.00 (0)	0.95 (-1.68)	16.00 (0)
12	75.00 (0)	11.05 (1.68)	16.00 (0)
13	75.00 (0)	6.00 (0)	9.27 (-1.68)
14	75.00 (0)	6.00 (0)	22.73 (1.68)
15	75.00 (0)	6.00 (0)	16.00 (0)
16	75.00 (0)	6.00 (0)	16.00 (0)
17	75.00 (0)	6.00 (0)	16.00 (0)
18	75.00 (0)	6.00 (0)	16.00 (0)
19	75.00 (0)	6.00 (0)	16.00 (0)
20	75.00 (0)	6.00 (0)	16.00 (0)