บทที่ 3

การทดลอง

วัตถุดิบและสารเคมี

ขมิ้นชันสด	ซื้อจากตลาดคลองเตย กรุงเทพฯ ราคากิโลกรัมละ 30 บาท
น้ำตาลทรายขาว	Commercial Grade
เกลือโซเดียมคลอไรด์	A.R.
ผงเคอร์คูมินบริสุทธิ์	จากบริษัท Sigma จำกัด สำหรับทำ standard curve ของเคอร์คูมิน
อะซิโตน	A.R.
โทลูอีน	A.R.
เอธานอล 95%	Commercial Grade
กรดซิตริก	Commercial Grade

อุปกรณ์และเครื่องมือ

อุปกรณ์วิเคราะห์หาปริมาณความชื้นและสี (แสดงรูปในภาคผนวก ก-1 และ ก-2)

UV-VIS Spectrophotometer	Shimadzu UV 240
Tray Dryer	Kan HA-20
Shaking Water Bath	DT Hetotherm
Rotary Vacuum Evaporator	Heidolph VV 2000

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาชนะบรรจุ

ขวด vial ฝาเกลียว ขนาด 5 ml บริษัท วิทยาศรม จำกัด

การวิเคราะห์และทดสอบ

1. การวิเคราะห์องค์ประกอบในขมิ้น

1.1 วิเคราะห์ปริมาณความชื้นโดยวิธีการกลั่น ตาม มอก.890-2532 (23) รายละเอียดในภาคผนวก ก-1 พร้อมรูปอุปกรณ์วิเคราะห์หาปริมาณความชื้น

1.2 วิเคราะห์ปริมาณเคอร์คูมิน ตาม ASTA Analytical Method ปี 1968(24) รายละเอียดในภาคผนวก ก-2 พร้อมรูปอุปกรณ์ reflux หาปริมาณเคอร์คูมิน

1.3 วิเคราะห์ปริมาณแป้ง ใช้วิธี Acid hydrolysis โดยส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ที่กรมวิทยาศาสตร์บริการ กระทรวงวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการพลังงาน

2. การทดสอบเชิงคุณภาพของการเกิดสีน้ำตาลในขมิ้น

2.1 ทดสอบ Polyphenol Oxidase (PPO) Activity ในขมิ้น ตามวิธีของ Kader, 1984 (25) รายละเอียดในภาคผนวก ก-3

2.2 ทดสอบหา Phenolic Compounds ในขมิ้น ตามวิธีของ Kader, 1984 (25) รายละเอียดในภาคผนวก ก-3

3. การสร้าง Standard Curve ของเคอร์คูมินในตัวทำละลาย (26)

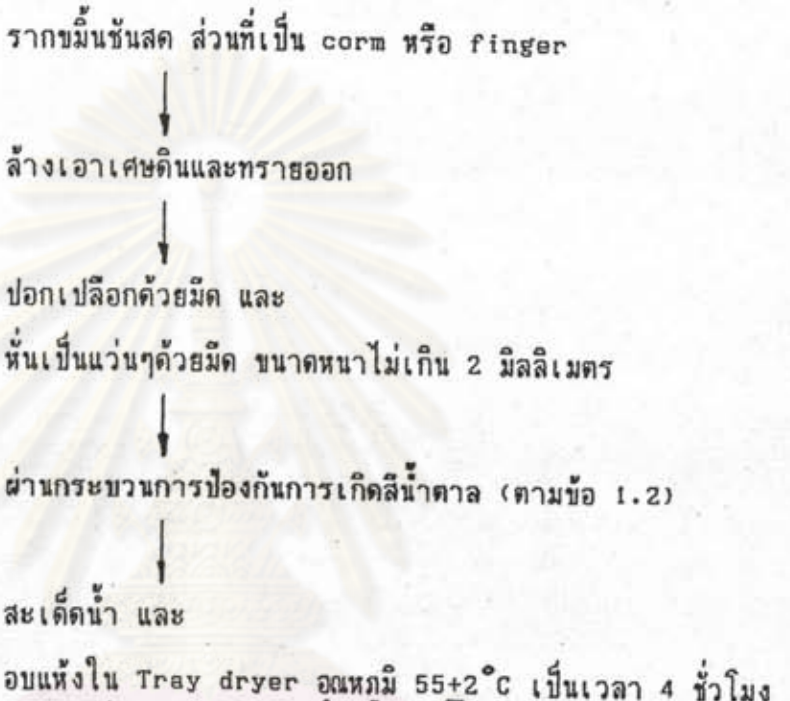
3.1 สร้าง Standard Curve ของเคอร์คูมินในอะซิโตน และเอธานอล ตามรายละเอียดในภาคผนวก ข-1

3.2 สร้าง Standard Curve ของเคอร์คูมินในน้ำเชื่อม น้ำเกลือ และน้ำกลั่น ตามรายละเอียดในภาคผนวก ข-1

ขั้นตอนการทดลอง

1. ศึกษากระบวนการที่ใช้ในการเตรียมวัตถุดิบ

1.1 ขั้นตอนในการผลิตขมิ้นชันแห้ง แสดงดังผังในรูปที่ 7



รูปที่ 7 ขั้นตอนการผลิตขมิ้นชันแห้ง

1.2 กระบวนการที่ใช้ในการป้องกันการเกิดสีน้ำตาลในขมิ้นชันแห้ง แบ่งเป็น 2 ส่วนใหญ่ๆคือ

1.2.1 หลังจากหั่นเป็นแว่นแล้ว นำไปแช่ในสารละลายกรดซิตริก 0.5% นานประมาณ 30 นาที แบ่งขมิ้นชันที่แช่สารละลายกรดซิตริกไว้ไปลวกในน้ำเดือดนาน 1, 3 และ 5 นาที เปรียบเทียบกับที่ไม่ได้ลวก

1.2.2 หลังจากหั่นเป็นแว่นแล้วนำไปแช่ในน้ำธรรมดา นานประมาณ 30 นาที แบ่งขมิ้นชันที่แช่น้ำไปลวกในน้ำเดือดนาน 1, 3 และ 5 นาที เปรียบเทียบกับที่ไม่ได้ลวก

ให้คะแนนโดยสังเกตสีน้ำตาลที่เกิดกับขมิ้นชันในกระบวนการดังกล่าว โดยให้เครื่องหมาย + สำหรับขมิ้นชันที่เกิดสีน้ำตาล และ 0 สำหรับขมิ้นชันที่ไม่เกิดสีน้ำตาล เลือกกระบวนการที่ทำให้ขมิ้นชันหลังอบแห้งแล้วเกิดสีน้ำตาลน้อยที่สุดสำหรับใช้ในการผลิตขมิ้นชันแห้งเพื่อเป็นวัตถุดิบของการสกัดสีเคอร์คูมินในขั้นตอนต่อไป เมื่อได้ขมิ้นชันแห้งแล้วนำไปบดจนมีขนาดอนุภาคที่ให้ประสิทธิภาพของการสกัดสีดีที่สุด ซึ่งจะได้ทำการศึกษาในขั้นตอนต่อไป แล้วจึงเก็บขมิ้นชันผงที่ได้รวมกันใน Eval film ซึ่งกันความชื้น และอากาศผ่านเข้าออก บรรจุและปิดผนึกในสุญญากาศ เมื่อต้องการใช้ขมิ้นชันผงจะดึงตัวอย่างออกมาแต่ละครั้งให้เพียงพอสำหรับใช้ในการสกัดสีแต่ละขั้นตอน

2. <u>ศึกษาผลของขนาดอนุภาคขมิ้นชันแห้ง</u> ทดลองสกัดสีจากขมิ้นชันแห้งที่ได้จากกระบวนการผลิตที่เลือกไว้ในข้อ 1 โดยขมิ้นชันแห้งที่ใช้มีความชื้น 10.99% และปริมาณเคอร์คูมิน 9.78% (dry basis) ใช้อัตราส่วนน้ำหนักขมิ้น(g) ต่อปริมาตรอะซิโตน(ml) เท่ากับ 1:100 ทำการสกัดสีด้วยอะซิโตนในขวดแก้วรูปชมพู่ แช่ใน shaking bath ที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ความเร็วรอบในการเขย่าขวดตัวอย่าง 125 รอบ/นาที

ตัวแปรที่ศึกษาคือขนาดอนุภาคขมิ้นชันแห้ง 2 ระดับคือ 25-50 เมช และมากกว่า 50 เมช วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design ทำการทดลอง 2 ซ้ำ ประเมินผลการทดลองโดยวิเคราะห์ปริมาณเคอร์คูมินใน extractive ต่อน้ำหนักแห้งของขมิ้นชัน 100 กรัม ซึ่งในการวิเคราะห์ปริมาณเคอร์คูมินในextractive สามารถทำได้โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของ extractive ที่สกัดได้ที่ความยาวคลื่นของการดูดกลืนแสงที่มากที่สุดของเคอร์คูมินในอะซิโตนคือ 420 nm (ภาคผนวก ข-1) เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ได้กับค่าที่หาได้ใน standard curve ของเคอร์คูมินในอะซิโตน แสดงในภาคผนวก ข-2 รูปที่ ข-2.2 จะได้ค่าความเข้มข้นของเคอร์คูมินใน extractive ที่สกัดได้ เลือกขนาดอนุภาคที่ให้ประสิทธิภาพของการสกัดดีที่สุด สำหรับใช้ในการหาสภาวะของการสกัดสีในขั้นตอนต่อไป

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. ศึกษาสภาวะของการสกัดสีเคอร์คูมินจากขมิ้นชันแห้ง ทดลองหาสภาวะของการสกัดสีจากขมิ้นชันโดยใช้ขมิ้นที่ได้จากกระบวนการผลิตที่เลือกไว้ในข้อ 1 และเลือกขนาดอนุภาคขมิ้นชันที่ให้ประสิทธิภาพการสกัดดีที่สุดจากข้อ 2 ขมิ้นที่ใช้มีปริมาณความชื้น 10.99% ปริมาณเคอร์คูมินในขมิ้น 16.69% (dry basis) ทำการสกัดโดยใช้อัตราส่วนน้ำหนักขมิ้น(g) ต่อปริมาตรตัวทำละลาย(ml) เท่ากับ 1:100 ความเร็วรอบในการเขย่าขวดตัวอย่าง 125 รอบ/นาที ตัวทำละลายที่ใช้มี 2 ชนิดคือ

3.1 เอธานอล 95% เป็นตัวทำละลายที่เลือกใช้สำหรับผลิตสารละลายสีเคอร์คูมินเข้มข้น ซึ่งทำการสกัดสีจากขมิ้นชันโดยวิธีการเขย่า ตัวแปรที่ศึกษาคือ อุณหภูมิในการสกัด 4 ระดับคือ 40, 50, 60 และ 70°C และระยะเวลาของการสกัด 4 ระดับคือ 1.5, 3.0, 4.5 และ 6.0 ชั่วโมง วางแผนการทดลองแบบ Symmetric Factorial Experiment ทำการทดลอง 2 ซ้ำ ประเมินผลการทดลองโดยวิเคราะห์ปริมาณเคอร์คูมินใน extractive ต่อน้ำหนักแห้งของขมิ้นชัน 100 กรัม ซึ่งในการวิเคราะห์ปริมาณเคอร์คูมินใน extractive สามารถทำได้โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของ extractive ที่สกัดได้ที่ความยาวคลื่นของการดูดกลืนแสงที่มากที่สุดของเคอร์คูมินในเอธานอล 95% คือ 425 nm (ภาคผนวก ข-1) เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ได้กับ standard curve ของเคอร์คูมินในเอธานอล 95% แสดงในภาคผนวก ข-2 รูปที่ ข-2.1 จะได้ค่าความเข้มข้นของเคอร์คูมินที่สกัดได้

3.2 อะซิโตน ทำการสกัดเคอร์คูมินด้วยตัวทำละลายนี้เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการสกัดเคอร์คูมินกับเอธานอล 95% ในวิธีการสกัดแบบเขย่า ตัวแปรที่ศึกษาคือ อุณหภูมิในการสกัด 2 ระดับคือ 45 และ 50°C เนื่องจากจุดเดือดของอะซิโตนเท่ากับ 56.5°C (13) อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดจึงต่ำกว่าเมื่อใช้เอธานอล 95% เป็นตัวทำละลาย และระยะเวลาของการสกัด 4 ระดับคือ 1.5, 3.0, 4.5 และ 6.0 ชั่วโมง ทำการทดลอง 2 ซ้ำ ประเมินผลการทดลองโดยวิเคราะห์ปริมาณเคอร์คูมินใน extractive ต่อน้ำหนักแห้งของขมิ้นชัน 100 กรัม ซึ่งการวิเคราะห์ปริมาณเคอร์คูมินใน extractive ทำในลักษณะเดียวกับการวิเคราะห์ปริมาณเคอร์คูมินในข้อ 2

เลือกสภาวะของการสกัดเคอร์คูมินด้วยอะซิโตนและเอธานอล 95% ที่ให้ประสิทธิภาพของการสกัดดีที่สุดสำหรับใช้ในการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการสกัดของตัวทำละลาย

2 ตัวนี้ และใช้สภาวะของการสกัดเคอร์คูมินด้วยเอธานอล 95% ที่ดีที่สุดสำหรับศึกษาหาอัตราส่วนน้ำหนักขมิ้นชันต่อปริมาตรของเอธานอล และจำนวนครั้งของการสกัดในขั้นตอนต่อไป

4. <u>ศึกษาหาอัตราส่วนน้ำหนักขมิ้นต่อปริมาตรตัวทำละลายและจำนวนครั้งการสกัด</u> ทำการทดลองโดยใช้ขมิ้นแห้งที่ได้จากกระบวนการผลิตที่เลือกไว้ในข้อ 1 และเลือกขนาดอนุภาคขมิ้นที่ให้ประสิทธิภาพการสกัดดีที่สุดจากข้อ 2 ขมิ้นที่ใช้มีปริมาณความชื้น 10.99% ปริมาณเคอร์คูมิน 13.57% (dry basis) ทำการสกัดโดยเลือกสภาวะที่เหมาะสมของการสกัดเคอร์คูมินด้วยเอธานอล 95% จากข้อ 3 ความเร็วรอบในการเขย่าขวดตัวอย่าง 125 รอบ/นาที

ตัวแปรที่ศึกษาคือ อัตราส่วนน้ำหนักขมิ้น(g)ต่อปริมาตรตัวทำละลาย(ml) 3 ระดับคือ 1:50, 1:100 และ1:150 และจำนวนครั้งของการสกัด 2 ระดับคือ 1 และ 2 ครั้ง วางแผนการทดลองแบบ Asymmetric Factorial Experiment ทำการทดลอง 2 ซ้ำ ประเมินผลการทดลองโดยใช้เกณฑ์การตัดสินดังนี้

1. วิเคราะห์ปริมาณเคอร์คูมินใน extractive ต่อน้ำหนักแห้งของขมิ้นชัน 100 กรัม เช่นเดียวกับที่อธิบายแล้วในข้อ 3.1

2. วิเคราะห์ปริมาณเคอร์คูมินใน extractive ต่อน้ำหนักแห้งของขมิ้นชัน 100 กรัมของการสกัดในครั้งที่ 2 ว่ามีปริมาณน้อยกว่าหรือเท่ากับ 10% ของปริมาณเคอร์คูมินใน extractiveที่ได้จากการสกัดรวม 2 ครั้งหรือไม่

3. ถ้าเป็นดังข้อ 2 จะวิเคราะห์ปริมาณเคอร์คูมินใน extractive ต่อน้ำหนักแห้งของขมิ้นชัน 100 กรัมของการสกัดครั้งที่ 1 เพียงอย่างเดียว เนื่องจากประสิทธิภาพการสกัดสีในครั้งที่ 2 จะต่ำมาก ไม่คุ้มกับค่าใช้จ่ายและเวลาที่เสียไป ดังนั้นการวิเคราะห์ผลทางสถิติจะเป็น Completely Randomized Design

5. <u>ศึกษาเสถียรภาพของเคอร์คูมินเข้มข้นที่ผลิตได้</u> ทำการผลิตสารละลายเคอร์คูมินเข้มข้นโดยใช้ขมิ้นชันผงที่ได้จากกระบวนการผลิตที่เลือกไว้ในข้อ 1 และเลือกขนาดอนุภาคขมิ้นที่ให้ประสิทธิภาพการสกัดดีที่สุดจากข้อ 2 ขมิ้นชันที่ใช้มีปริมาณความชื้น 10.99% ปริมาณเคอร์คูมิน 16.69% (dry basis) ทำการสกัดโดยเลือกอัตราส่วนน้ำหนักขมิ้นชัน(g)

ต่อปริมาตรของเอธานอล(ml) และจำนวนครั้งของการสกัดจากข้อ 4 และเลือกสภาวะที่เหมาะสมของการสกัดเคอร์คูมินด้วยเอธานอล 95% จากข้อ 3 ความเร็วรอบในการเขย่าขวดตัวอย่าง 125 รอบ/นาที จากนั้นกรองกากขมิ้นออกด้วยผ้ากรอง นำสารละลายที่ได้ไป centrifuge ที่ความเร็ว 6,000 รอบ/นาที เอาเฉพาะส่วนใส ทำให้เข้มข้นโดยการระเหยเอธานอลออก ด้วย rotary vacuum evaporator จนความเข้มข้นเพิ่มขึ้นประมาณ 10 เท่า รายละเอียดของอัตราเร็วในการทำให้เข้มข้น และyieldของการผลิตสารละลายสีเคอร์คูมินเข้มข้นแสดงในภาคผนวก ข-3 แบ่งสารละลายสีเคอร์คูมินเข้มข้นใส่ในขวด vial ขนาด 5 ml จนเต็มขวดปิดจุกให้แน่น เพื่อใช้ในการทดลองในข้อ 5.1 และ 5.2 ต่อไป

5.1 ศึกษาความสามารถในการทนความร้อนของสีเคอร์คูมินเข้มข้นในน้ำเชื่อม,น้ำเกลือ และน้ำกลั่น การศึกษาความสามารถในการทนความร้อนของสีเคอร์คูมินเข้มข้นในน้ำกลั่น เพื่อใช้เป็นตัวเปรียบเทียบกับความสามารถในการทนความร้อนของสีในน้ำเชื่อม 7% ซึ่งเป็นปริมาณน้ำตาลที่ใช้ในเครื่องดื่มน้ำอัดลมรสผลไม้ (27) และเปรียบเทียบกับความสามารถในการทนความร้อนของสีในน้ำเกลือ13% ซึ่งเป็นปริมาณเกลือในน้ำปรุงรสของ pickle (28)

5.1.1 ศึกษาความสามารถในการทนความร้อนของสีเคอร์คูมินเข้มข้นในน้ำเชื่อม 7% และน้ำกลั่น โดยผสมสีเคอร์คูมินเข้มข้นที่ได้จากการเตรียมในข้อ 5 ลงในน้ำเชื่อมในอัตราส่วนสี(ml)ต่อน้ำเชื่อม(l) เท่ากับ 1:50 ซึ่งเป็นอัตราส่วนของสีที่ให้สีเหลืองในระดับใกล้เคียงกับน้ำอัดลมยี่ห้อเมลโล่ กลิ่นแอปเปิ้ลเมื่อเปรียบเทียบด้วยสายตา และผสมสารละลายสีเคอร์คูมินเข้มข้นลงในน้ำกลั่นในอัตราส่วนเดียวกัน ใส่สารละลาย 15 ml ลงในหลอดทดลองขนาด 20 ml ปิดฝา ให้ความร้อนโดยแช่หลอดทดลองใน water bath ที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 1,3,5,7,9 และ 11 นาที วัดปริมาณเคอร์คูมินในน้ำเชื่อม และในน้ำกลั่น

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design ทำการทดลอง 2 ซ้ำ ประเมินผลการทดลองโดยวิเคราะห์ความเข้มข้นของเคอร์คูมินที่เหลือในสารละลาย โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของเคอร์คูมินในน้ำเชื่อม 7% และในน้ำกลั่น หลังจากผ่านความร้อนแล้วที่ความยาวคลื่นของการดูดกลืนแสงที่มากที่สุดคือ

425 nm เปรียบเทียบกับค่าที่หาได้ใน standard curve ของเคอร์คูมินในน้ำเชื่อม 7% และในน้ำกลั่น แสดงในภาคผนวก ข-2 รูปที่ ข-2.3 และ ข-2.5 จะได้ค่าความเข้มข้นของเคอร์คูมินที่เหลือในสารละลายดังกล่าว

5.1.2 ศึกษาความสามารถในการทนความร้อนของสีเคอร์คูมินเข้มข้นในน้ำเกลือ 13% และน้ำกลั่น โดยผสมสารละลายสีเคอร์คูมินเข้มข้นที่ได้จากการเตรียมในข้อ 5 ลงในน้ำเกลือในอัตราส่วนสีเคอร์คูมิน(ml) ต่อน้ำเกลือ(l) เท่ากับ 1:120 ซึ่งเป็นอัตราส่วนของสีที่ให้สีเหลืองในระดับใกล้เคียงกับน้ำปรุงรสในผลิตภัณฑ์ pickle ที่มีขายตามท้องตลาด เมื่อเปรียบเทียบด้วยสายตา และผสมสารละลายสีเคอร์คูมินเข้มข้นลงในน้ำกลั่นอัตราส่วนเดียวกับน้ำเกลือ ใส่สารละลายลงในหลอดทดลองเช่นเดียวกับที่ปฏิบัติในข้อ 5.1.1 ให้ความร้อนโดยแช่หลอดทดลองใน water bath ที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 1,3,5,7,9 และ 11 นาที วัดปริมาณเคอร์คูมินที่เหลือในน้ำเกลือ และน้ำกลั่น

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design ทำการทดลอง 2 ซ้ำ ประเมินผลการทดลองโดยวิเคราะห์ความเข้มข้นของเคอร์คูมินที่เหลือในสารละลาย โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของเคอร์คูมินในน้ำเกลือ 13% และในน้ำกลั่น หลังจากผ่านความร้อนแล้วที่ความยาวคลื่นของการดูดกลืนแสงที่มากที่สุดคือ 425 nm เปรียบเทียบกับค่าที่หาได้ใน standard curve ของเคอร์คูมินในน้ำเกลือ 13% และในน้ำกลั่น แสดงในภาคผนวก ข-2 รูปที่ ข-2.4 และ ข-2.5 จะได้ค่าความเข้มข้นของเคอร์คูมินที่เหลือในสารละลายดังกล่าว

5.2 ศึกษาเสถียรภาพในการเก็บรักษาสารละลายสีเคอร์คูมินเข้มข้น ตัวแปรที่ศึกษาคือ อุณหภูมิในการเก็บรักษา โดยสภาวะที่เก็บสารละลายสีเคอร์คูมินเข้มข้นจะไม่มีผลของแสงเข้าเกี่ยวข้อง เนื่องจากขวดที่ใช้เก็บสารละลายสีเคอร์คูมินเข้มข้นถูกปิดหุ้มด้วยกระดาษฟอยล์ แบ่งการทดลองเป็นดังนี้คือ

5.2.1 ศึกษาอายุการเก็บรักษาสารละลายสีเคอร์คูมินเข้มข้นที่เตรียมได้จากการเตรียมในข้อ 5 ตัวแปรที่ศึกษาคืออุณหภูมิในการเก็บรักษา 2 ระดับคือ อุณหภูมิห้อง และ10°C และระยะเวลาการเก็บรักษา 9 ระดับคือ 0, 14, 28, 42, 56, 70, 84, 98 และ 112 วัน วางแผนการทดลองแบบ Asymmetric Factorial

Experiment ทำการทดลอง 2 ซ้ำ วิเคราะห์และประเมินผลการทดลองโดยวัดปริมาณเคอร์คูมินที่เหลือในสารละลายเช่นเดียวกับการวิเคราะห์ความเข้มข้นของเคอร์คูมินในเอธานอล 95% ดังที่ได้อธิบายในข้อ 3

5.2.2 ศึกษาอายุการเก็บรักษาสารละลายสีเคอร์คูมินเข้มข้นที่เตรียมได้จากการผลิตในข้อ 5 เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 50°C แล้วสุ่มตัวอย่างเป็นระยะๆ วิเคราะห์หาความเข้มข้นของสารละลายสีเคอร์คูมินเข้มข้นในลักษณะเดียวกับการวิเคราะห์ความเข้มข้นของเคอร์คูมินในเอธานอล 95% ดังได้อธิบายแล้วในข้อ 3 และทำการเก็บสารละลายสีเคอร์คูมินเข้มข้นที่อุณหภูมินี้เพื่อใช้เป็นหลักอ้างอิง สำหรับการคาดคะเนระยะเวลาในการเก็บรักษาสีเคอร์คูมินเข้มข้น ทำการทดลอง 2 ซ้ำ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย