บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบ อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 วัตถุดิบ

พืชเจียวกู้หลานที่ใช้ในการวิจัยนี้ เป็นใบเจียวกู้หลานสดที่มีอายุการเก็บเกี่ยว 2 เดือนนับจากวันที่ปลูก จากโครงการหลวงแม่ทาเหนือ กิ่งอำเภอแม่ออน จังหวัดเชียงใหม่ โดยวัตถุดิบใบเจียวกู้หลานสดทำการเก็บเกี่ยวเฉพาะยอดและใบเท่านั้น ส่วนเถาคัดแยกออก เนื่องจากส่วนใบมีปริมาณสารสำคัญอยู่ในปริมาณสูง โดย He (1987) ทำการศึกษาปริมาณของสารจีเพนโนไซด์ทั้งหมดของใบ และลำต้นของเจียวกู้หลานที่พบในประเทศจีน พบว่า ในส่วนของใบมีปริมาณสารจีเพนโนไซด์ 6.65 % และในลำต้นมีปริมาณสารจีเพนโนไซด์เพียง 4.05 %

3.1.2 สารเคมี

1. เมทานอล (Methanol: CH_3OH, AR grade, Merck, England)
2. ไดเอทิลอีเทอร์ (Diethyl ether: $(C_2H_5)_2O$, AR grade, Lab scan, Ireland)
3. เอทานอล (Ethanol: C_2H_5OH, AR grade, Merck, England)
4. เอ็น-บิวทานอล (n-Buthanal: $CH_3(CH_2)_3$ OH, AR grade, Lab scan, Ireland)
5. เมทานอล (Methanol: CH_3OH, HPLC grade, Merck, England)
6. อะซีโตไนไตร์ (Acetronitrile: CH_3CN, HPLC grade, Merck, England)
7. สารมาตรฐาน Gypenoside Rb_1 (Wilshire technolodies, Inc Princeton, NJ)
8. กรดซิตริก (Citric acid : $C_6H_8O_7$, AR grade, APS Finechem, Australia)
9. ซูโครส (Sucrose: $C_{12}H_{22}O_{11}$, AR grade, Merck, England)
10. น้ำกลั่น (โพลสตาร์, เชียงใหม่ ประเทศไทย)
11. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide: NaOH, AR grade, Merck, England)
12. เกลือ (Sodium Chloride: NaCl, AR grade, Merck, England)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

13. เปปโตน (peptone: AR grade, Merck, England)

14. Total Plate Count Agar (AR grade, Merck, England)

15. Potato Dextrose Agar (PDA) (AR grade, Merck, England)

16. Yeast extract broth (YB) (AR grade, Merck, England)

17. กรดไนตริก (Nitric acid: LAB – SCAN, AR grade, Thailand)

18. กรดซัลฟิวริก (Sulfuric acid: LAB – SCAN, AR grade, Thailand)

19. สารละลายมาตรฐานตะกั่ว (Pb: (AR grade, Merck, Germany)

20. สารละลายมาตรฐานปรอท (Hg: (AR grade, Merck, Germany)

21. สารละลายมาตรฐานสารหนู (As: (AR grade, Merck, Germany)

22. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2: AR grade, Merck, England)

3.1.3 เครื่องมือ

1. เครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary Vacuum Evaporato, Büchi: V800, Swisserland)
2. เครื่อง Freeze-drier (Labconco, America)
3. ชุด Suctions pump
4. เครื่อง High Performance Liquid Chromatograph: HPLC (Shimudsu Kyoto ประกอบด้วย Column oven (CTO-10A vp). Degasser (DGU-14A), Pump (LC-10AD vp), Diode array detector (SPD-M 10A vp), System controller (SCL-10A vp), Pressure vale (FCV-10AL vp), Column Dimonsil 18, 5µm 250x4.6 mm.)
5. Heat reflux extraction
6. ตู้อบแห้งไมโครเวฟสุญญากาศ (March Cool Co., Thailand)
7. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven, Memmert: 400, Germany)
8. เครื่องแช่เยือกแข็ง (Freezer, Sanyo: SF-C992NG, Itary)
9. ตะแกรงร่อนขนาด 50 เมช (Sieve 50 mesh)
10. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Electronic analytical balance, Sartorius: A120S, Germany)
11. ตู้ดูดควัน (Hood, Toplab Design and Technology, England)
12. โถดูดความชื้น (Desiccator)
13. เตาไมโครเวฟ (Microwave oven, Sharp: R254, Thailand)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

14. ไมโครปิเปตต์ ขนาด 100-1,000 ไมโครลิตร (Micropipette, Wiggen hauser, Germany)

15. เครื่องกวนผสมแม่เหล็กไฟฟ้า (Hot plate and Megnatic stirrer, Whatman: HPMS, England)

16. เครื่องปั่น (Blender, Imarflex: IF-308, Thailand)

17. เครื่องวัดสี (Minolta camera, chroma meter CR-310, Japan)

18. เครื่องวัดค่าพีเอช (Digital pH meter รุ่น HORIBA: F-22, Japan)

19. เครื่อง Hand refractmeter (Digital Refractometer รุ่น PAL-1 Atago, Japan)

20. เครื่องอะตอมมิกแอบซอร์พชันสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Atomic Absorption Spectrophotometer รุ่น GBC 932 AA, Japan)

21. เครื่องย่อยเปียก (BUCHI Laboratechink AG CH – 923)

3.1.4 วัสดุและอุปกรณ์

1. บีกเกอร์ (Pyrex, England)
2. กระบอกตวง (Pyrex, England)
3. ปิเปตขนาด 10 มิลลิลิตร(Pyrex, England)
4. ขวดปรับปริมาตร (Witeg, Germany)
5. กระดาษกรอง (Whatman, England)
6. หลอดฉีดยา ขนาด 3 มิลลิลิตร (Nipro, Thailand)
7. Sep-Pek 18 (Restex)
8. พาราฟิล์ม (Parafilm, Pechiney, Chicago, USA.)
9. กรวยกรองขนาด 250 มิลลิลิตร (Separate funnel, Witeg, Germany)
10. กระป๋องหาความชื้น (Moisture can)
11. ตะแกรงร่อนขนาด 50 เมช (Sieve 50 mesh)
12. ช้อนตักสาร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2 การเตรียมวัตถุดิบสารสกัดเจียวกู้หลาน

ใบเจียวกู้หลานสดที่มีอายุของการเก็บเกี่ยว 2 เดือน นับจากวันที่ปลูกโดยเก็บยอดและใบเท่านั้น นำมาล้างด้วยน้ำสะอาด และฆ่าเชื้อด้วยคลอรีนความเข้มข้น 1 ppm. ทิ้งให้สะเด็ดน้ำ และทำให้แห้งโดยใช้เครื่องอบแห้งไมโครเวฟสุญญากาศ (March Cool Co., Thailand) ความร้อน 4,000 วัตต์ เป็นเวลา 50 นาที โดยมีอุณหภูมิของการทำแห้งไม่เกิน 60 °C หลังจากนั้นก็นำมาบด และผ่านตะแกรงร่อนขนาด 50 เมช ได้ผงเจียวกู้หลานแห้ง (ณัฏฐวี, 2550)

ผงเจียวกู้หลาน 5 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 95 มิลลิลิตร ให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟที่ความร้อน 800 วัตต์ โดยใช้เวลา 1 นาที 47 วินาที (ณัฏฐวี, 2550) กรองเอากากทิ้งด้วยผ้าขาวบางที่ซ้อนทับกัน 4 ชั้น จำนวน 2 รอบ จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 จำนวน 2 รอบ วัดปริมาตรทั้งหมด นำของเหลวที่ได้ไประเหยน้ำออก โดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศ (Büchi: V800, Swisserland) จนได้สารละลายเข้มข้น วัดปริมาตรของเหลวที่เหลือทั้งหมด เทของเหลวบรรจุลงในถาดๆ ละ 500 มิลลิลิตร แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 °C ทำแห้งโดยใช้เครื่อง freeze-drier (Labconco, America) ชั่งน้ำหนักสารสกัดที่ได้

การวิเคราะห์

- ปริมาณผลผลิต (yield)
- ปริมาณความชื้น (moisture content) (AOAC, 2000)
- ปริมาณเถ้ารวม (total ash) (AOAC, 2000)
- ปริมาณซาโปนินทั้งหมด
  (ดัดแปลงจาก สถาบันวิจัยสมุนไพร, 2548; Kwon *et al*., 2003)
- ปริมาณจีเพนโนไซด์ทั้งหมด
  (ดัดแปลงจาก สถาบันวิจัยสมุนไพร, 2548; Kwon *et al*., 2003)
- ปริมาณจินเซนโนไซด์ Rb_1 ทั้งหมด
  (ดัดแปลงจาก สถาบันวิจัยสมุนไพร, 2548; Kwon *et al*., 2003; Wu *et al*., 2001)
- ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (Kahkonen *et al*., 1999; Raggazzi; Veronase, 1973)
- ปริมาณสารแอนติออกซิแดนท์ (Masuda *et al*., 1999)
- ปริมาณสารหนู (AOAC, 2000)
- ปริมาณสารตะกั่ว (AOAC, 2000)
- ปริมาณสารปรอท (AOAC, 2000)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การวิเคราะห์ปริมาณซาโปนินทั้งหมด

(ดัดแปลงจาก สถาบันวิจัยสมุนไพร, 2548; Kwon *et al*., 2003)

ชั่งผงเจียวกู้หลาน 10 กรัม (ถ้าเป็นสารสกัดใช้ 3 กรัม) ใส่ลงในบีกเกอร์แล้วเติมเมทานอล 80 % จำนวน 200 มิลลิลิตร สกัดเป็นเวลา 6 ชั่วโมงด้วย heat reflux extraction หลังจากนั้นนำไปกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 นำสารละลายที่ได้ไประเหยที่อุณหภูมิ 55 °C ด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ (Büchi: V800, Swisserland) เพื่อระเหยเมทานอลออก จากนั้นนำมาสกัดเอาไขมันออกด้วย ไดเอทิลอีเทอร์ หลังจากการสกัดใช้กรวยแยกอีเทอร์ออก ส่วนของสารสกัดที่ได้นำมาสกัดด้วยสารละลายบิวทานอลที่อิ่มตัวด้วยน้ำ จำนวน 3 รอบ นำไประเหยที่อุณหภูมิ 55 °C ด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จากนั้นนำสารสกัดที่เหลือไปอบที่อุณหภูมิ 105 °C ด้วยตู้อบลมร้อน (Memmert: 400, Germany) จนน้ำหนักคงที่ นำค่าน้ำหนักที่ได้ไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของปริมาณสารสกัดของซาโปนินทั้งหมด

การวิเคราะห์ปริมาณจีเพนโนไซด์ทั้งหมด

(ดัดแปลงจาก สถาบันวิจัยสมุนไพร, 2548; Kwon *et al*., 2003)

ชั่งผงเจียวกู้หลาน 10 กรัม (ถ้าเป็นสารสกัดใช้ 3 กรัม) ใส่ลงในบีกเกอร์แล้วเติม 80 % เมทานอล จำนวน 200 มิลลิลิตร สกัดเป็นเวลา 6 ชั่วโมงด้วย heat reflux extraction หลังจากนั้นนำไปกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 นำสารละลายที่ได้ไประเหยที่อุณหภูมิ 55 °C ด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ (Büchi: V800, Swisserland) เพื่อระเหยเมทานอลออก จากนั้นนำมาสกัดเอาไขมันออกด้วยไดเอทิลอีเทอร์ หลังจากการสกัดใช้กรวยแยกอีเทอร์ออก ส่วนของสารสกัดที่ได้นำมาสกัดด้วยสารละลายบิวทานอลที่อิ่มตัวด้วยน้ำ จำนวน 3 รอบ นำไประเหยที่อุณหภูมิ 55 °C ด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศส่วนที่เหลือจากการระเหยนำมาละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตร บรรจุลงใน Sep-Pak C-18 (Restex) ล้างส่วนที่ไม่ต้องการใน Sep-Pak C-18 ออกด้วยน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร จากนั้นล้างด้วยเมทานอล 50 % จำนวน 5 มิลลิลิตร และเมทานอล 60 % จำนวน 2 มิลลิลิตร ตามลำดับ และในขั้นตอนสุดท้ายให้ล้างด้วยเมทานอล จำนวน 3 มิลลิลิตร นำสารละลายเมทานอลดังกล่าว ใส่ในขวดแก้วที่ทราบปริมาตรที่แน่นอน จากนั้นนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 °C ด้วยตู้อบลมร้อน (Memmert: 400, Germany) จนน้ำหนักคงที่ นำค่าน้ำหนักที่ได้ไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของปริมาณจีเพนโนไซด์รวมจากน้ำหนักของผงสมุนไพรที่ปราศจากความชื้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การวิเคราะห์ปริมาณจินเซนโนไซด์ Rb_1 ทั้งหมด

(ดัดแปลงจาก สถาบันวิจัยสมุนไพร, 2548; Kwon *et al*., 2003; Wu *et al*., 2001)

วิเคราะห์ปริมาณจินเซนโนไซด์ Rb_1 ทั้งหมด ทั้งในผงเจียวกู้หลาน และสารสกัดเจียวกู้หลาน โดย High performance Liquid Chromatography (HPLC) ของ Shimadsu, Kyoto, Japan เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานจินเซนโนไซด์ Rb_1 (Wilshire technologies, Inc Princeton, NJ) โดยใช้อะซีโตไนไตร์ (Acetonitrile: CH_3CN, HPLC grade, Lab-scan, Ireland) และน้ำไดออไนน์ (Diorni) เป็นโมบายเฟส (mobile phase) โดยมีขั้นตอนการเตรียมสารละลายมาตรฐาน และการเตรียมตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์ดังนี้

การเตรียมสารละลายมาตรฐานเพื่อวิเคราะห์ HPLC

ชั่งสารละลายมาตรฐานจินเซนโนไซด์ Rb_1 0.0025 กรัม ปริมาตรด้วยเมทานอลเป็น 25 มิลลิลิตร เป็นสต๊อค (stock) 100 ppm. จากนั้นเจือจางลงเป็น 20 40 60 และ 80 ppm.

การเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ HPLC

ชั่งตัวอย่างที่เตรียมไว้ 0.0040 กรัม ละลายในเอทานอล 1 มิลลิลิตรวิธีการ ฉีดตัวอย่างจำนวน 10 ไมโครลิตรเข้า Column Dimonsill 8,5 µm 250 x 4.6 mm. ที่อุณหภูมิ 40 $^{\circ}$C อัตราเร็ว 1.5 มิลลิลิตร/ นาที ใช้เวลาทั้งหมด 18 นาที โดยมีเฟสเคลื่อนเป็นส่วนประกอบที่เวลา 0-5 นาที อะซีโตไนไตร์ 30-45 % น้ำ 70-55 % เวลา 5-10 นาที อะซีโตไนไตร์ 45-60% oeh 55-44 % เวลา 10-12 นาที อะซีโตไนไตร์ 60 % น้ำ 40% เวลา 12-18 นาที อะซีโตไนไตร์ 30% น้ำ 70 % ตรวจสอบโครมาโตแกรมโดยใช้ Photodiode-array multiwavelength detector ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 203 นาโนเมตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การวิเคราะห์ ฟีนอลิกทั้งหมด โดยวิธี โดย Folin-Ciocalteu colorimetric method

(Kahkonen *et al*., 1999; Ragazzi and Veronase, 1973)

ชั่งตัวอย่างสารสกัดชาเจียวกู้หลาน 0.10 กรัม ในเมทานอล (blank) 5 มิลลิลิตร จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 10^{-1} ดูดสารละลายมา 0.1 มิลลิลิตร เติมเมทานอล 0.9 มิลลิลิตร จะได้สารลายที่มีความเข้มข้น 10^{-2} ดูดสารละลายมา 0.1 มิลลิลิตร เติมเมทานอล 0.9 มิลลิลิตรอีกครั้ง จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 10^{-3} ดูดสารละลายที่มีความเข้มข้น 10^{-3} มา 500 ไมโครลิตร ใส่ใน

ขวดสีชา เติม folin-ciocalteu reagent 2.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3 นาที เติมโซเดียมคาร์บอเนต 7.5 % (w/v) 2 มิลลิลิตร กวนผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม(vortex mixer) (G – 560E, USA) เก็บไว้ในที่มืด 60 นาที ที่อุณหภูมิห้องก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 775 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Model Genesys10UV Scaning, USA) หาปริมาณรวมของสารประกอบฟีโนลิก โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก (gallic acid) และรายงานผลเป็นเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้งของชา

การวิเคราะห์กิจกรรมสารแอนติออกซิแดนท์ โดย DPPH method (Masuda *et al*., 1999)

ชั่งน้ำหนักตัวอย่างสารสกัดเจียวกู้หลาน 0.25 กรัม ผสมกับเมทานอล ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 25 มิลลิลิตร จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 10^{-1} ใช้ไมโครปิเปต (SL – 1000, USA) ดูดสารละลายปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 25 มิลลิลิตรด้วยเมทานอล จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 10^{-2} อีกส่วนใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายที่เหลือใส่ในขวดสีชา ขวดละ 4.9 มิลลิลิตร จำนวน 4 ขวด ทำการเจือจางสารละลายต่อจนถึงความเข้มข้นที่10^{-8} นำสารละลายในขวดสีชาในแต่ละความเข้มข้น เติม 5 มิลลิโมลาร์ DPPH ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จำนวน 2 ขวด (2 ซ้ำ) สารละลายอีก 2 ขวดเติมเอทานอล 100 ไมโครลิตร (blank) ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม เก็บไว้ในที่มืด 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปคำนวณดังสมการเพื่อนำผลไปสร้างกราฟ เพื่อหาค่ากิจกรรมของสารแอนติออกซิแดนท์ในรูปของ EC_{50} หมายถึง ความเข้มข้นของสารสกัดตัวอย่างที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาที่ 50 %

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = [A_0-(A_1-A_s)]/A_0 \times 100$$

โดยที่ A_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH

A_1 คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายสารสกัดตัวอย่างในสารละลาย DPPH

A_s คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายสารสกัดตัวอย่าง

จากนั้นทำการสร้างข้อกำหนดเฉพาะของสารสกัดเจียวกู้หลาน เพื่อกำหนดไว้เป็นลักษณะเฉพาะของสารสกัดเจียวกู้หลานที่จะใช้เป็นวัตถุดิบในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มเพื่อสุขภาพ โดยใบเจียวกู้หลานสดจะต้องมีอายุการเก็บเกี่ยว 2 เดือน นับจากวันที่ปลูก ก่อนที่จะ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นำมาผ่านกรรมวิธีเป็นสารสกัด ทั้งนี้เพื่อให้ได้สารสกัดเจียวกู้หลานที่มีปริมาณสารสำคัญคงที่ ซึ่งประกอบด้วยปริมาณซาโปนินทั้งหมด อยู่ในช่วง 150 – 180 มิลลิกรัม/กรัม หรือ 15-18 %(w/v) และปริมาณจีเพนโนไซด์ทั้งหมด อยู่ในช่วง 100 – 125 มิลลิกรัม/กรัม หรือ 10 – 12.5 %(w/v) (ดัดแปลง จากสถาบันวิจัยสมุนไพร, 2548)

การวิเคราะห์หาปริมาณตะกั่ว (Lead) ปรอท (Mercury) และสารหนู (Arsenic) (AOAC, 2000)

ชั่งผงชาเจียวกู้หลานที่อบแห้ง และบดละเอียดจำนวน 2 กรัม ใส่ในหลอดเครื่องย่อย เติมกรดไนตริก 5 มิลลิลิตร และ 30 % ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ปริมาตร 2 มิลลิลิตร สารละลายที่ได้ระเหยไปเหลือติดก้นหลอด เทสารละลายที่ได้ใส่ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

เตรียมสารละลายมาตรฐาน ซึ่งปฏิบัติเช่นเดียวกับการเตรียมสารละลายตัวอย่าง แต่ไม่ใส่ผงชาเจียวกู้หลาน

เตรียมสารละลายมาตรฐาน ความเข้มข้น 2 4 และ 6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากตะกั่วมาตรฐาน 1 กรัม ในกรดไนตริก 7 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร โดยทำการเจือจางด้วย 3 โมล กรดไนตริก (สำหรับปรอทและสารหนู ก็ต้องใช้สารละลายมาตรฐานของปรอทและสารหนู)

นำสารละลาย blank สารละลายมาตรฐาน และสารละลายตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอะตอมมิกแอบซอร์พชันสเปกโทรโฟโตมิเตอร์(Atomic Absorption Spectrophotometer) แบบใช้เปลวไฟ โดยใช้สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 2 4 และ 6 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร สร้างกราฟมาตรฐานเพื่อใช้เปรียบเทียบในการวิเคราะห์ปริมาณตะกั่วในผงชาเจียวกู้หลาน สภาวะของเครื่องอะตอมมิกแอบซอร์พชัน สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ใช้ตัวผลิตอะตอมอิสระชนิดเปลวไฟแบบอากาศอะเซทีลีน ที่ความยาวคลื่น 283.3 นาโนเมตร นำข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องอะตอมมิกแอบซอร์พชันสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ไปคำนวณหาปริมาณตะกั่วในผงชาเจียวกู้หลานตามสูตร

$$C = \frac{(a-b)df \times 25}{m}$$

เมื่อ C คือ ปริมาณตะกั่วในตัวอย่างผงชาเจียวกู้หลาน (มิลลิกรัม/ กิโลกรัม)

a คือ ความเข้มข้นของสารละลายในการทดสอบ (มิลลิกรัม/ ลิตร)

b คือ ความเข้มข้นเฉลี่ยในสารละลายมาตรฐาน (มิลลิกรัม/ ลิตร)

df คือ ระดับการเจือจาง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3 วิธีการทดลอง

วิธีการทดลองแบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน ประกอบด้วย

ตอนที่ 1 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณสารสำคัญในสารสกัดเจียวกู้หลาน

ตอนที่ 2 การพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มเสริมสารสกัดเจียวกู้หลาน

ตอนที่ 3 การทดสอบการยอมรับของผู้บริโภคที่มีต่อผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มเสริมสารสกัดเจียวกู้หลานที่พัฒนาได้

โดยแต่ละขั้นตอนของการศึกษามีรายละเอียดดังนี้

ตอนที่ 1 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณสารสำคัญในสารสกัดเจียวกู้หลาน

3.3.1 การศึกษาผลของปริมาณกรดซิตริกและน้ำตาลซูโครสต่อปริมาณสารซาโปนินในสารสกัดเจียวกู้หลาน

การศึกษาระดับความเข้มข้นของกรดซิตริก (0 - 3 %) และความเข้มข้นน้ำตาลซูโครส (0 - 25 %) ต่อปริมาณสารซาโปนินในสารสกัดเจียวกู้หลาน โดยในการศึกษาจะกำหนดระดับความเข้มข้นของสารสกัดเจียวกู้หลานไว้ที่ความเข้มข้น 1 % และใช้ระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยาโดยการกวนผสมเป็นเวลา 10 นาที วางแผนการทดลองแบบ 3^2 Factorial experiment ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยกำหนดความเข้มข้นของสารละลายน้ำสารสกัดไว้ที่ความเข้มข้น 1 % โดยมีปัจจัยในการศึกษาดังนี้

ตาราง 3.1 ระดับปัจจัยที่ใช้ในการศึกษาระดับความเข้มข้นของกรดซิตริกและน้ำตาลซูโครสต่อปริมาณสารสำคัญในสารสกัดเจียวกู้หลาน

ปัจจัยที่ศึกษา	ระดับต่ำ (-)	ระดับกลาง (0)	ระดับสูง (+)
A. กรดซิตริก	0	1.5	3
B. น้ำตาลซูโครส	0	12.5	25

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 3.2 สิ่งทดลองจากการวางแผนการทดลองแบบ 3^2 Factorial experiment

3^2 Factorial experiment	สิ่งทดลอง	กรดซิตริก	น้ำตาลซูโครส
A → a1 (-), a2 (0), a3 (+) / B → b1 (-), b2 (0), b3 (+)	1	0	0
	2	0	12.5
	3	0	25
	4	1.5	0
	5	1.5	12.5
	6	1.5	25
	7	3	0
	8	3	12.5
	9	3	25

การวิเคราะห์

- ปริมาณซาโปนินทั้งหมด
  (ดัดแปลงจาก สถาบันวิจัยสมุนไพร, 2548; Kwon *et al*., 2003)
- ปริมาณจีเพนโนไซด์ทั้งหมด
  (ดัดแปลงจาก สถาบันวิจัยสมุนไพร, 2548; Kwon *et al*., 2003)
- ปริมาณจินเซนโนไซด์ Rb_1 ทั้งหมด
  (ดัดแปลงจาก สถาบันวิจัยสมุนไพร, 2548; Kwon *et al*., 2003; Wu *et al*., 2001)

ตอนที่ 2 การพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มเสริมสารสกัดเจียวกู้หลาน

3.3.2 การอภิปรายกลุ่ม (focus group discussion)

การอภิปรายกลุ่มจะใช้ผู้บริโภคที่เคยบริโภคเครื่องดื่มประเภทชาจำนวน30 คน แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มๆ ละ 10 คน ทำทีละกลุ่มโดยใช้คำถามและการดำเนินงานที่เป็นไปในลักษณะเดียวกันทุกประการ เพื่อรวบรวมความคิดเห็นของผู้บริโภคตามลักษณะคำถามที่กำหนด (เพ็ญขวัญ, 2550) ทั้งนี้เพื่อหาข้อสรุปของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มที่จะพัฒนา โดยคุณลักษณะด้านต่างๆ ของผลิตภัณฑ์ที่ผู้บริโภคต้องการ เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต้นแบบของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มจากสารสกัดเจียวกู้หลาน และนำมาสร้างแบบทดสอบในการสำรวจความต้องการของผู้บริโภค

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3.3 การสำรวจความต้องการของผู้บริโภค

การสร้างแบบสอบถาม (ภาคผนวก ข) ที่ใช้ในการเก็บรวบรวมข้อมูลออกแบบโดยใช้ข้อมูลจากการอภิปรายกลุ่ม และผ่านการทดสอบก่อน (pre-test) ในกระบวนการทดสอบก่อนจะใช้ผู้บริโภคจำนวน 20 คน ทดลองตอบแบบสอบถามเพื่อประเมินถึงความผิดพลาดที่อาจจะเกิดจากความไม่เข้าใจในคำถาม หรือคำสั่งในส่วนต่างๆ ของแบบสอบถาม ซึ่งถ้าหากมีข้อผิดพลาดเกิดขึ้นก็ต้องทำการแก้ไขปรับปรุง เพื่อให้ได้แบบสอบถามที่มีคุณภาพทั้งนี้จะนำมาซึ่งข้อมูลที่ดีสำหรับการวิเคราะห์ต่อไป โดยแบบสอบถามจะประกอบด้วย 3 ตอน ประกอบด้วยตอนที่ 1 ข้อมูลทั่วไปของผู้ตอบแบบสอบถาม ตอนที่ 2 ข้อมูลการทดสอบตัวอย่างผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสำเร็จรูปเจียวกู้หลานสกัด และตอนที่ 3 ข้อมูลเกี่ยวกับการพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มจากสารสกัดเจียวกู้หลาน

การสำรวจความต้องการของผู้บริโภคที่มีต่อการพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มจากสารสกัดเจียวกู้หลาน ศึกษาโดยใช้แบบสอบถามถามผู้บริโภคจำนวน 400 คน ซึ่งผู้บริโภคที่ทำการสำรวจทั้งหมดได้มาจากการสุ่มประชากรโดยใช้ช่วงอายุเป็นเกณฑ์ 5 ช่วงอายุ คือ ต่ำกว่า 15 ปี 16-30 ปี 31-45 ปี 46-60 ปี และมากกว่า 60 ปี ช่วงอายุละ 80 คน

ส่วนข้อมูลในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ ใช้ตัวอย่างเครื่องดื่มจำนวน 2 สูตร ซึ่งทำการดัดแปลงมาจากสูตรพื้นฐานของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มชาเขียวญี่ปุ่นยี่ห้อชาลีวัง ผลิตโดยบริษัทยูนิ-เพรสซิเดนท์ เอ็นเตอร์ไพรส์ คอร์ปอเรชั่น ประเทศไต้หวัน โดยมีส่วนผสมของแต่ละสูตรดังนี้

สูตรที่ 1 ประกอบด้วย

1. น้ำชาสด	1	%
2. สารสกัด	0.15	%
3. น้ำตาล	4.5	%
4. วิตามินซี	0.035	%

สูตรที่ 2 ประกอบด้วย

1. น้ำชาสด	1	%
2. สารสกัด	0.01	%
3. น้ำตาล	4.5	%
4. วิตามินซี	0.035	%

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากนั้นให้ผู้บริโภคจำนวน 400 คนทดสอบชิม แล้วให้คะแนนความชอบในคุณลักษณะต่างๆ โดยใช้วิธี Hedonic Scaling 9 Point (Meilgaard *et al*., 1999) นอกจากนั้นทำการสอบถามความเห็นของผู้บริโภค เพื่อหาทิศทางในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มเสริมสารสกัดเจียวกู้หลาน โดยใช้วิธี Just About Right (Meilgaard *et al*., 1999) ดังแสดงในแบบสอบถามภาคผนวก ข

การวิเคราะห์ทางสถิติ

- Factor Analysis ในการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเลือกซื้อเครื่องดื่มประเภทชาของผู้บริโภค
- Logistic Regression Analysis ในการศึกษาคุณลักษณะที่มีผลต่อการยอมรับของผลิตภัณฑ์ โดยใช้ SPSS (Chicago, USA)

3.3.4 การพัฒนาสูตรและกรรมวิธีการผลิตเครื่องดื่มเสริมสารสกัดเจียวกู้หลาน

การพัฒนาสูตรผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มเสริมสารสกัดเจียวกู้หลาน การทดลองนี้จะหาสัดส่วนที่เหมาะสมของส่วนผสมต่างๆ เพื่อให้ได้สูตรที่ผู้ทดสอบชอบมากที่สุด โดยให้แผนการทดลอง Mixture Design แบบ D-optimal ซึ่งเป็นแผนการทดลองที่ใช้ในการหาส่วนผสมของสูตรที่เหมาะสม (optimization) โดยให้ได้ปริมาณซาโปนินที่เหมาะสมที่ผู้บริโภคยอมรับได้ เพื่อหาสูตรและคุณสมบัติที่เหมาะสมของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มจากสารสกัดเจียวกู้หลาน ได้สิ่งทดลองทั้งหมด 8 สิ่งทดลอง ซึ่งมีส่วนผสมในอัตราส่วนที่แตกต่างกันออกไปดังตาราง 3.3 โดยมีปัจจัยที่ศึกษาดังนี้

- ปริมาณน้ำชาเจียวกู้หลานความเข้มข้น 1 % (เนื่องจากผลิตภัณฑ์ต้นแบบในการพัฒนาเครื่องดื่มจากสารสกัดใช้น้ำชาที่ความเข้มข้น 1 % อ้างอิงจากผลิตภัณฑ์ชาเขียวญี่ปุ่นยี่ห้อชาลีวัง ผลิตโดยบริษัท ยูนิ-เพรสซิเดนท์ เอ็นเตอร์ไพรส์ คอร์ปอเรชั่น ประเทศไต้หวัน) โดยวัตถุดิบใบชาเจียวกูหลานสดมีอายุการเก็บเกี่ยว 2 เดือน นับจากวันที่ปลูกเก็บเกี่ยวยอดและใบเท่านั้น เมื่อนำมาทำแห้งเป็นผงชาเจียวกู้หลานต้องมีความชื้นไม่เกิน 7 % และมีปริมาณซาโปนินทั้งหมดอยู่ในช่วง 70 – 100 มิลลิกรัม/ กรัม ก่อนที่จะนำมาทำ 1% น้ำชาเจียวกู้หลานต่อไป
- ปริมาณน้ำมะนาว (จากการสำรวจความต้องการของผู้บริโภค)
- ปริมาณน้ำตาลซูโครส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 3.3 สิ่งทดลองของการทดลองแบบ Mixture Design แบบ D-optimal ทั้ง 3 ปัจจัย

สิ่งทดลอง	1% น้ำชาเจียวกู้หลาน (%)	น้ำตาล (%)	น้ำมะนาว (%)
1	85	5	9.95
2	68.32	18.32	13.32
3	85	9.95	5
4	64.95	30	5
5	50	29.95	20
6	74.95	5	20
7	59.16	24.14	16.66
8	64.95	30	5

การวิเคราะห์

- การวัดค่าสี L* a* b* และ ΔE*
- ปริมาณซาโปนินทั้งหมด
  (ดัดแปลงจาก สถาบันวิจัยสมุนไพร, 2548; Kwon *et al*., 2003)
- ปริมาณจีเพนโนไซด์ทั้งหมด
  (ดัดแปลงจาก สถาบันวิจัยสมุนไพร, 2548; Kwon *et al*., 2003)
- ปริมาณจินเซนโนไซด์ Rb_1 ทั้งหมด
  (ดัดแปลงจาก สถาบันวิจัยสมุนไพร, 2548; Kwon *et al*., 2003; Wu *et al*., 2001)
- ค่าพีเอช
- ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำ (total soluble solid)
- ปริมาณกรดทั้งหมด (total acidity) (AOAC, 2000)
- ความชื้น (moisture content) (AOAC, 2000)
- ปริมาณของแข็งทั้งหมด (total solid) (AOAC, 2000)
- การทดสอบเชิงพรรณนา (descriptive analysis) โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ลักษณะทางประสาทสัมผัสแบบพรรณนาเชิงปริมาณ (Quantitative Descriptive Analysis; QDA) (Meilgaard *et al*., 1999) โดยใช้โปรแกรม SU Sense (มหาวิทยาลัยศิลปากร, นครปฐม)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- การทดสอบการยอมรับ (acceptance test) โดยใช้ Hedonic Scaling 9 Point (Meilgaard *et al.*, 1999) (แบบสอบถามภาคผนวก ข) ทดสอบผู้บริโภคจำนวน 200 คน เพื่อหาอัตราความชอบต่อผลิตภัณฑ์ที่ทำการพัฒนา แล้วทำการแสดงผลเป็นค่าเฉลี่ยและหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

การศึกษาระดับปริมาณสารสกัดเจียวกู้หลาน

หลังจากได้สูตรที่เหมาะสมแล้ว ทำการศึกษาระดับความเข้มข้นของการสกัดเจียวกู้หลานในระดับต่างๆ โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD ผันแปรความเข้มข้นของสารสกัด 4 ระดับ ประกอบด้วย 0.10 % 0.20 % 0.30 % และ 0.40 % ตรวจสอบคุณภาพทางกายภาพและเคมี และทางประสาทสัมผัสของเครื่องดื่มเสริมสารสกัดที่มีปริมาณสารสกัดที่แตกต่างกัน และทดสอบการยอมรับของผู้บริโภคต่อระดับความเข้มข้นสูงสุดของปริมาณสารสกัดเจียวกู้หลานที่ยอมรับได้ โดยใช้ผู้บริโภคจำนวน 100 คน และผู้ทดสอบที่ผ่านการฝึกฝนประเมินลักษณะประสาทสัมผัสเชิงพรรณนา จำนวน 10 คน จากนั้นนำมากำหนดปริมาณสารสกัดเจียวกู้หลานในเครื่องดื่มที่พัฒนาได้

การวิเคราะห์

- การวัดค่าสี L* a* b* และ ΔE*
- ปริมาณซาโปนินทั้งหมด
  (ดัดแปลงจาก สถาบันวิจัยสมุนไพร, 2548; Kwon *et al*., 2003)
- ปริมาณจีเพนโนไซด์ทั้งหมด
  (ดัดแปลงจาก สถาบันวิจัยสมุนไพร, 2548; Kwon *et al*., 2003)
- ปริมาณจินเซนโนไซด์ Rb_1 ทั้งหมด
  (ดัดแปลงจาก สถาบันวิจัยสมุนไพร, 2548; Kwon *et al*., 2003; Wu *et al*., 2001)
- ค่าพีเอช
- ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำ
- ปริมาณกรดทั้งหมด (AOAC, 2000)
- ความชื้น (AOAC, 2000)
- ปริมาณของแข็งทั้งหมด (AOAC, 2000)
- การทดสอบเชิงพรรณนา โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ลักษณะทางประสาทสัมผัสแบบพรรณนาเชิงปริมาณ โดยใช้โปรแกรม SU Sense (มหาวิทยาลัยศิลปากร, นครปฐม)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- การทดสอบการยอมรับ โดยใช้ Hedonic Scaling 9 Point (Meilgaard *et al.*, 1999) ทดสอบผู้บริโภคจำนวน 100 คน เพื่อหาอัตราความชอบต่อความเข้มข้นของสารสกัดที่เติมลงไปในผลิตภัณฑ์ที่ทำการพัฒนา แล้วทำการแสดงผลเป็นค่าเฉลี่ยและหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตอนที่ 3 การทดสอบการยอมรับของผู้บริโภคที่มีต่อผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มเสริมสารสกัดเจียวกู้หลานที่พัฒนาได้

3.3.5 การทดสอบการยอมรับของผู้บริโภค

การทดสอบการยอมรับของผู้บริโภคจะใช้การทดสอบแบบ Hedonic Scaling 9 Points (Meilgaard *et al.*, 1999) โดยใช้กลุ่มผู้บริโภคจำนวน 200 คน เพื่อหาอัตราความชอบต่อผลิตภัณฑ์ที่ทำการพัฒนา แล้วทำการแสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย และหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยใช้แบบทดสอบการยอมรับของผู้บริโภค จากนั้นก็นำข้อมูลที่ได้มาทำการวิเคราะห์โลจิสติก รีเกรสชัน ต่อปัจจัยการยอมรับ และการตัดสินใจซื้อของผู้บริโภค ทำการการเปรียบเทียบสัดส่วนการตัดสินใจซื้อของผู้บริโภคระหว่างก่อน และหลังได้รับข้อมูลเกี่ยวกับผลดีต่อสุขภาพของเครื่องดื่มเสริมสารสกัดเจียวกู้หลาน โดยใช้สถิติ Chi-Square McNemar Test ซึ่งเป็นสถิติที่ใช้สำหรับทดสอบความแตกต่างสัดส่วนสำหรับ 2 ตัวอย่างที่มีความสัมพันธ์ต่อกัน

3.3.6 การตรวจสอบคุณภาพผลิตภัณฑ์สุดท้าย

การตรวจสอบคุณภาพผลิตภัณฑ์สุดท้าย จะทำการตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ เคมี จุลินทรีย์ และการกำหนดลักษณะจำเพาะ (specification) ของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มเสริมสารสกัดเจียวกู้หลาน เพื่อกำหนดเป็นคุณลักษณะผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มเสริมสารสกัดเจียวกู้หลานที่พัฒนาได้

การวิเคราะห์

- การวัดค่าสี L* a* b* และ ΔE*
- ปริมาณซาโปนินทั้งหมด
  (ดัดแปลงจาก สถาบันวิจัยสมุนไพร, 2548; Kwon *et al.*, 2003)
- ปริมาณจีเพนโนไซด์ทั้งหมด
  (ดัดแปลงจาก สถาบันวิจัยสมุนไพร, 2548; Kwon *et al.*, 2003)
- ปริมาณจินเซนโนไซด์ Rb_1 ทั้งหมด
  (ดัดแปลงจาก สถาบันวิจัยสมุนไพร, 2548; Kwon *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2001)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

- ค่าพีเอช
- ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำ
- ปริมาณกรดทั้งหมด (AOAC, 2000)
- ความชื้น (AOAC, 2000)
- ปริมาณของแข็งทั้งหมด (AOAC, 2000)
- ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (total plate count) (Kiss, 1984)
- เชื้อยีสต์และรา (Kiss, 1984)

3.4 การกำหนดคุณลักษณะเฉพาะของผลิตภัณฑ์

ในขั้นตอนของการกำหนดคุณลักษณะเฉพาะของผลิตภัณฑ์ จะทำการกำหนดคุณลักษณะของวัตถุดิบ กระบวนการผลิต และผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มเสริมสารสกัดเจียวกู้หลาน

3.5 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

จากการวางแผนการทดลองแบบ 3^2 Factorial วิเคราะห์แบบ MANOVA (กัลยา, 2549) และวางแผนการทดลองแบบ Mixture Design วิเคราะห์หาโมเดลโดยวิธีรีเกรสชัน ในลักษณะของ linear model และ quadratic model ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับค่า p-value ของโมเดล ซึ่งมีโมเดลในลักษณะดังนี้

Linear model

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2$$

Quadratic model

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{12}X_1X_2 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2$$

โดยที่ Y คือ ผลตอบสนอง

b_0 คือ ค่าคงที่ของสมการ

b_1b_2 คือ สัมประสิทธิ์ของ Linear effects

$b_{11}b_{22}$ คือ สัมประสิทธิ์ของ Quadratic effects

b_{12} คือ สัมประสิทธิ์ของ Interaction effects

X_1X_2 คือ ตัวแปรอิสระหรือปัจจัยที่ใช้ในการศึกษา

จากโมเดลผลตอบสนองทั้งหมดจะทำ Response surface graphs เพื่อดูพื้นผิวการตอบสนองโดยใช้โปรแกรม Design-Expert Program (Design-Expert version 6.0.10, Stat-Ease Inc, MN) เพื่อหา optimization ของค่าสูงสุดในแต่ละผลตอบสนอง เพื่อให้ได้สูตรการพัฒนาเครื่องดื่มเสริมสารสกัดเจียวกู้หลานที่เหมาะสม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved