# บทที่ 3
# วัตถุดิบ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

## 3.1 วัตถุดิบและอุปกรณ์

ใบบัวบก (ตลาดเมืองใหม่ อ.เมือง จ.เชียงใหม่)

ถุงลามิเนทฟอยล์ (ไนลอนลามิเนตกับโพลีเอธิลีนเคลือบด้วยอลูมิเนียมฟอยล์, บริษัท ลีดเดอร์แพค)

เครื่องอบแห้งด้วยอินฟราเรดภายใต้สุญญากาศ (Infrared Vacuum Dryer; บริษัท เฟบิกซ์ อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด, ประเทศไทย)

เครื่องอบแห้งด้วยปั๊มความร้อนร่วมกับรังสีอัตราไวโอเลต (Heat pump; บริษัท มาร์ชคูล อันดัสทรี จำกัด)

เครื่อง HPLC (High permanence liquid chromatography: RF-10AXL, USA)

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-Vis Spectrophotometer: Rotina 46R, Germany)

เครื่องวัดค่าวอเตอร์แอคติวิตี้ (Water Activity Meter; AquaLab: Model Series 3, USA)

เครื่องวัดสี (Colorimeter; Minolta camera: Model CR-300, Japan)

เครื่องปิดผนึกแบบสุญญากาศ (Vacuum Sealer, Audiovac: VM2010, USA)

เครื่องเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง (Centrifuge: Model Rotina 46R, Germany)

เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (Microprocessor pH meter WTW; pH537, Germany)

เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (Hand Refractometer; ATAgO, Japan)

เทอร์โมมิเตอร์ชนิดอินฟราเรด (Infrared Thermometer; Oakton, Italy)

เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Satorius A120S, Germany)

Auto pipet (Eppendorf, Reference Series 2000, Canada)

หม้อนึ่งอัดไอ (Airayama HA-300MIV, Japan)

ตู้บ่ม (Heraeus B6200, England)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**3.2 วิธีการทดลอง**

**3.2.1 ศึกษาคุณภาพทางกายภาพ เคมี และจุลชีววิทยาของใบบัวบกสด**

คัดเลือกใบบัวบก จากตลาดเมืองใหม่ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ ล้างทำความสะอาด จากนั้นนำใบบัวบกที่ได้ไปวิเคราะห์ดังนี้

**3.2.1.1 วิเคราะห์คุณภาพทางเคมี**

- ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) ตามวิธี AOAC (2000)
- ปริมาณอะเซียติโคไซด์ (asiaticoside) ด้วย HPLC ตามวิธีของ Inamdar (1996)
- ปริมาณวิตามินซี ด้วย HPLC ตามวิธีของ Rodriguez *et al*. (2002)
- สารประกอบแคโรทีนอยด์ ตามวิธีของ Sant *et al.* (1998)
- ปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด ตามวิธีของ Mahanom *et al.* (1999)
- ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด ตามวิธีของ Ketsa *et al*. (1998)

**3.2.1.2 วิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพในใบบัวบก**

- ค่าสี L a*b* โดยใช้เครื่องวัดสี Minolta Chroma meter CR300
- ค่ากิจกรรมของน้ำ ($a_w$) โดยใช้เครื่อง Water activity meter
- ปริมาณความชื้น ตามวิธี AOAC (2000)

**3.2.1.3 วิเคราะห์คุณภาพทางจุลชีววิทยาในใบบัวบก**

- Total plate count ตามวิธี BAM (2000)
- Yeast and mould ตามวิธี BAM (2000)
- Coliform bacteria และ *Escherichia coli* ตามวิธี BAM (2000)

**3.2.2 ศึกษาการผลิตชาใบบัวบกด้วยปั๊มความร้อนร่วมกับรังสีอัลตราไวโอเลต**

นำใบบัวบกมาล้าง ทำความสะอาด ผึ่งสะเด็ดน้ำ อบแห้งด้วยปั๊มความร้อนร่วมกับรังสีอัลตราไวโอเลตจนได้ค่าความชื้นไม่เกินร้อยละ 8 โดยน้ำหนัก (มผช., 2549) โดยผันแปรอุณหภูมิ 5 ระดับ คือ 30 - 40, 30 - 50, 30 - 60, 40 - 50 และ 40 - 60 °ซ เนื่องจากไม่สามารถตั้งอุณหภูมิของเครื่องให้คงที่ได้ โดยอุณหภูมิจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นจากอุณหภูมิต่ำไปถึงอุณหภูมิสูงสุดที่ตั้งไว้ หลังจากนั้นอุณหภูมิจะค่อยๆ ลดลงมาจนถึงอุณหภูมิต่ำสุดที่ตั้งค่าไว้ และอุณหภูมิจะค่อยๆ เพิ่มสูงขึ้น เป็นวงจรต่อเนื่องจนสิ้นสุดระยะเวลาที่ใช้ในการอบแห้ง เมื่อได้ใบบัวบกแห้งที่ผ่านการอบแห้งในแต่ละช่วงอุณหภูมิ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นบดใบบัวบกแห้งให้ละเอียด ตรวจสอบคุณภาพทางกายภาพ เคมี และจุลชีววิทยาของ ชาใบบัวบกตามข้อ 3.2.1.1, 3.2.1.2 และ 3.2.1.3 เปรียบเทียบกับใบบัวบกสด จากนั้นนำใบบัวบกที่ผ่านการอบแห้งที่เหมาะสมที่สุด มาศึกษาผลของ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เวลาที่ใช้ในการชงชาต่อปริมาณสารออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา และศึกษาคุณภาพการเก็บรักษาชาใบบัวบกระยะเวลานาน 3 เดือน

**3.2.3 ศึกษาการผลิตชาใบบัวบกด้วยอินฟราเรดภายใต้สุญญากาศ**

นำใบบัวบกมาล้าง ทำความสะอาด อบแห้งด้วยอินฟราเรดภายใต้สุญญากาศ อบจนได้ค่าความชื้นไม่เกินร้อยละ 8 โดยน้ำหนัก (มผช., 2549) โดยผันแปรอุณหภูมิ 3 ระดับคือ 40, 50 และ 60 °ซ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นบดใบบัวบกแห้งให้ละเอียด ตรวจสอบคุณภาพทางกายภาพ เคมี และจุลชีววิทยาของชาใบบัวบกตามข้อ 3.2.1.1, 3.2.1.2 และ 3.2.1.3 เปรียบเทียบกับการอบแห้งด้วยวิธีปั๊มความร้อนร่วมกับรังสีอัลตราไวโอเลต จากนั้นนำใบบัวบกที่ผ่านการอบแห้งที่เหมาะสมที่สุด มาศึกษาผลของเวลาที่ใช้ในการชงชาต่อปริมาณสารออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา และศึกษาคุณภาพการเก็บรักษาชาใบบัวบกระยะเวลานาน 3 เดือน

**3.2.4 ศึกษาผลของเวลาที่ใช้ในการชงชาต่อปริมาณสารออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา (active compounds)**

ทดสอบความสามารถในการสกัดสาร ออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาโดยนำใบบัวบกที่ผ่านการอบแห้งที่เหมาะสมที่ผ่านการบดด้วยเครื่องบดผสม ( blender) จากตอนที่ 3.2.2 และ 3.2.3 ใส่ลงในถุงกระดาษกรองสำหรับบรรจุชา เปรียบเทียบความสามารถในการสกัดสารออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาโดยเติมปริมาณของชาชงใบบัวบกในน้ำร้อยละ 5 สกัดด้วยน้ำเดือดเป็นระยะเวลาต่างกันคือ 5 , 10, 15 และ 20 นาที ตรวจวิเคราะห์ดังนี้

**3.2.4.1 คุณภาพทางกายภาพของน้ำชา**

- ค่าสี โดยใช้เครื่องวัดสี

**3.2.4.2 คุณภาพทางเคมีของน้ำชา**

- ค่าความเป็นกรด-ด่าง ตามวิธีของ AOAC (2000)
- ปริมาณอะเซียติโคไซด์ (asiaticoside) ด้วย HPLC ตามวิธีของ Inamdar (1996)
- ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด ตามวิธีของ Ketsa *et al*. (1998)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**3.2.5 ศึกษาคุณภาพการเก็บรักษาชาใบบัวบก**

คัดเลือกชาใบบัวบกวิธีที่ดีที่สุดจากผลการ ศึกษาคุณภาพทางเคมี ทางกายภาพ ทางจุลชีววิทยา ที่ผ่านการอบแห้งด้วย ปั๊มความร้อนร่วมกับรังสีอัลตราไวโอเลต และอินฟราเรดภายใต้สุญญากาศจากข้อ 3.2.2 และ 3.2.3 บรรจุถุงลามิเนตฟอยล์ โดยผันแปรปัจจัยดังนี้คืออุณหภูมิในการ

เก็บรักษา 2 ระดับ (4 และ 40 °ซ) สุ่มตัวอย่างมาตรวจวิเคราะห์ทุกๆ 15 วันจนครบ 3 เดือน ตรวจสอบคุณภาพด้านกายภาพ เคมี และจุลชีววิทยา โดยวางแผนการทดลองแบบ 2×7 factorial design in CRD โดยวิเคราะห์ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ และทดสอบทางประสาทสัมผัสโดยชงชาด้วยวิธีที่ถูกคัดเลือกจากข้อ 3.2.4 โดยทดสอบในเดือนที่ 0 และเดือนที่ 3

**การทดสอบทางประสาทสัมผัส**

ให้ผู้บริโภคชิมตัวอย่างชาใบบัวบก โดยใช้แบบสอบถามแบบ 9-point hedonic scale ทำการประเมินคุณภาพชาใบบัวบกคือ สี กลิ่นสมุนไพร รสชาติรวม ความรู้สึกหลังกลืน และการยอมรับรวม โดยวางแผนการทดลองแบบบล็อกสุ่มสมบูรณ์ (Randomized Completely Block Design; RCBD) ใช้จำนวนผู้บริโภคในการทดสอบชิม 50 คน เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

**การวิเคราะห์ทางสถิติ**

การทดลองนี้วางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ ( Completely Randomized Design, CRD) นำข้อมูลผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธีการหาค่าเฉลี่ย และทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple-range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p \leq 0.05$) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 10.0

**3.3 วิเคราะห์ปริมาณอะเซียติโคไซด์ (asiaticoside) ด้วย HPLC ตามวิธีของ Inamdar (1996)**

**สารเคมี**

1. กรดอะเซียติก (asiatic acid; Fluka analytical, France)
2. อะเซียติโคไซด์ (asiaticoside; Fluka analytical, France)
3. เมทานอล (methanol HPLC Grade; Fisher Science, UK )
3. acetonitrile (Lab scan analytical science, Germany)

**การเตรียมตัวอย่าง**

1. เตรียมตัวอย่างผงใช้ 1 กรัม (ในกรณีใบบัวบกสดเตรียมตัวอย่างผงโดยนำไป freeze dry ก่อน ) ละลายด้วยสารละลายผสมของเมทานอล:น้ำ อัตราส่วน 9:1 โดยปริมาตร ปริมาณ 10 มิลลิลิตร เป็นเวลานาน 5 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงนำไปกรอง

2. กรองสารละลายด้วย membrance filter 0.45 ไมโครเมตร แล้วจึงนำไปวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง HPLC

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**Condition สำหรับวิเคราะห์หา active compound ในตัวอย่างโดยใช้เครื่อง HPLC**

Condition ของ HPLC

| | |
|---|---|
| Column : | C18 (GL Sciences Inc., Japan) |
| Reversed phase column : | acetonitrile ( Solvent A) |
| | water (solvent B) |
| Flow rate : | 1.4 ml/min |
| Temperature : | room temperature |
| Inject Sample : | 20 µL |
| UV detect : | 220 nm |

**Control mobile phase by gradient system**

0 min B 80% A20%

30 min B 45% A55%

35 min B 45% A55%

45 min B 80% A20%

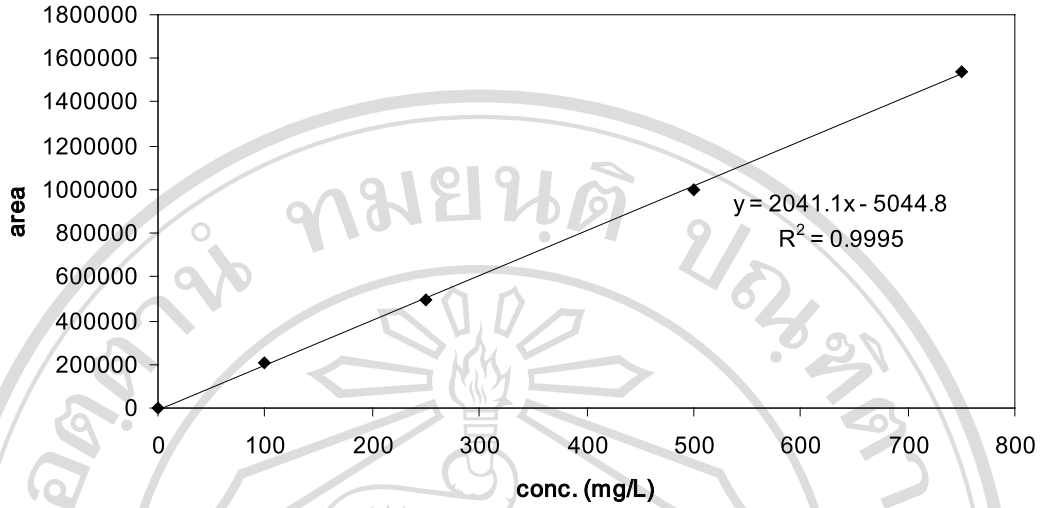
**การสร้างกราฟมาตรฐาน**

1. การเตรียม Standards สาร asiaticoside ด้วยสารละลายผสมของเมทานอล:น้ำ อัตราส่วน 9:1 โดยปริมาตร ปริมาณ 10 มิลลิลิตร ให้มีความเข้มข้น 100, 250,500, 750 และ 1000 มิลลิกรัม/ลิตร

2. นำมากรองด้วย Nylon filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร

3. นำสาร Standards ไปฉีดวิเคราะห์ โดยใช้ HPLC

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved




**รูป 3.1** กราฟมาตรฐานอะเซียติโคไซด์ (มิลลิกรัม/ลิตร)

**การคำนวณหาปริมาณอะเซียติโคไซด์**

นำค่าที่อ่านได้จากสารละลายอะเซียติโคไซด์มาตรฐานที่เตรียมไว้ในขั้นตอนการสร้างกราฟมาตรฐาน มาคำนวณหาสูตรสมการเส้นตรงได้ ดังนี้

$y = 2041.1x - 5044.8$ ; $R^2 = 0.9995$

โดย y = พื้นที่ที่อ่านได้ของตัวอย่างอะเซียติโคไซด์

x= ปริมาณอะเซียติโคไซด์ในตัวอย่าง (มิลลิกรัม/ลิตร)

จากนั้นนำค่า x ที่ได้มา คำนวณปริมาณอะเซียติโคไซด์ในตัวอย่าง ต่อไป

ตัวอย่าง เท่ากับ 578.372 มิลลิกรัม/ลิตร

สารละลายเจือจางปริมาตร 1000 มิลลิลิตร มีปริมาณอะเซียติโคไซด์ = 578.372 มิลลิกรัม

สารละลายเจือจางปริมาตร 10 มิลลิลิตร มีปริมาณอะเซียติโคไซด์ = (578.372×10)/1000

= 5.78 มิลลิกรัม

ปริมาณอะเซียติโคไซด์ที่ได้ จากตัวอย่างชาใบแห้ง 1 กรัม มีความชื้นประมาณ 5% (ของแข็ง 0.95 กรัม) ดังนั้นเมื่อทำการสกัดตัวอย่างแล้ว ความเข้มข้นจะเป็น

ตัวอย่างแห้ง 0.95 กรัม มีปริมาณอะเซียติโคไซด์ = 5.78 มิลลิกรัม

ตัวอย่างแห้ง 1 กรัม มีปริมาณอะเซียติโคไซด์ = (5.78 ×1)/0.95

= 6.08 มิลลิกรัม/กรัม (น้ำหนักแห้ง)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**3.4 วิเคราะห์ปริมาณวิตามินซี ด้วย HPLC ตามวิธีของ Rodriguez *et al*. (2002)**

**สารเคมี**

1. กรดแอสคอร์บิค (L-ascorbic acid; Asia Pacific Specialty Chemicals, Australia)

2. เมทานอล (methanol HPLC grade; Fisher Science, UK )

3. กรดซัลฟูริก (Sulfuric acid; Merck, Germany)

4. กรดอะซีติก (acetic acid; Lab scan analytical science)

**การเตรียมสารเคมี**

1. เตรียมกรดซัลฟูริก pH 2.2 โดยตวงน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร นำไปวัด pH เริ่มต้น จากนั้นค่อยๆ หยดกรดซัลฟูริกเข้มข้นลงไปในน้ำกลั่น จนกระทั่ง pH ลดลงเหลือเท่ากับ 2.2

2. การเตรียมกรดอะซิติก 0.1 โมลาร์ โดยปิเปตกรดอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 99.99 ปริมาตร 5.87 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร

**การสกัดตัวอย่าง**

1. ใช้ตัวอย่างผง 1 กรัม (ในกรณีใบบัวบกสดเตรียมตัวอย่างผงโดยนำไป freeze dry ก่อน) สกัดด้วยกรดซัลฟูริก pH 2.2 ปริมาตร 9 มิลลิลิตร เขย่าแรงๆให้เข้ากัน

2. กรองสารสกัดที่ได้ด้วย nylon syringe filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

**การวิเคราะห์ตัวอย่าง**

Condition ของ HPLC

Column : : C18 (GL Sciences Inc., Japan)

Reversed phase column : 0.1M acetic acid (Sovent A)

methanol (Sovent B)

Temperature : 30 $^{o}$C

UV detecter : 250 nm

Flow rate : 1.5 ml/min

Inject sample : 20 µl

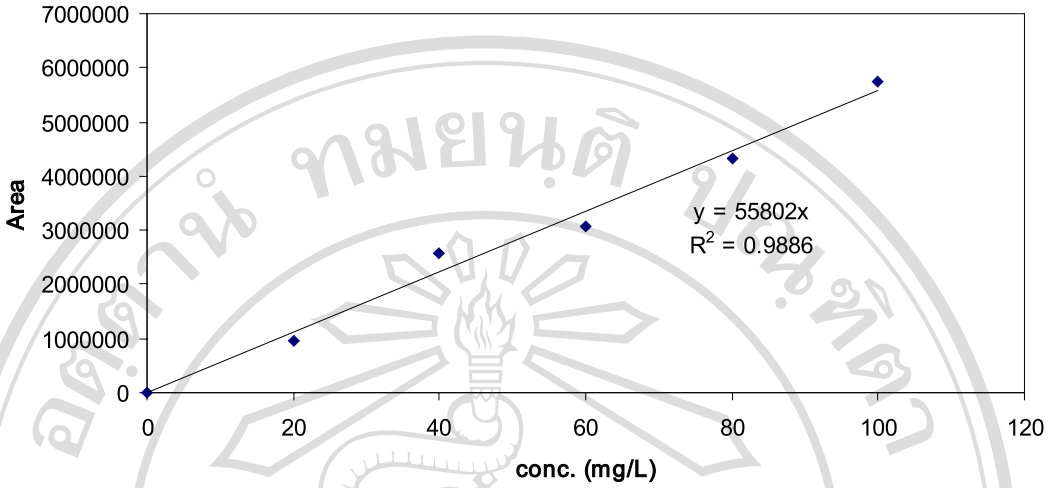
**การสร้างกราฟมาตรฐาน**

1. การเตรียม Standards สาร ascorbic acid ในสารละลายซัลฟูริก pH 2.2 ให้มีความเข้มข้น 10, 20, 30, 40 และ 50 มิลลิกรัม/ลิตร

2. นำมากรองด้วย Nylon filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. นำสาร Standards ไปฉีดวิเคราะห์ โดยใช้ HPLC




**รูป 3.2** กราฟมาตรฐานวิตามินซี (มิลลิกรัม/ลิตร)

**การคำนวณหาปริมาณวิตามินซี**

นำค่าที่อ่านได้จากสารละลายวิตามินซีมาตรฐานที่เตรียมไว้ในขั้นตอนการสร้างกราฟมาตรฐาน มาคำนวณหาสูตรสมการเส้นตรงได้ ดังนี้

$y = 55802x$ ; $R^2 = 0.9866$

โดย y = พื้นที่ที่อ่านได้ของตัวอย่างปริมาณวิตามินซี

x= ปริมาณวิตามินซีในตัวอย่าง (มิลลิกรัม/ลิตร)

จากนั้นนำค่า x ที่ได้มา คำนวณปริมาณวิตามินซีในตัวอย่าง ต่อไป

ตัวอย่าง เท่ากับ 3.797 มิลลิกรัม/ลิตร

สารละลายเจือจางปริมาตร 1000 มิลลิลิตร มีปริมาณวิตามินซี = 3.797 มิลลิกรัม

สารละลายเจือจางปริมาตร 10 มิลลิลิตร มีปริมาณวิตามินซี = (3.797× 10)/1000

= 0.037 มิลลิกรัม

ปริมาณวิตามินซีที่ได้ จากตัวอย่างชาใบแห้ง 1 กรัม มีความชื้นประมาณ 5% (ของแข็ง 0.95 กรัม)

ดังนั้นเมื่อทำการสกัดตัวอย่างแล้ว ความเข้มข้นจะเป็น

ตัวอย่างแห้ง 0.95 กรัม มีปริมาณวิตามินซี = 0.037 มิลลิกรัม

ตัวอย่างแห้ง 1 กรัม มีปริมาณวิตามินซี = (0.037×1)/0.95

= 0.039 มิลลิกรัม/กรัม (น้ำหนักแห้ง)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**3.5 วิเคราะห์สารประกอบแคโรทีนอยด์ ดัดแปลงตามวิธีของ AOAC (2000)**

**การสร้างกราฟมาตรฐานเบต้าแคโรทีน**

**สารเคมี**

1. เบต้าแคโรทีนมาตรฐาน (Standard β-Carotene ;Fluka analytical, France)
2. คลอโรฟอร์ม (Chloroform AR Grade)
3. เฮกเซน (Hexane AR Grade; Lab scan analytical science)
4. อะซีโตน (Acetone AR Grade;Fisher scientific)

**วิธีการ**

1. ชั่งสารมาตรฐานเบต้าแคโรทีนมา 0.005 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร ละลายสารมาตรฐานด้วยคลอโรฟอร์มจำนวน 2.5 มิลลิลิตร

2. ปรับปริมาตรสารละลายในข้อ 1 ให้ครบ 50 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตรด้วยเฮกเซน

3. ปิเปตสารละลายในข้อ 2 มา 5 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยเฮกเซน ให้ครบ 50 มิลลิลิตร

4. ปิเปตสารละลายในข้อ 3 มา 1,2,3,4,5,6,7,8 และ 9 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ครบโดยใช้สารละลายผสมอะซีโตนในเฮกเซน (ความเข้นข้นร้อยละ 10,v/v)

5. นำสารละลายในข้อ 4 ที่มีความเข้มข้นสูงสุดมาหาค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุด โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer ในช่วงความยาวคลื่น 400-500 นาโนเมตร ใช้สารละลายผสมอะซีโตนในเฮกเซน (ความเข้นข้นร้อยละ 10,v/v) เป็น blank

6. ตั้งค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่นสูงสุดตามที่วัดได้จากข้อ 5 (วัดได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร) จากนั้นนำสารละลายเบต้าแคโรทีนมาตรฐานในข้อ 4 ทั้งหมดเตรียมไว้มาวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยใช้สารละลายผสมอะซีโตนในเฮกเซน (ความเข้นข้นร้อยละ 10,v/v) เป็น blank บันทึกค่าที่วัดได้

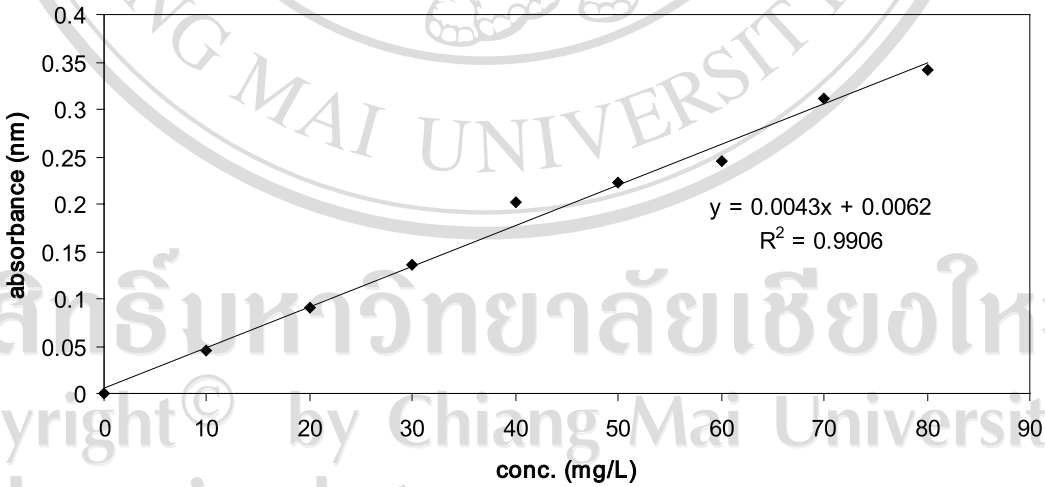
7. นำค่าที่วัดได้มาเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเบต้าแคโรทีน (ส่วนในล้านส่วน) กับค่าดูดกลืนแสงที่อ่านได้ แล้วหาสมการเส้นตรงจากกราฟ

วิธีการเตรียมสารละลายผสม อะซีโตนในเฮกเซน (ความเข้นข้นร้อยละ 10, v/v) ทำโดยปิเปตอะซีโตนมา 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยเฮกเซนจนครบ 100 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**วิธีการสกัดตัวอย่าง**

ชั่งตัวอย่างชาใบบัวบกผง 1 กรัม (ในกรณีใบบัวบกสดเตรียมตัวอย่างผงโดยนำไป freeze dry ก่อน ) ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารผสม อะซีโตนในเฮกเซน (ความเข้นข้นร้อยละ 10,v/v) 100 มิลลิลตร นำไปกวนบนเครื่อง magnetic stirrer นาน 10 นาที แล้วนำไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 แยกกากบัวบกกับส่วนใส โดยเก็บส่วนใสในกรวยแยกขนาด 250 มิลลิลิตร ล้างกากบัวบกด้วย อะซีโตน 25 มิลลิลิตร 2 ครั้ง และเฮกเซน 25 มิลลิลิตร อีก1 ครั้ง นำส่วนใสของอะซีโตนและเฮกเซนที่ใช้ล้างกากไปรวมกับส่วนแรกที่อยู่ในกรวยแยก ทำการล้างแยกกากเอาแอซีโตนออก โดยการล้างสารละลายผสมในกรวยแยกด้วยน้ำกลั่นครั้งละ 100 มิลลิลิตร 5 ครั้ง แยกส่วนของน้ำที่มีอะซีโตนผสมอยู่ออกจากส่วนที่เป็นเฮกเซนที่มีสารแคโรทีนอยด์ละลายอยู่ นำสารผสมแคโรทีนอยด์ในเฮกเซนไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 2 โดยรองรับสารผสมด้วยบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วนำสารที่กรองได้ไประเหยในตู้ดูดควันจนแห้ง นำสารที่ระเหยแห้งแล้วมาละลายด้วยสารผสมแอซีโตนในเฮกเซน (ความเข้นข้นร้อยละ 10,v/v) และปรับปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิลิตร นำสารละลายผสมที่ได้ไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร บันทึกค่าที่ได้เปรียบเทียบกับค่าดูดกลืนแสงของ blank (สารผสมอะซีโตนในเฮกเซน (ความเข้นข้นร้อยละ 10,v/v)) ทำซ้ำ 2 ครั้ง นำค่าที่ได้ทั้ง 2 ครั้งมาหาค่าเฉลี่ยและนำไปคำนวณหาปริมาณของแคโรทีนอยด์




**รูป 3.3** กราฟมาตรฐานสารประกอบแคโรทีนอยด์ (มิลลิลิตร/ลิตร)

**การคำนวณหาปริมาณแคโรทีนอยด์**

นำค่าที่อ่านได้จากสารละลายเบต้าแคโรทีนมาตรฐานที่เตรียมไว้ในขั้นตอนการสร้างกราฟมาตรฐาน มาคำนวณหาสูตรสมการเส้นตรงได้ ดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

$y = 0.0043x + 0.0062$ ; $R^2 = 0.9906$

โดย y = ค่าดูดกลืนแสงที่อ่านได้ของตัวอย่างแคโรทีนอยด์

x = ปริมาณแคโรทีนอยด์ในตัวอย่าง (มิลลิลิตร/ลิตร)

จากนั้นนำค่า x ที่ได้มา คำนวณปริมาณแคโรทีนอยด์ ในตัวอย่าง ต่อไป ตัวอย่าง เจือจาง 10 เท่า ดังนั้นปริมาณแคโรทีนอยด์ ในตัวอย่าง คือ 12.87 ×10 = 128.75 มิลลิลิตร/ลิตร

สารละลายเจือจางปริมาตร 1000 มิลลิลิตร มีแคโรทีนอยด์ = 128.75 มิลลิกรัม

สารละลายเจือจางปริมาตร 50 มิลลิลิตร มีแคโรทีนอยด์ = (128.75×50)/1000

= 6.44 มิลลิกรัม

ปริมาณแคโรทีนอยด์ที่ได้ จากตัวอย่างชาใบแห้ง 1 กรัม มีความชื้นประมาณ 5% (มีของแข็ง 0.95 กรัม) ดังนั้นเมื่อทำการสกัดตัวอย่างแล้ว ความเข้มข้นจะเป็น

ตัวอย่างแห้ง 0.95 กรัม มีแคโรทีนอยด์ = 6.44 มิลลิกรัม

ตัวอย่างแห้ง 1 กรัม มีแคโรทีนอยด์ = (6.44 ×1)/0.95

= 6.77 มิลลิกรัม/กรัม (น้ำหนักแห้ง)

**3.6 วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด ตามวิธีของ Ketsa *et al.* (1998)**

**สารเคมี**

1. สารละลายเอทานอลเย็น (Ethanol; Chemical & Lab Supplies, Thailand)

ความเข้มข้น ร้อยละ 80 โดยปริมาตร เตรียมโดยตวงเอทานอล ความเข้มข้น ร้อยละ 95 ปริมาตร 210.5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตร ด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 250 มิลลิลิตร

2. Folin-Ciocalteu reagent ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร เตรียมโดยปิเปต Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

3. สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Merck, Germany)

ความเข้มข้น ร้อยละ 7.5 เตรียมโดยชั่งโซเดียมคาร์บอเนตแอนไฮดรัส 7.5 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

4. สารละลาย กรดแกลลิก (Gallic acid; Fluka, Spain)

กรดแกลลิก 0.01 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

**การสร้างกราฟสารประกอบฟีนอลมาตรฐาน**

1. ปิเปตสารละลายกรดแกลลิคความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50, 100, 150, 200 และ 250 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง

2. เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรรวมเท่ากับ 500 ไมโครลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมแล้ววางไว้ เป็นเวลา 8 นาที

4. เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น ร้อยละ 7.5 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมแล้ววางไว้ 2 ชั่วโมง

5.นำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร

**การวิเคราะห์ตัวอย่าง**

1. ชั่ง ชาใบบัวบกผง 1 กรัม (ในกรณีใบบัวบกสดเตรียมตัวอย่างผงโดยนำไป freeze dry ก่อน ) ใส่ในโกร่งบดที่แช่เย็นแล้ว

2. เติมเอทานอลเย็น ความเข้มข้นร้อยละ 80 ในปริมาณ 10 มิลลิลิตร บดให้เข้ากัน

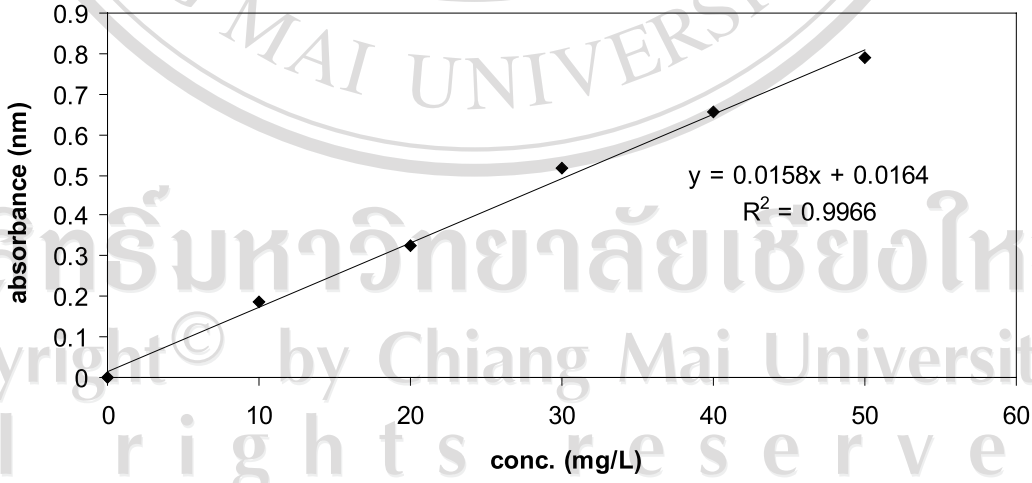
3. นำไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงหนีศูนย์กลางด้วยความเร็ว 3000 xg ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 20 นาที

4. นำของเหลวใสที่ได้ 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ให้ครบ 10 มิลลิลิตร

5. ปิเปตมา 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร แล้ววางไว้เป็นเวลา 8 นาที

6. เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น ร้อยละ 7.5 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมแล้ววางไว้ 2 ชั่วโมง

7. นำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร




**รูป 3.4** กราฟมาตรฐานสารประกอบฟีนอล (มิลลิกรัม/ลิตร)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**การคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด**

นำค่าที่อ่านได้จากสารประกอบฟีนอลมาตรฐานที่เตรียมไว้ในขั้นตอนการสร้างกราฟมาตรฐาน มาคำนวณหาสูตรสมการเส้นตรงได้ ดังนี้

$y = 0.0158x + 0.0164$ ; $R^2 = 0.9966$

โดย y = ค่าดูดกลืนแสงที่อ่านได้ของตัวอย่างสารประกอบฟีนอลทั้งหมด

x= ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดในตัวอย่าง (มิลลิกรัม/ลิตร)

จากนั้นนำค่า x ที่ได้มา คำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดในตัวอย่าง ต่อไป ตัวอย่าง เจือจาง 25 เท่า ดังนั้นปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดในตัวอย่าง

คือ 127.476 ×25 = 3186.9 มิลลิกรัม/ลิตร

สารละลายเจือจางปริมาตร 1000 มิลลิลิตร มีสารประกอบฟีนอลทั้งหมด = 3186.9 มิลลิกรัม

สารละลายเจือจางปริมาตร 10 มิลลิลิตร มีสารประกอบฟีนอลทั้งหมด = (3186.9×10)/1000

= 31.86 มิลลิกรัม

สารประกอบฟีนอลทั้งหมดที่ได้ จากตัวอย่างชาใบแห้ง 1 กรัม มีความชื้นประมาณ 5% (มีของแข็ง 0.95 กรัม) ดังนั้นเมื่อทำการสกัดตัวอย่างแล้ว ความเข้มข้นจะเป็น

ตัวอย่างแห้ง 0.95 กรัม มีสารประกอบฟีนอลทั้งหมด = 31.86 มิลลิกรัม

ตัวอย่างแห้ง 1 กรัม มีสารประกอบฟีนอลทั้งหมด = (31.86×1)/0.95

= 33.53 มิลลิกรัม/กรัม (น้ำหนักแห้ง)

**3.7 วิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด ตามวิธีของ Mahanom *et al.* (1999)**

**สารเคมี**

1. $CaC0_3$ (Merck, Germany)

2. อะซีโตน (Acetone AR Grade;Fisher scientific)

**การวิเคราะห์ตัวอย่าง**

1. ชั่งชาใบบัวบกผง 1 กรัม

(ในกรณีใบบัวบกสดเตรียมตัวอย่างผงโดยนำไป freeze dry ก่อน )

2. เติม $CaC0_3$ 0.1 กรัม และอะซีโตน (ความเข้มข้นร้อยละ 80,v/v) 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

3. นำไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงหนีศูนย์กลางด้วยความเร็ว 12000 xg เป็นเวลา 20 นาที

4. ปิเปตของเหลวใสที่ได้ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 663 และ 645

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ คำนวณหาปริมาณคลอโรฟิลล์ต่อกรัมตัวอย่าง ดังสูตร (Marcano *et al.,* 2007)

$$\text{Chl a (ไมโครกรัมต่อกรัมของตัวอย่าง)} = \frac{((12.7 \times Abs_{663})- (2.6 \times Abs_{645}))\times \text{ปริมาตรของอะซิโตน}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}}$$

$$\text{Chl b (ไมโครกรัมต่อกรัมของตัวอย่าง)} = \frac{((22.9 \times Abs_{645})- (4.68 \times Abs_{663}))\times \text{ปริมาตรของอะซิโตน}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}}$$

Total chlorophyll = Chl a + chl b

**การคำนวณหาปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด**

สารละลายตัวอย่าง มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 663 นาโนเมตร เท่ากับ 1.3282

สารละลายตัวอย่าง มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 645 นาโนเมตร เท่ากับ 0.4850

คลอโรฟิลล์ เอ (ไมโครกรัมต่อกรัม) = $((12.7 \times 1.3282)- (2.6 \times 0.4850)) \times 10$

= 156.071 ไมโครกรัมต่อกรัม

= 0.156 มิลลิกรัมต่อกรัม

คลอโรฟิลล์ บี (ไมโครกรัมต่อกรัม) = $((22.9 \times 0.4850)- (4.68 \times 1.3282)) \times 10$

= 48.906 ไมโครกรัมต่อกรัม

= 0.048 มิลลิกรัมต่อกรัม

ปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด = 0.156 + 0.048

= 0.204 มิลลิกรัมต่อกรัม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ปริมาณ คลอโรฟิลล์ทั้งหมด ที่ได้ จากตัวอย่างชาใบแห้ง 1 กรัม มีความชื้นประมาณ 5% (มีของแข็ง 0.95 กรัม) ดังนั้นเมื่อทำการสกัดตัวอย่างแล้ว ความเข้มข้นจะเป็น

ตัวอย่างแห้ง 0.95 กรัม มีปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด = 0.204 มิลลิกรัม

ตัวอย่างแห้ง 1 กรัม มีปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด = $(0.204 \times 1)/0.95$

= 0.21 มิลลิกรัม/กรัม (น้ำหนักแห้ง)



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved