บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบ อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 วัตถุดิบ

1. ชาเขียวพันธุ์อัสสัม *(Camellia sinensis* Var. *assamica* (Mast.)) จากไร่ชาระมิงค์ จังหวัดเชียงใหม่
2. ชะเอม (*Glycyrrhiza glabra)* จากตลาด จังหวัดเชียงใหม่
3. ตะไคร้ (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) จากตลาด จังหวัดเชียงใหม่

3.1.2 สารเคมี

1. เอทิลอะซีเตต (Ethyl acetate: CH_3COOH, Merck, German)
2. เอทานอล (Ethanol: C_2H_5OH, AR grad, Merck, England)
3. เมทานอล (Methanol: CH_3OH, AR and HPLC grade, Merck, England)
4. อะซีโตไนไตรล์ (Acetonitrile: CH_3CN, HPLC grade, Lab-scan, Ireland)
5. Epigallocatechin gallate (EGCG, Sigma-Aldrich, USA)
6. Gllocatechin (EGC, Sigma-Aldrich, USA)
7. Catechin (C, Sigma-Aldrich, USA)
8. Epicatechin (EC, Sigma-Aldrich, USA)
9. Epicatechin gallate (ECG, Sigma-Aldrich, USA)
10. DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) (Fluka, USA.)
11. โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium Carbonate: Na_2CO_3, AR grade, Merck, England)
12. Folin-Ciocalteu' phenol reagent (Fluka, USA.)
13. Gallic acid (Fluka, USA.)
14. โซเดียมคลอไรด์ (Sodium Chloride: NaCl, Merck, England)
15. ด่างทับทิม (Potassium permanganate: $KMnO_4$, AR grade, Merck, England)
16. indigo carmine
17. ดินขาว (Kaolin)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

18. น้ำกลั่น (distillation Water)
19. เจลาติน (Gelatin)
20. กรดซัลฟูริก (Sulfuric acid: H_2SO_4, AR grade, Merck, England)

3.1.3 อุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิตชาเขียวผสมตะไคร้และชะเอม

1. เครื่อง Freeze-drier (Labconco, USA)
2. เครื่องไมโครเวฟสุญญากาศ (MarchCool, Co.,Thailand)
3. ตู้แช่เยือกแข็ง (Freezer, SUNYO, Thailand)
4. เครื่อง High Performance Liquid Chromatograph (Milton Roy company, USA)
5. หลอดฉีดยา (Nipro, Thailand)
6. ไมโครปิเปตต์ขนาด 100-1,000 ไมโครลิตร(Micropipette,Wiggenhauser, Germany)
7. เครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary Vacuum Evaporator, Büchi: V800, Switzerland)
8. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง
   (Spectrophotometer model Genesys 10 UV Scanning, USA)
9. เครื่องวัดสี (Hunter Lab รุ่น Color Quest XE SSE343, USA)
10. เตาเผา (Muffle furnace, Vulcan: Model 3-1750, USA)
11. โถดูดความชื้น (desiccator)
12. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler-Toledo: Model AB204-S, Switzerland)
13. เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Mettler-Toledo: Model PB1502-S, Switzerland)
14. เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Precisa: Model BJ1000C, Switzerland)
15. เครื่องปั่น (Blender, National: Model MX-T700 GN, Taiwan)
16. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath, Memmert: Model UNB400, USA)
17. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven, Memmert: 400, Germany)
18. ชุดอุปกรณ์เครื่องแก้วและเครื่องมือวิทยาศาสตร์
19. ชุดกรอง ประกอบด้วย กรวยกรอง และเครื่องปั๊มสุญญากาศ(Suction pupm)
20. กระดาษกรอง เบอร์ 1 และ 4 (Whatman, England)
21. กระป๋องหาความชื้น (moisture can)
22. ช้อนตักสาร
23. ถ้วยกระเบื้อง (Crucible)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพทางด้านประสาทสัมผัส

1. ชุดอุปกรณ์ทดสอบชิม
2. แบบทดสอบทางประสาทสัมผัส (รายละเอียดแสดงดังภาคผนวก ข)

เครื่องประมวลผลทางสถิติ

1. โปรแกรมสำเร็จรูป Design-Expert version 6.0.10 (Statease Inc., MN)
2. โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS for windows version 11.0 (SPSS Inc., Chicago, IL)
3. โปรแกรม Su Sense (มหาวิทยาลัยศิลปากร, นครปฐม)

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การเตรียมวัตถุดิบ

3.2.1.1 การเตรียมชาเขียวอบแห้ง

ใบชาเขียวพันธุ์อัสสัมจากไร่ชาระมิงค์ จำนวน 1 กิโลกรัม นำมาทำแห้งโดยใช้เครื่องไมโครเวฟสุญญากาศ โดยมีอุณหภูมิการทำแห้งไม่เกิน 60 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำมาบดบรรจุในถุงอลูมิเนียมฟอยล์

3.2.1.2 การเตรียมตะไคร้อบแห้ง

นำตะไคร้ที่ผ่านการล้างทำความสะอาดและหั่นละเอียด มาทำแห้งโดยใช้เครื่องไมโครเวฟสุญญากาศ เป็นเวลา 15 นาที โดยมีอุณหภูมิการทำแห้งไม่เกิน 60 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำมาบด บรรจุในถุงอลูมิเนียมฟอยล์ โดยมีคุณภาพแสดงในตาราง 3.1 พบว่า ตะไคร้อบแห้งมีความชื้น 6.69% ปริมาณของแข็งทั้งหมด 92.41% มีค่า a_w 0.363 ปริมาณเถ้าทั้งหมด 4.74% ปริมาณสารที่สกัดได้ด้วยน้ำ 4.46% ปริมาณสารประกอบฟีโนลิกทั้งหมด 16.74 mg GAE/ g ความสามารถในการยับยั้งสารอนุมูลอิสระของตะไคร้มีค่า 47.87 mg/L

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 3.1 การวิเคราะห์คุณภาพเบื้องต้นของตะไคร้และชะเอม

คุณภาพ	ตะไคร้	ชะเอม
ความชื้น (%)	6.69±0.15	7.59±0.12
ปริมาณของแข็งทั้งหมด (%)	93.31±0.15	92.41±0.12
a_w	0.363±0.002	0.500±0.005
ปริมาณเถ้าทั้งหมด (%)	4.74±0.14	4.00±0.08
ปริมาณสารที่สกัดได้ด้วยน้ำ (%)	4.46±0.70	6.23±0.65
ปริมาณสารฟีโนลิกทั้งหมด (mg GAE/ g dry basis)	16.74±0.49	27.05±0.31
ปริมาณสารต้านออกซิเดชัน (EC_{50}) (mg/L)	47.87±0.23	82.00±0.34

ค่าของข้อมูล คือ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3.2.1.3 การเตรียมชะเอมอบแห้ง

นำชะเอมมาล้างทำความสะอาด แล้วอบแห้งด้วยตู้อบลมร้อน 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาบดให้ละเอียด บรรจุในถุงอลูมิเนียมฟอยล์ โดยมีคุณภาพดังแสดงในตาราง 3.1 พบว่าชะเอมมีความชื้นเท่ากับ 7.59% มีปริมาณของแข็งทั้งหมด 92.41% มีค่า a_w 0.5 มีปริมาณเถ้าทั้งหมด 4 %ปริมาณสารที่สกัดได้ด้วยน้ำ 6.23% ปริมาณสารประกอบฟีโนลิกทั้งหมด 27.05 mg GAE/ g dry basisความสามารถในการยับยั้งสารอนุมูลอิสระของชะเอมมีค่า 82 mg/L

3.2.2 การวิเคราะห์คุณภาพเบื้องต้นของชาเขียว ตะไคร้ และชะเอม

3.2.2.1 การเตรียมตัวอย่างเพื่อนำมาวิเคราะห์

นำใบชาแห้งซึ่งเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส มาทำการปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นที่ความเร็วปานกลางเป็นเวลา 30 วินาที บรรจุในถุงอลูมิเนียมฟอยล์ เพื่อรอทำการวิเคราะห์

3.2.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น (AOAC, 2000)

นำใบชาที่บดละเอียดมาหาความชื้น โดยใช้ตัวอย่าง ประมาณ 2 กรัม ใส่ในถ้วยอลูมิเนียมที่อบจนน้ำหนักคงที่และชั่งน้ำหนักแล้ว จดน้ำหนักที่แน่นอน จากนั้นนำไปอบที่ตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 105 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนัก จน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ได้น้ำหนักคงที่ คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความชื้นในตัวอย่าง นำข้อมูลที่ได้ไปหาเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง โดยผลการวิเคราะห์จะรายงานเป็นเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง

3.2.2.3 การหาปริมาณสารที่สกัดได้ด้วยน้ำร้อน (ลักขณา และ นิธิยา, 2544)

ชั่งชาบดละเอียด 2 กรัม (อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาใช้) ใส่ลงในน้ำ 100 มิลลิลิตร นำไป reflux นาน 1 ชั่วโมง กรองเก็บสารละลายที่กรองได้ใส่ใน volumetric flask ขนาด 250 มิลลิลิตร นำกากไป reflux ซ้ำอีกแล้วกรองเก็บสารละลายที่กรองได้รวมกัน ทำซ้ำจนสารละลายไม่มีสี เก็บสารละลายที่ได้ทั้งหมดรวมกัน ปรับปริมาตรให้ครบ 200 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น เขย่าให้เข้ากัน นำกากที่เหลือไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส คำนวณหาปริมาณเปอร์เซ็นต์กากที่เหลือ

ปิเปตของเหลวที่สกัดได้ใน volumetric flask มา 50 มิลลิลิตร ใส่ในภาชนะโลหะที่ผ่านการอบและทราบน้ำหนักแล้ว นำไประเหยเอาน้ำออกจนแห้งบน water – bath นำไปอบต่อในตู้อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส จนได้น้ำหนักคงที่ ชั่งหาปริมาณสารที่สกัดได้ด้วยน้ำ และคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักแห้งของชาตัวอย่าง

3.2.2.4 การวิเคราะห์ปริมาณเถ้าทั้งหมด (AOAC, 2000)

ชั่งชาบดละเอียดตัวอย่างมา 5 กรัมใส่ใน crucible เผาโดยใช้อุณหภูมิต่ำโดยใช้เตาไฟฟ้า จนควันของตัวอย่างเป็นสีขาว แล้วนำไปเผาต่อในเตาเผาที่อุณหภูมิ 525 องศาเซลเซียสจนเถ้ามีสีเทา ชั่งหาน้ำหนักของเถ้าที่ได้ คำนวณหาเปอร์เซ็นต์เถ้าในชาตัวอย่าง

ชาจะมีเถ้าไม่เกิน 7 เปอร์เซ็นต์ และส่วนประกอบที่สำคัญของเถ้าคือ โปแตสเซียม 27 – 36 เปอร์เซ็นต์ ในรูปของ K_2O และฟอสฟอรัส 14 – 18 เปอร์เซ็นต์ในรูป P_2O_5

3.2.2.5 การวิเคราะห์ปริมาณแทนนิน (AOAC, 2000)

เป็นการวิเคราะห์ด้วย Lowenthal's permanganate oxidization process โดยชั่งน้ำหนักตัวอย่างชา 5 กรัม ใส่ลงในน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร ต้มนาน 1 ชั่วโมง กรองผ่านสำลีใส่ใน volumetric flask ขนาด 500 มิลลิลิตร ปล่อยให้เย็นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 500 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น เขย่าให้เข้ากันดี (เรียกว่าสารละลาย A) ปิเปตสารละลาย A มา 100 มิลลิลิตร ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายเจลาตินลงไป 50 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 250 มิลลิลิตร ด้วยสารละลาย acid sodium chloride เทลงในขวดรูปชมพู่ขนาดใหญ่ เติมเกาลีน (Kaolin) ลงไป 20 กรัม เขย่านาน 15 นาที แล้วกรอง สารละลายที่ได้เรียกว่า สารละลาย B

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ปิเปตสารละลาย A มา 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 1 ลิตร เติมสารละลาย indigo carmine ลงไป 25 มิลลิลิตร ปรับให้ปริมาตรทั้งหมดเป็น 750 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำสารละลายโปแตสเซียมเปอร์แมงกาเนต ความเข้มข้น 0.008 โมล่าร์ ใส่ในบิวเรต ค่อยๆ หยดใส่ลงในขวดรูปชมพู่ครั้งละ 1 มิลลิลิตร เขย่าขณะทำการไตเตรชั่น สีจะค่อยๆเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีเหลืองและสีชมพูอ่อน หยุดไตเตรตเมื่อได้สีชมพูอ่อน จดปริมาตรของสารละลายโปแตสเซียมเปอร์แมงกาเนตที่ใช้ = A มิลลิลิตร

ปิเปตสารละลาย B มา 25 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 1 ลิตร เติมสารละลาย indigo carmine ลงไป 25 มิลลิลิตร ปรับให้ปริมาตรทั้งหมดเป็น 750 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น ไตเตรตเช่นเดียวกันสารละลาย A จนได้สีชมพูอ่อนจดปริมาตรของสารละลายโปแตสเซียมเปอร์ แมงกาเนตที่ใช้ = B มิลลิลิตร โดยคำนวณจากสมการ 3.1, 3.2, 3.3

25 มิลลิลิตร สารละลาย B = 10 มิลลิลิตร สารละลาย A = 0.1 กรัมชาตัวอย่าง ปริมาตรสารละลายโปแตสเซียมเปอร์แมงกาเนตที่ใช้ไตเตรตกับแทนนิ= (A – 4.0) - (B – 4.5)

4.0 และ 4.5 เป็นค่า blank ของสารละลาย A และ B ตามลำดับ คำนวณหาปริมาณแทนนิน ต่อน้ำหนักแห้ง

3.2.3 การเตรียมสารสกัดชาเขียว (Maisuthisakul *et al*., 2007)

ชั่งน้ำหนักชาแห้งบดละเอียดผสมกับ 95% เอทานอลในอัตราส่วน 1:5 (w/v) ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าสาร ที่ความเร็ว 27.8 rpm เป็นเวลา 4 ชั่วโมง 30 นาที จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 11 เซนติเมตร (whatman, England) โดยใช้ปั๊มสุญญากาศ นำสารละลายที่ได้มาทำการแยกสารสกัดกับ 95% เอทานอลออกจากกันโดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 180 rpm นำสารสกัดที่ได้ไปทำแห้งโดยใช้เครื่อง Freeze-drier (LABCONCO, USA) จนได้ผงสารสกัด เพื่อนำไปทำการวิเคราะห์ต่อไป

3.2.4 การวิเคราะห์ปริมาณฟีโนลิกทั้งหมดโดยวิธี Folin-Ciocalte colorimetric method (Kahkonen *et al*., 1999; Ragazzi and Veronase, 1973)

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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ขวดสีชา เติม Folin-Ciocalteu reagent 2.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3 นาที เติมโซเดียมคาร์บอเนต 7.5 % (w/v) 2 มิลลิลิตร กวนผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม (vortex mixer) เก็บไว้ในที่มืด 60 นาที ที่อุณหภูมิห้องก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงเพื่อหาช่วงความยาวคลื่นที่ดีที่สุดคือ ความยาวคลื่น 775 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Model Genesys10 UV Scaning, USA) หาปริมาณรวมของสารประกอบฟีโนลิก โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก (gallic acid) และรายงานผลเป็นเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้งของชา

3.2.5 การวิเคราะห์กิจกรรมสารแอนติออกซิแดนท์ โดย DPPH method (Masuda *et al*., 1999 and Maisuthisakul *et al*., 2007)

ชั่งน้ำหนักตัวอย่างสารสกัดชาเขียว 0.25 กรัม ผสมกับเมทานอล ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 25 มิลลิลิตร จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 10^{-1} ใช้ไมโครปิเปตต์ดูดสารละลายปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 25 มิลลิลิตรด้วยเมทานอล จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 10^{-2} อีกส่วนใช้ไมโครปิเปตต์ดูดสารละลายที่เหลือใส่ในขวดสีชา 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 เพื่อหาค่ากิจกรรมของสารแอนติออกซิแดนท์ ในรูปของ 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

3.2.6 การวิเคราะห์ปริมาณคาเทชินโดย HPLC (Chen *et al*., 2001; Zang *et al*., 1997)

วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบคาเทชินได้แก่ EGCG EGC ECG EC และ คาเทชินในสารสกัดชาเขียวโดย High performance Liquid Chromatography (HPLC) เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน EGCG EGC ECG EC และ คาเทชิน (Sigma-Aldrich, USA) โดยใช้อะซีโตไนไตรล์ (Acetonitrile: CH_3CN, HPLC grade, Lab-scan, Ireland) เอทิลอะซีเตรท (ethyl acetate) และน้ำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ปราศจากไอออน (deionize water) หรือน้ำดีไอ (DI) เป็นโมบายเฟส (mobile phase) โดยมีขั้นตอนการเตรียมสารละลายมาตรฐาน และการเตรียมตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์ดังนี้

3.2.6.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานเพื่อวิเคราะห์ HPLC

ชั่งสารละลายมาตรฐาน EGCG 0.00229 g ปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI 1 ml ความเข้มข้น5 mM
ชั่งสารละลายมาตรฐาน EGC 0.00153 g ปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI 1 ml ความเข้มข้น5 mM
ชั่งสารละลายมาตรฐาน ECG 0.00221 g ปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI 1 ml ความเข้มข้น5 mM
ชั่งสารละลายมาตรฐาน EC 0.00145 g ปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI 1 ml ความเข้มข้น5 mM
ชั่งสารละลายมาตรฐาน คาเทชิน 0.00145 g ปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI 1 ml ความเข้มข้น5 mM
จากนั้นเจือจางลงเป็น 2.5 1.25 0.625 0.3125 mM

3.2.6.2 การเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ HPLC

ใบชาเขียวแห้ง 2 กรัม ปั่น/บด ให้ละเอียด นำมาสกัดด้วยน้ำร้อน 100 มิลลิลิตร 80 ^{o}C นาน 15 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้องกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์1(Whatman No.1) นำสารสกัดกรองอีกครั้งด้วย cellulose acetate membrane (Whatman, 0.45 μm pore size) ฉีดสารสกัด (20 mg/ ml) จำนวน 50 ไมโครลิตรเข้า column (Spherosorb-ODS2 type analytical column, 250x4.6 mm, 5 μm) โมบายเฟสประกอบด้วย 0.05% H_2SO_4, acetonitrile และ ethyl acetate (86:12:2, v/v/v) อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตร / นาที ในช่วงความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรใช้เวลาทั้งหมด 40 นาที

วิธีการวิจัย แบ่งออกเป็น 4 ตอน ประกอบด้วย

ตอนที่ 1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการอบแห้งชาเขียวด้วยไมโครเวฟสุญญากาศ
ตอนที่ 2 การศึกษาปริมาณสารสกัดสมุนไพรที่มีต่อปริมาณคาเทชินในชาเขียว
ตอนที่ 3 การพัฒนาผลิตภัณฑ์ชาเขียวผสมตะไคร้และชะเอม
ตอนที่ 4 การศึกษาการยอมรับผลิตภัณฑ์สุดท้ายของผู้บริโภค
โดยแต่ละขั้นตอนของการทดลองมีวิธีการดังต่อไปนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตอนที่ 1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการอบแห้งชาเขียวด้วยไมโครเวฟสุญญากาศ

วัตถุดิบคือ ชาอัสสัมสดจากไร่ชาระมิงค์ จำนวน 1 กิโลกรัม นำมาทำแห้งด้วยเครื่องไมโครเวฟสุญญากาศ (MarchCool, Co., Thailand) โดยศึกษา 2 ปัจจัย ได้แก่ กำลังไมโครเวฟ 3 ระดับ 3,200 3,600 และ 4,000 วัตต์ และเวลาในการทำแห้ง 3 ระดับ 20, 30 และ 40 นาที วางแผนการทดลองแบบ 3^2 Factorial (3 ซ้ำ) นำตัวอย่างชาอบแห้งมาตรวจสอบคุณภาพดังนี้

การวิเคราะห์

- การวัดค่าสี L* a* b* และ ΔE* โดยระบบ CIE วัดโดยเครื่องวัดสี Hunter Lab
- ความชื้น (AOAC, 2000)
- ปริมาณของแข็งทั้งหมด (AOAC, 2000)
- ค่าวอเตอร์แอคติวิตี (a_w, AquaLab LITE, USA)
- ปริมาณเถ้าทั้งหมด (AOAC, 2000)

การทดสอบการยอมรับของผู้บริโภค

ผู้บริโภคจำนวน 150 คนโดยวิธีหาคะแนนความชอบให้อัตราความชอบเป็น 9 คะแนน โดยที่ 1 คือไม่ชอบมากอย่างยิ่ง 5 คือ เฉยๆ และ 9 คือ ชอบมากอย่างยิ่ง (Meilgaard *et al*., 2007) ประเมินในด้านความชอบโดยรวม, สี, กลิ่น และกลิ่นรส การเตรียมตัวอย่าง ชาเขียวที่อบแห้งด้วยไมโครเวฟสุญญากาศจำนวน 1 g แช่ในน้ำร้อนอุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที โดยเสิร์ฟตัวอย่างชาที่อุณหภูมิ 65-70 องศาเซลเซียส ในถ้วยพลาสติก 20 ml ประเมินความชอบและการยอมรับ

ตอนที่ 2 การศึกษาผลของสารสกัดตะไคร้และชะเอมที่มีต่อปริมาณคาเทชินในชาเขียว

การศึกษาระดับความเข้มข้นของสารสกัดตะไคร้ (0%, 1%, 2 %) และความเข้มข้นของสารสกัดชะเอม (0%, 1%, 2 %) ต่อปริมาณสารคาเทชินในสารสกัดชาเขียว โดยในการศึกษาจะกำหนดระดับความเข้มข้นของสารสกัดชาเขียวไว้ที่ 2 % และใช้ระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยาโดยการเขย่าเป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง วางแผนการทดลองแบบ 3^2 Factorial experiment ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยมีปัจจัยในการศึกษาดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 3.2 ระดับปัจจัยที่ใช้ในการศึกษาระดับความเข้มข้นของสารสกัดตะไคร้และชะเอมต่อปริมาณสาระสำคัญในสารสกัดชาเขียว

ปัจจัยที่ศึกษา	ระดับต่ำ (-)	ระดับกลาง (0)	ระดับสูง (+)
A. สารสกัดตะไคร้ (%)	**0**	**1**	**2**
B. สารสกัดชะเอม (%)	**0**	**1**	**2**

ตาราง 3.3 สิ่งทดลองจากการวางแผนการทดลองแบบ 3^2 Factorial experiment

3^2 Factorial experiment	สิ่งทดลอง	สารสกัดตะไคร้ (%)	สารสกัดชะเอม (%)
	1	**0**	**0**
A → a1 (-)	**2**	**0**	**1**
A → a2 (0)	**3**	**0**	**2**
A → a3 (+)	**4**	**1**	**0**
	5	**1**	**1**
B → b1 (-)	**6**	**1**	**2**
B → b2 (0)	**7**	**2**	**0**
B → b3 (+)	**8**	**2**	**1**
	9	**2**	**2**

การวิเคราะห์

- ปริมาณฟีนอลิคทั้งหมด โดยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric method
- กิจกรรมสารแอนติออกซิแดนท์ โดยวิธี DPPH method
- วิเคราะห์ EGCG EGC ECG คาเทชิน และ EC ด้วย High performance liquid chromatography (HPLC) ดัดแปลงจาก Chen, *et al*., (2001)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตอนที่ 3 การพัฒนาสูตรผลิตภัณฑ์ชาเขียวผสมตะไคร้และชะเอม

3.1 การหาสูตรพื้นฐานผลิตภัณฑ์ชาเขียวผสมตะไคร้และชะเอม

การเตรียมตัวอย่าง

นำชาเขียวผสมกับตะไคร้และชะเอม โดยมีอัตราส่วนของส่วนผสมทั้ง 4 สูตร ดังนี้ ชาเขียว (50-80%) ชะเอม (10-40%) และตะไคร้ (10-40%) ดังตาราง 3.4

ตาราง 3.4 อัตราส่วนผสมของสูตรชาเขียวผสมตะไคร้และชะเอม

สูตร	ชาเขียว (%)	ตะไคร้ (%)	ชะเอม (%)
1	50	40	10
2	50	25	25
3	50	10	40
4	80	10	10

การวิเคราะห์

- การวัดค่าสี L* a* b* และ ΔE^* โดยระบบ CIE วัดโดยเครื่องวัดสี Hunter Lab
- ความชื้น (AOAC, 2000)
- ปริมาณของแข็งทั้งหมด (AOAC, 2000)
- ค่าวอเตอร์แอคติวิตี (a_w, AquaLab LITE, USA)
- ปริมาณเถ้าทั้งหมด (AOAC, 2000)

การทดสอบการยอมรับ ของผู้บริโภค

การทดสอบการยอมรับของผู้บริโภค จากผู้บริโภคจำนวน 100 คน โดยวิธี 9-point Hedonic scaling (Resurreccion, 1998; Meilgaard *et al*., 2007). ให้อัตราความชอบเป็น 9 คะแนน โดยที่ 1 คือไม่ชอบมากอย่างยิ่ง 5 คือ เฉยๆ และ 9 คือชอบมากอย่างยิ่ง (Meilgaard *et al*., 1999) การเตรียมตัวอย่างชาผสมตะไคร้และชะเอมทั้ง 4 สูตร จำนวน 1 g แช่ในน้ำร้อนอุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที โดยเสิร์ฟตัวอย่างชาที่อุณหภูมิ 65-70 องศาเซลเซียส ในถ้วยพลาสติก 20 ml ประเมินในด้านความชอบโดยรวม สี กลิ่นโดยรวม กลิ่นรสชา กลิ่นรสตะไคร้ กลิ่นรสชะเอม รสชาติโดยรวม และความรู้สึกหลังชิม นอกจากนั้นทำการสอบถามความเห็นของผู้บริโภค เพื่อหาทิศทาง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ชาเขียวผสมตะไคร้และชะเอม โดยใช้วิธี just about right (Meilgaard *et al*., 2007) ดังแสดงในแบบสอบถามภาคผนวก ข-2

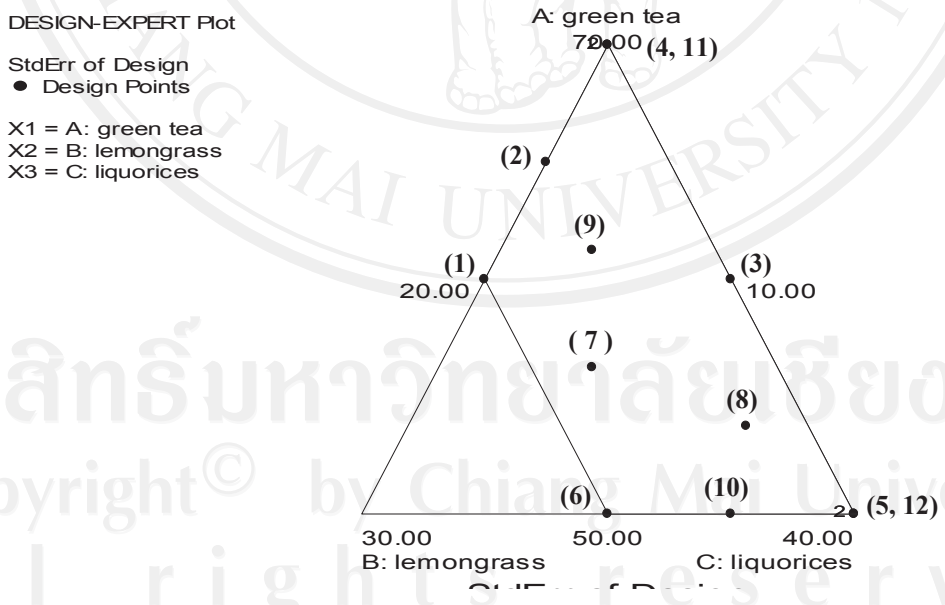
3.2 การพัฒนาสูตรที่เหมาะสมในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ชาเขียวผสมตะไคร้และชะเอม

การพัฒนาสูตรผลิตภัณฑ์ชาเขียวผสมตะไคร้และชะเอม การทดลองนี้จะหาสัดส่วนที่เหมาะสมของส่วนผสมต่างๆ เพื่อให้ได้สูตรที่ผู้ทดสอบชอบมากที่สุด โดยใช้แผนการทดลอง Mixture Design แบบ D-optimal ซึ่งเป็นแผนการทดลองที่ใช้ในการหาส่วนผสมของสูตรที่เหมาะสม (optimization) โดยให้ได้ปริมาณคาเทชินที่เหมาะสมที่ผู้บริโภคยอมรับได้ เพื่อหาสูตรและคุณสมบัติที่เหมาะสมของผลิตภัณฑ์ชาเขียวผสมตะไคร้และชะเอมจากแผนการทดลอง mixture design ได้สิ่งทดลอง 12 สูตร (ภาพ 3.1) ซึ่งมีส่วนผสมในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน ดังแสดงในตาราง 3.5 โดยมีปัจจัยที่ศึกษาดังนี้

ปริมาณชาเขียว 50-70 %

ปริมาณตะไคร้ 10-20 %

ปริมาณชะเอม 20-40%



ภาพ 3.1 สิ่งทดลองจากการวางแผนแบบ mixture design แบบ D-optimal

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 3.5 สิ่งทดลองของการทดลองแบบ mixture design แบบ D-optimal ทั้ง 3 ปัจจัย

สิ่งทดลอง	ชาเขียว (%)	ตะไคร้ (%)	ชะเอม (%)
1	60	20	20
2	65	15	20
3	60	10	30
4	70	10	20
5	50	10	40
6	50	20	30
7	56.25	17.50	26.25
8	53.75	12.50	33.75
9	61.25	15	23.75
10	50	15	35
11	70	10	20
12	50	10	40

การวิเคราะห์

- การวัดค่าสี L* a* b* และ ΔE* โดยระบบ CIE วัดโดยเครื่องวัดสี Hunter Lab
- ความชื้น (AOAC, 2000)
- ปริมาณของแข็งทั้งหมด (AOAC, 2000)
- ค่าวอเตอร์แอคติวิตี (a_w, AquaLab LITE, USA)
- ปริมาณเถ้าทั้งหมด (AOAC, 2000)
- ปริมาณฟีนอลิคทั้งหมด โดยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric method
- กิจกรรมสารแอนติออกซิแดนท์ โดยวิธี DPPH method
-วิเคราะห์ EGCG EGC ECG คาเทชิน และ EC ด้วย HPLC
ดัดแปลงจาก Chen, *et al*., (2001)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การวิเคราะห์ทางประสาทสัมผัสเชิงพรรณนา (descriptive sensory analysis)

ทำการคัดกรองผู้ทดสอบที่มีความสามารถในการรับรู้ทางประสาทสัมผัส โดยใช้แบบสอบถามคัดกรองเบื้องต้น (prescreening questionnaire) และแบบทดสอบการอ่านสเกล โดยคัดเลือกผู้ทดสอบที่สามารถตอบคำถามได้ชัดเจนถูกต้องไม่ต่ำกว่า 80% และข้อสอบชุดการอ่านสเกลต้องอ่านได้ถูกต้องและผิดพลาดได้ไม่เกิน 10% จากนั้นจึงทำการทดสอบด้านความเฉียบแหลม (acuity test) โดยให้ผู้ทดสอบทำแบบทดสอบ Triangle test, Duo-trio test และ Ranking test กำหนดเกณฑ์ผู้ที่ผ่านเข้ารอบต่อไป คือ มีความสามารถแยกความแตกต่างในแบบทดสอบ Triangle test ถูกต้อง 50-60% Duo-trio test ถูกต้อง 70-80% และผู้ที่ผ่านการทดสอบการจัดอันดับสามารถจัดอันดับได้ถูกต้องมากกว่า 80% จากนั้นคัดกรองให้ได้ผู้ทดสอบที่มีความเหมาะสมที่สุดผ่านเข้าสู่ขั้นตอนการฝึกหัดจำนวน 10 คน ประกอบด้วยผู้ทดสอบเพศชาย 3 คน และหญิง 7 คน โดยเป็นนักศึกษาในระดับปริญญาโทจำนวน 10 คน จากสาขาวิชาเทคโนโลยีการพัฒนาผลิตภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จากนั้นทำการเปิดอภิปรายกลุ่มเพื่อฝึกฝนผู้ทดสอบให้เข้าใจและประเมินผลไปในทิศทางเดียวกัน โดยใช้เวลาฝึกฝน 8 ชั่วโมง (2 ชั่วโมง/การประชุม) ได้ผลดังนี้

การประชุมครั้งที่ 1

ทำการเปิดอภิปรายกลุ่มเพื่อหาคุณลักษณะที่สำคัญของชาเขียว โดยผู้ทดสอบสามารถระบุคุณลักษณะที่สำคัญของชาเขียวตามลำดับการรับรู้ก่อน-หลัง โดยแบ่งเป็น ด้านลักษณะปรากฏ ด้านกลิ่น ด้านกลิ่นรส และความรู้สึกหลังกลืน

การประชุมครั้งที่ 2

สำหรับการประชุมครั้งนี้ ให้ผู้ทดสอบทำการคัดเลือกตัวอย่างอ้างอิงที่เหมาะสมในแต่ละคุณลักษณะ

การประชุมครั้งที่ 3

เตรียมตัวอย่างอ้างอิงที่เหมาะสมในแต่ละคุณลักษณะที่ความเข้มข้น 2 ระดับ แล้วเปิดอภิปรายกลุ่มเพื่อหาระดับความเข้ม (intensity) ของตัวอย่างอ้างอิงโดยใช้ความเห็นร่วมกัน

การประชุมครั้งที่ 4

ฝึกการประเมินตัวอย่างชาเขียวผสม (warm-up sample) โดยเสนอตัวอย่างชาเขียวผสมซึ่งเป็นตัวอย่างที่เสนอให้ผู้ทดสอบก่อนการประเมินตัวอย่างจริง (warm-up sample) โดยให้ผู้ทดสอบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ให้คะแนนความเข้มของตัวอย่างทุกคุณลักษณะ โดยทำเครื่องหมายขีด (|) ลงบนเส้นตรงตามระดับรู้สึกของแต่ละคน แล้วจึงสรุประดับความเข้มข้นโดยใช้ความเห็นคิดเห็นร่วมกัน

หลังจากฝึกฝนผู้ทดสอบจนครบ 4 ครั้งแล้ว จึงทำการประเมินตัวอย่างชาเขียวผสมตะไคร้และชะเอมจำนวน 12 ตัวอย่าง โดยทดสอบซ้ำ 2 ครั้ง จากแบบทดสอบการประเมินผลิตภัณฑ์ทำการวัดระยะทางบนสเกลเส้นตรงในหน่วยมิลลิเมตร จากปลายซ้ายสุดถึงตำแหน่งที่ผู้ทดสอบแต่ละคนทำเครื่องหมายขีด (|) ไว้ในแต่ละคุณลักษณะ จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA)

การทดสอบการยอมรับของผู้บริโภค

ทดสอบผู้บริโภคจำนวน 100 คน โดยใช้ Hedonic scaling 9 point (Meilgaard *et al*., 2007) เพื่อหาสูตรที่ผู้บริโภคให้การยอมรับมากที่สุดในผลิตภัณฑ์ที่ทำการพัฒนา แล้วทำการแสดงผลเป็นค่าเฉลี่ยและหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตอนที่ 4 การศึกษาคุณภาพและการยอมรับของผู้บริโภคต่อผลิตภัณฑ์สุดท้าย

การทดสอบการยอมรับ ของผู้บริโภค

โดยใช้ผู้บริโภคทั้งหมด 200 คน ใช้วิธีการทดสอบแบบ 9-point hedonic scale ทดสอบทั้งในด้าน สี กลิ่น รสชาติ ความฝาดเฝื่อน ความรู้สึกหลังชิม และความชอบโดยรวม พร้อมตัดสินด้านการยอมรับ และการซื้อ

การตรวจสอบคุณภาพผลิตภัณฑ์สุดท้าย

การตรวจสอบคุณภาพผลิตภัณฑ์สุดท้าย จะทำการตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพเคมีของผลิตภัณฑ์ชาเขียวผสมตะไคร้และชะเอม

การวิเคราะห์

- การวัดค่าสี L* a* b* และ ΔE* โดยระบบ CIE วัดโดยเครื่องวัดสี Hunter Lab
- ความชื้น (AOAC, 2000)
- ปริมาณของแข็งทั้งหมด (AOAC, 2000)
- ค่าวอเตอร์แอคติวิตี (a_w, AquaLab LITE, USA)
- ปริมาณเถ้าทั้งหมด (AOAC, 2000)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- ปริมาณฟีนอลิคทั้งหมด โดยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric method
- กิจกรรมสารแอนติออกซิแดนท์ โดยวิธี DPPH method
- วิเคราะห์ EGCG EGC ECG คาเทชิน และ EC ด้วย HPLC

ดัดแปลงจาก Chen, *et al*., (2001)

การวิเคราะห์ทางสถิติ

จากการวางแผนการทดลองแบบ 3^2 Factorial วิเคราะห์ค่าทางเคมีกายภาพทั้งหมด 3 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน MANOVA (กัลยา, 2549) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS 11.0 (SPSS Inc., Chicago, USA)

วิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) ความแตกต่างของสิ่งทดลองด้วยวิธี Duncan' new multiple range test (DMRT) และวิเคราะห์ Logistic regression เพื่อศึกษาการยอมรับและการตัดสินใจซื้อผลิตภัณฑ์ชาเขียวผสมตะไคร้และชะเอม

ข้อมูลที่ได้จากการวัดคุณภาพทางด้านประสาทสัมผัส นำมาวิเคราะห์หาช่วงของสูตรที่เหมาะสม (optimization) ใช้วิธีการพื้นผิวตอบสนอง (RSM) โดยใช้โปรแกรม Design-expert version 6.0.10 (Statease Inc., USA) ค่าที่ใช้ในการคัดเลือกระดับของส่วนผสมที่เหมาะสมในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ชาเขียวผสมตะไคร้และชะเอม คือ คะแนนการยอมรับคุณภาพทางประสาทสัมผัสในด้านลักษณะความชอบโดยรวม กลิ่นรสโดยรวม ความฝาดเฝื่อน และความรู้สึกหลังกลืน อย่างน้อย 6 (Resurreccion, 1998) มีปริมาณ EGCG และ EGC สูง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved