บทที่ 3
อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบ และอุปกรณ์

1) ใบบัวบก (*Centella asiatica* (Linn.) Urban) ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ได้จากโครงการหลวง ซึ่งมีแหล่งเพาะปลูกจากดอยอินทนนน์ จังหวัดเชียงใหม่ ในเดือน มิถุนายน 2552 อายุการเก็บเกี่ยว 60-90 วัน โดยได้คัดเลือกเฉพาะใบที่มีสีเขียว และตัดก้านบัวบกให้มีความยาวจากฐานใบประมาณ 2-3 เซนติเมตร เพื่อนำไปเตรียมสกัดน้ำใบบัวบก

2) แคปปาร์-คาร์ราจีแนน (GC 300 : บริษัทไทยฟูดส์แอนด์เคมีคอล)

3) โลคัสต์บีนกัม (บริษัทไทยฟูดส์แอนด์เคมีคอล)

4) น้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์ (บริษัท น้ำตาลทรายมิตรผล จำกัด)

5) ถุงฟอยล์ (ไนลอนลามิเนตกับโพลีเอธิลีนเคลือบด้วยอลูมิเนียมฟอยล์)

6) ถุงไนลอน/โพลีเอทิลีน (ไนลอนลามิเนตกับโพลีเอธิลีน)

7) ถุงโพลีโพรพิลีน (บริษัทลีดเดอร์แพค)

8) เทอร์โมมิเตอร์ (Thermometer, Testo : 106-T1, England)

9) เครื่องสับ

10) เครื่องอัดไฮโดรลิก (Hydraulic press)

11) เครื่องปิดผนึกสุญญากาศ (Vacuum sealer, Audiovac : VM2010, USA)

12)เครื่องลดความชื้นแบบปั๊มความร้อนภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลต(Heat pump dehumidifier, บริษัท มาร์ชคูล อินดัชทรี จำกัด)

13) เครื่องอินฟราเรดภายใต้สุญญากาศ (Infrared vacuum dryer, บริษัท เฟบิกซ์ อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด, ประเทศไทย)

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

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

16) เครื่องเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง (Centrifuge: Model Rotina 46R, Germany)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การเตรียมน้ำใบบัวบก

ในการศึกษาครั้งนี้ มีขั้นตอนการเตรียมน้ำสกัดใบบัวบก โดยวิธีการคั้นสด (รูป 3.1) โดยนำใบบัวบกที่เตรียมไว้ ไปล้างด้วยน้ำสะอาด 5 ครั้ง สะเด็ดน้ำออก ผสมน้ำสะอาดที่ผ่านการต้มฆ่าเชื้อแล้วในอัตราส่วนของใบบัวบกต่อน้ำ 3 ต่อ 1 โดยน้ำหนัก หลังจากนั้นนำไปสับให้ละเอียดด้วยเครื่องสับ และสกัดแยกน้ำด้วยเครื่องอัดไฮโดรลิก (hydraulic press) นำน้ำใบบัวบกที่ได้ไปวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ เคมี และจุลชีววิทยา น้ำใบบัวบกส่วนที่เหลือนำไปบรรจุในถุงพลาสติกชนิดพอลีเอทธีลีน (Polyethylene; PE) ถุงละ 500 กรัม เก็บไว้ในตู้แช่แข็งที่มีอุณหภูมิ -18°ซ เพื่อใช้ตลอดการทดลอง ขั้นตอนการสกัดน้ำใบบัวบกแสดงดังรูป 3.1

รูป 3.1 ขั้นตอนการเตรียมน้ำใบบัวบก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.2 วิธีวิจัย

การทดลองแบ่งออกเป็น 4 ตอน ดังนี้

ตอนที่ 1 ศึกษาคุณภาพทางด้านกายภาพ เคมี และจุลชีววิทยาของน้ำใบบัวบกสด

การวิเคราะห์ทางกายภาพ

1) ค่าสี ด้วยเครื่องวัดสี (Chroma meter, Minolta : CR-310, Japan)

การวิเคราะห์ทางเคมี

1) ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) โดยใช้เครื่องวัดความเป็นกรด- ด่าง (Microprocesser pH meter WTW : pH 537, Germany) (AOAC, 2000)

2) ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (total soluble solid) ด้วยเครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (Hand Refractometer, ATAGO, Japan)

3) ปริมาณอะเซียติโคไซด์ (asiaticoside) และกรดอะเซียติก (asiatic acid) ในน้ำใบบัวบกด้วย HPLC โดยดัดแปลงจากวิธีการวิเคราะห์ของ Inamdar (1996)

สารเคมี

1. สารมาตรฐานกรดอะเซียติก (Fluka Analytical, France)
2. สารมาตรฐานอะเซียติโคไซด์ (Fluka Analytical, France)
3. เมทธานอล (methanol HPLC grade; Fisher Scientific, UK.)
4. Acetonitrile (HPLC grade; Lab-Scan analytical science)
5. น้ำ (water HPLC grade; Lab-Scan analytical science)

การเตรียมตัวอย่าง

1. นำตัวอย่างน้ำใบบัวบกผงที่ผ่านการอบแห้งด้วยเครื่องอบแห้งแบบแช่เยือกแข็ง 1 กรัม ละลายด้วยสารละลายผสมของเมทานอลต่อน้ำ ในอัตราส่วน 9 ต่อ 1 โดยปริมาตร ปริมาณ 10 มิลลิลิตร สกัดไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 5 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4

2. นำสารละลายที่ได้ไประเหยเอาตัวทำละลายออก (evaporated) จนแห้ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. ละลายตะกอนที่ได้ด้วยสารละลายผสมของเมทานอลต่อน้ำ อัตราส่วน 9 ต่อ 1โดยปริมาตร แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 10 มิลลิลิตร

4. กรองสารละลายด้วย membrane filter ที่มีความละเอียด 0.45 ไมโครเมตร แล้วจึงนำไปวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง HPLC

Condition ของ HPLC – UV/Vis Detection Analyses

Column : C18 (GL Science Inc, Japan)

Reversed phase Column : Acetonitrile (สารละลาย A) และน้ำ (สารละลาย B)

อัตราเร็ว : 1.4 มิลลิลิตรต่อนาที

อุณหภูมิ : อุณหภูมิห้อง

ปริมาตรของตัวอย่างที่ฉีดเข้า column : 20 ไมโครลิตร

UV detector : 220 นาโนเมตร

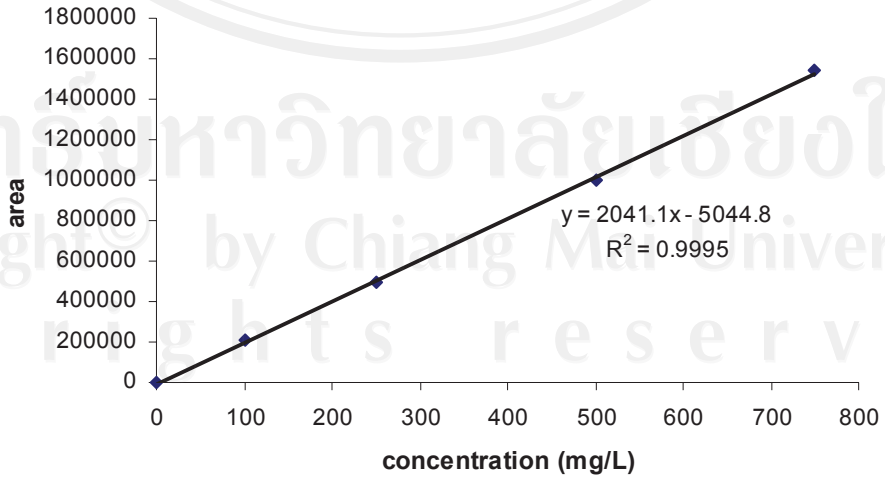
การควบคุม mobile phase โดยใช้ระบบ gradient

นาทีที่ 0 B ร้อยละ 80 A ร้อยละ 20

นาทีที่ 30 B ร้อยละ 45 A ร้อยละ 55

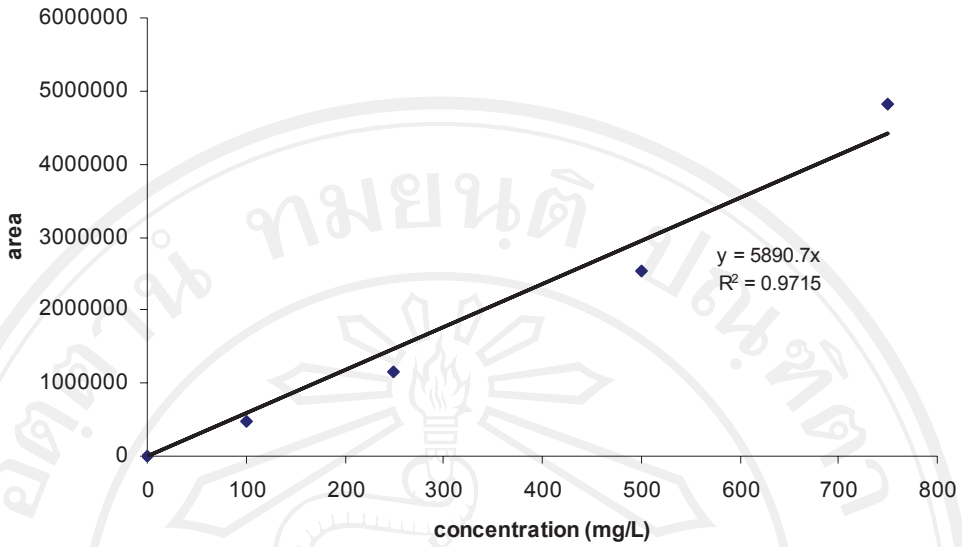
นาทีที่ 45 B ร้อยละ 80 A ร้อยละ 20

กราฟมาตรฐาน



รูป 3.2 กราฟมาตรฐานอะเซียติโคไซด์ (มิลลิกรัมต่อลิตร)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูป 3.3 กราฟมาตรฐานกรดอะเซียติก (มิลลิกรัมต่อลิตร)

การคำนวณหาปริมาณอะเซียติโคไซด์

นำค่าที่อ่านได้จากสารละลายอะเซียติโคไซด์มาตรฐานที่เตรียมไว้ในขั้นตอนการสร้างกราฟมาตรฐาน มาคำนวณหาสูตรสมการเส้นตรงได้ ดังนี้

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

โดย y = พื้นที่ที่อ่านได้ของตัวอย่างอะเซียติโคไซด์

x = ปริมาณอะเซียติโคไซด์ในตัวอย่าง (มิลลิกรัมต่อลิตร)

จากนั้นนำค่า x ที่ได้มา คำนวณปริมาณอะเซียติโคไซด์ในตัวอย่าง ต่อไป

ตัวอย่าง ปริมาณอะเซียติโคไซด์ในสารละลายน้ำใบบัวบกมีเท่ากับ 13.2 (มิลลิกรัมต่อลิตร)

สารละลายเจือจางปริมาตร 1000 มิลลิลิตร มีปริมาณอะเซียติโคไซด์

= 13.2 มิลลิกรัม

สารละลายเจือจางปริมาตร 10 มิลลิลิตร มีปริมาณอะเซียติโคไซด์

$= (13.2 \times 10)/1000$

= 0.132 มิลลิกรัม

ปริมาณอะเซียติโคไซด์ที่ได้มาจากตัวอย่างน้ำใบบัวบกแห้ง 1 กรัม

ตัวอย่างน้ำใบบัวบกแห้ง 1 กรัม ได้มาจากน้ำใบบัวบก 38.73 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

น้ำใบบัวบกสด 38.73 มิลลิลิตร จะมีปริมาณอะเซียติโคไซด์

= 0.132 มิลลิกรัม

ดังนั้นน้ำใบบัวบกสด 100 มิลลิลิตร จะ มีปริมาณอะเซียติโคไซด์

= (0.132 x 100)/38

= 0.34 มิลลิกรัมต่อหนึ่งร้อยมิลลิลิตร

การคำนวณหาปริมาณกรดอะเซียติก

นำค่าที่อ่านได้จากสารละลายกรดอะเซียติกมาตรฐานที่เตรียมไว้ในขั้นตอนการสร้างกราฟมาตรฐาน มาคำนวณหาสูตรสมการเส้นตรงได้ ดังนี้

$y = 5890.7x$ โดยที่ $R^2 = 0.9715$

โดย y = พื้นที่ที่อ่านได้ของตัวอย่างกรดอะเซียติก

x = ปริมาณกรดอะเซียติกในตัวอย่าง (มิลลิกรัมต่อลิตร)

จากนั้นนำค่า x ที่ได้มา คำนวณปริมาณกรดอะเซียติกในตัวอย่าง ต่อไป

ตัวอย่าง ปริมาณกรดอะเซียติกในสารละลายน้ำใบบัวบกมีเท่ากับ 281.69 มิลลิกรัมต่อลิตร

สารละลายเจือจางปริมาตร 1000 มิลลิลิตร มีปริมาณกรดอะเซียติก

= 281.69 มิลลิกรัม

สารละลายเจือจางปริมาตร 10 มิลลิลิตร มีปริมาณกรดอะเซียติก

= (281.69×10)/1000 มิลลิกรัม

= 2.816 มิลลิกรัม

ปริมาณกรดอะเซียติกที่ได้มาจากตัวอย่างน้ำใบบัวบกแห้ง 1 กรัม

ตัวอย่างน้ำใบบัวบกแห้ง 1 กรัม ได้มาจากน้ำใบบัวบก 38.73 มิลลิลิตร

น้ำใบบัวบกสด 38.73 มิลลิลิตร จะมีปริมาณกรดอะเซียติก

= 2.816 มิลลิกรัม

ดังนั้นน้ำใบบัวบกสด 100 มิลลิลิตร จะ มีปริมาณกรดอะเซียติก

= (2.816×100)/38.7 มิลลิกรัม

=7.27 มิลลิกรัมต่อหนึ่งร้อยมิลลิลิตรมิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4) ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดในน้ำใบบัวบก โดยใช้วิธีทางสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ตามวิธีการวิเคราะห์ของ Tsai *et al.* (2005)

สารเคมี

1. สารมาตรฐานกรดแกลลิก (gallic acid; Purum AR, 100 gm : Fluka, Germany)
2. เอทานอล (ethanol; Fisher Scientific, UK.)
3. folin-ciocalteu reagent (VWR International SAS 20)
4. โซเดียมคาร์บอเนตแอนไฮดรัส (sodium carbonate anhydrous)

การเตรียมสารเคมี

1. สารละลายเอทานอลที่ผ่านการแช่เย็น ความเข้มข้นร้อยละ 80 เตรียมโดยตวงเอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 95 ปริมาตร 210.5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตร ด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 250 มิลลิลิตร

2. folin-ciocalteu reagent ความเข้มข้นร้อยละ 10 เตรียมโดยปิเปต folin-ciocalteu reagent ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

3. สารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 7.5 เตรียมโดยชั่งโซเดียมคาร์บอเนตแอนไฮดรัส 7.5 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

4. ชั่งสารมาตรฐานกรดแกลลิค 0.01 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

การสร้างกราฟสารประกอบฟีนอลมาตรฐาน

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

2. เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรรวมเท่ากับ 500 ไมโครลิตร

3. เติมสารละลาย folin-ciocalteu reagent ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมแล้ววางไว้ เป็นเวลา 8 นาที

4. เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 7.5 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมแล้ววางไว้ 2 ชั่วโมง

5. นำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การวิเคราะห์ตัวอย่าง

1. ชั่งตัวอย่าง 3 กรัม ใส่ในโกร่งบดที่แช่เย็นแล้ว

2. เติมเอทานอลเย็นความเข้มข้นร้อยละ 80 ปริมาตร 12 มิลลิลิตร บดให้เข้ากัน

3. นำไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงหนีศูนย์กลางด้วยความเร็ว 3000 x g ที่อุณหภูมิ 4°ซ เป็นเวลา 20 นาที

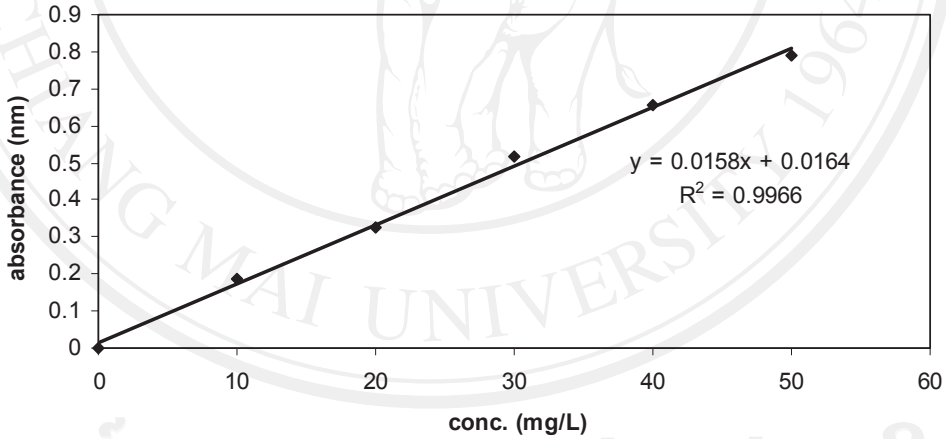
4. นำของเหลวใสที่ได้ 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ให้ครบ 10 มิลลิลิตร

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

6. เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 7.5 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมแล้ววางไว้ 2 ชั่วโมง

7. นำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร

กราฟมาตรฐาน



รูป 3.4 กราฟมาตรฐานสารประกอบฟีนอลทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อลิตร)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด

นำค่าที่อ่านได้จากสารประกอบฟีนอลมาตรฐานที่เตรียมไว้ในขั้นตอนการสร้างกราฟมาตรฐาน มาคำนวณหาสูตรสมการเส้นตรงได้ ดังนี้

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

โดย y = ค่าดูดกลืนแสงที่อ่านได้ของตัวอย่างสารประกอบฟีนอลทั้งหมด

x = ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดในตัวอย่าง (มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อลิตร)

จากนั้นนำค่า x ที่ได้มา คำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดในตัวอย่างต่อไป
ตัวอย่าง เจือจาง 100 เท่า ดังนั้นปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดในตัวอย่าง
คือ $223.69 \times 100 = 22,369$ (มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อลิตร)

สารละลายเจือจางปริมาตร 1000 มิลลิลิตร มีสารประกอบฟีนอลทั้งหมด
= 22,369 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อลิตร
สารละลายเจือจางปริมาตร10 มิลลิลิตร มีสารประกอบฟีนอลทั้งหมด
= (22,369×10)/1000
= 223.69 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อลิตร
ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดที่ได้มาจากตัวอย่างน้ำใบบัวบกแห้ง 1 กรัม
ตัวอย่างน้ำใบบัวบกแห้ง 1 กรัม ได้มาจากน้ำใบบัวบก 38.73 มิลลิลิตร
น้ำใบบัวบกสด 38.73 มิลลิลิตร จะมีปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด
= 223.69 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก
ดังนั้นน้ำใบบัวบกสด 100 มิลลิลิตร จะมีปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด
= (223.69 × 100)/38.73
= 577.56 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อหนึ่งร้อยมิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ปริมาณกรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) ในน้ำใบบัวบก ด้วย HPLC ตามวิธีการวิเคราะห์ของ Rodriguez *et al.* (2002)

สารเคมี

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

2. เมทธานอล (methanol HPLC grade; Fisher Scientific, UK.)

3. กรดซัลฟูริก (Sulfuric acid; Merck, Germany)

4. กรดอะซิติก (Acetic acid; Merck, Germany)

การเตรียมสารเคมี

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

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

การสกัดตัวอย่าง

1. นำตัวอย่างน้ำใบบัวบกที่ผ่านการอบแห้งแบบแช่เยือกแข็ง 1 กรัม สกัดด้วยกรดซัลฟูริก pH 2.2 ปริมาตร 9 มิลลิลิตร เขย่าแรงๆ ให้เข้ากัน

2. กรองสารสกัดที่ได้ด้วย nylon syringe filter ขนาด 13 มิลลิลิตร ความละเอียด 0.45 ไมโครเมตร ใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

การสร้างกราฟมาตรฐาน

1. การเตรียมสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกในสารละลายซัลฟูริก pH 2.2 ให้มีความเข้มข้น 10, 20, 30, 40 และ 50 ไมโครกรัมต่อลิตร

2. นำมากรองด้วย nylon filter ความละเอียด 0.45 ไมโครเมตร

3. นำสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกไปวิเคราะห์ โดยใช้ HPLC

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การวิเคราะห์ตัวอย่าง

Condition ของ HPLC – UV/Vis Detection Analyses ใช้ระบบ Isocratic

Column : C18 (GL Science Inc, Japan)

Reversed phase Column : กรดอะซิติกความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (สารละลาย A) และเมทธานอล (สารละลาย B)

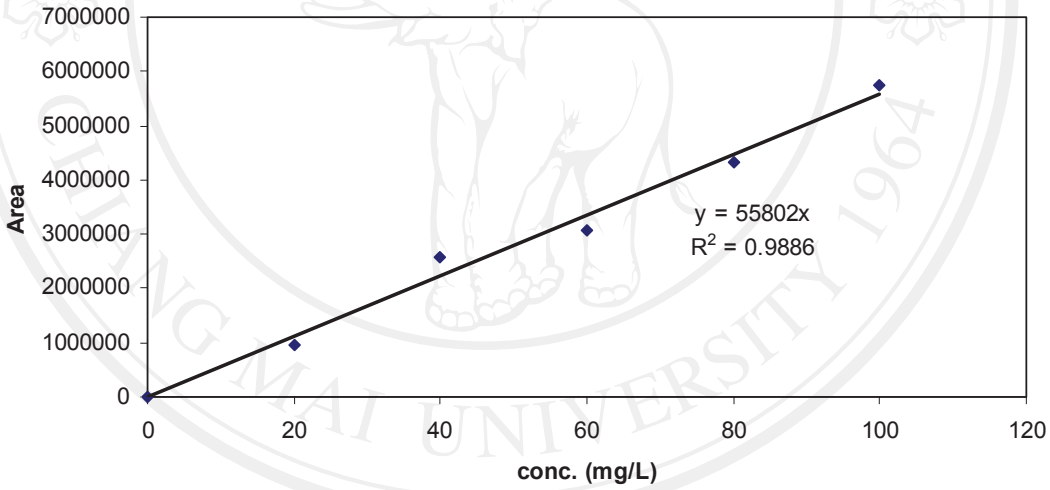
อุณหภูมิ : 30°ซ

UV detector : 250 นาโนเมตร

อัตราเร็ว : 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที

ปริมาตรของตัวอย่างที่ฉีดเข้า column : 20 ไมโครลิตร

กราฟมาตรฐาน



รูป 3.5 กราฟมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก (ไมโครกรัมต่อลิตร)

การคำนวณหาปริมาณกรดแอสคอร์บิก

นำค่าที่อ่านได้จากสารละลายกรดแอสคอร์บิกมาตรฐานที่เตรียมไว้ในขั้นตอนการสร้างกราฟมาตรฐาน มาคำนวณหาสูตรสมการเส้นตรงได้ ดังนี้

$y = 55802x$ โดยที่ $R^2 = 0.9866$

โดย y = พื้นที่ที่อ่านได้ของตัวอย่างปริมาณกรดแอสคอร์บิก

x = ปริมาณกรดแอสคอร์บิกในตัวอย่าง (มิลลิกรัมต่อลิตร)

จากนั้นนำค่า x ที่ได้มา คำนวณปริมาณกรดแอสคอร์บิกในตัวอย่าง ต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตัวอย่างสารละลายเจือจางมีปริมาณกรดแอสคอร์บิก เท่ากับ 19.721 มิลลิกรัมต่อลิตร

สารละลายเจือจางปริมาตร 1000 มีปริมาณกรดแอสคอร์บิก
= 19.721 มิลลิกรัม
สารละลายเจือจางปริมาตร 10 มิลลิลิตร มีปริมาณกรดแอสคอร์บิก
= (19.721 × 10)/1000
= 0.1972 มิลลิกรัม
ปริมาณกรดแอสคอร์บิกที่ได้มาจากตัวอย่างน้ำใบบัวบกแห้ง 1 กรัม
ตัวอย่างน้ำใบบัวบกแห้ง 1 กรัม ได้มาจากน้ำใบบัวบก 38.73 มิลลิลิตร
น้ำใบบัวบกสด 38.73 มิลลิตร จะมีปริมาณกรดแอสคอร์บิก
= 0.1972 มิลลิกรัม
ดังนั้นน้ำใบบัวบกสด 100 มิลลิตร จะ มีปริมาณกรดแอสคอร์บิก
= (0.1972 × 100)/38.73
= 0.50 มิลลิกรัมต่อหนึ่งร้อยมิลลิลิตร

6) ปริมาณสารประกอบแคโรทีนอยด์ในน้ำใบบัวบก โดยใช้วิธีทางสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ดัดแปลงจาก AOAC (2002)

สารเคมี

1.สารมาตรฐานเบต้าแคโรทีน (Beta-carotene; Asia Pacific Specialty Chemicals, Australia)

2. เฮกเซน (Hexane AR Grade; Lab-Scan analytical science)

3. อะซิโตน (Acetone AR Grade; Fisher Scientific)

การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียมสารผสมอะซิโตนเข้มข้นร้อยละ 10 ในเฮกเซน โดยปิเปตอะซิโตน 10 มิลลิลิตร ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยเฮกเซนให้ครบ 100 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การเตรียมสารมาตรฐานเบต้าแคโรทีน

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 ใส่ลงในขวดปรับปริมาตร ขนาด 10 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ครบโดยใช้สารละลายผสม แอซีโตนในเฮกเซน (ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร)

5. นำสารละลายในข้อ 4 ที่มีความเข้มข้นสูงสุดมาหาค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุด โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer ในช่วงความยาวคลื่น 400-500 นาโนเมตร ใช้สารละลายผสม แอซีโตนในเฮกเซน (ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร) เป็นแบลงค์

6. ตั้งค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่นสูงสุดตามที่วัดได้จากข้อ 5 (วัดได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร) จากนั้นนำสารละลายเบต้าแคโรทีนมาตรฐานในข้อ 4 ทั้งหมดเตรียมไว้มาวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยใช้สารละลายผสม แอซีโตนในเฮกเซน (ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร) เป็นแบลงค์ บันทึกค่าที่วัดได้

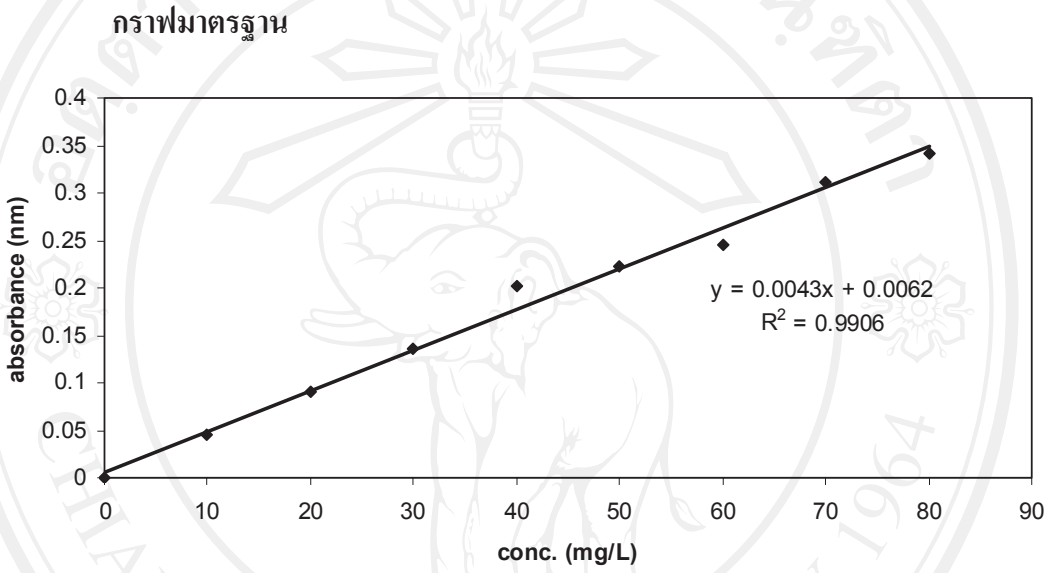
7. นำค่าที่วัดได้มาเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเบต้าแคโรทีน (ส่วนในล้านส่วน) กับค่าดูดกลืนแสงที่อ่านได้ แล้วหาสมการเส้นตรงจากกราฟ

วิธีการสกัด

ชั่งตัวอย่างน้ำใบบัวบกที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง 5.00 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารผสมอะซิโตนเข้มข้นร้อยละ 10 ในเฮกเซน ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปกวนบนเครื่อง magnetic stirrer นาน 10 นาที แล้วนำไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 แยกกากกับส่วนใส โดยเก็บส่วนใสในกรวยแยกขนาด 250 มิลลิลิตร ล้างกากด้วยอะซิโตน 25 มิลลิลิตร 2 ครั้ง และเฮกเซน 25 มิลลิลิตร อีก 1 ครั้ง นำส่วนใสของอะซิโตนและเฮกเซนที่ใช้ล้างกากไปรวมกับส่วนแรกที่อยู่ในกรวยแยก ทำการล้างแยกเอาอะซิโตนออก โดยการล้างสารละลายผสมในกรวยแยกด้วยน้ำกลั่น ครั้งละ 100 มิลลิลิตร 5 ครั้ง แยกส่วนของน้ำที่มีอะซิโตนผสมอยู่ออกจากส่วนที่เป็นเฮกเซนที่มีสารแคโรทีนอยด์ละลายอยู่ นำสารผสมแคโรทีนอยด์ในเฮกเซนไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 2 โดยรองรับสารผสมด้วยบีกเกอร์ขนาด 250

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

มิลลิลิตร แล้วนำสารที่กรองได้ไประเหยในตู้ดูดควันจนแห้ง นำสารที่ระเหยแห้งแล้วมาละลายด้วยสารผสมอะซิโตนร้อยละ 10 ในเฮกเซน และปรับปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิลิตร นำสารละลายผสมที่ได้ไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร บันทึกค่าที่ได้เปรียบเทียบกับค่าดูดกลืนแสงของแบลงค์ (สารผสมอะซิโตนร้อยละ 10 ในเฮกเซน) ทำซ้ำ 2 ครั้ง นำค่าที่ได้ทั้ง 2 ครั้ง มาหาค่าเฉลี่ยและนำไปคำนวณหาปริมาณของแคโรทีนอยด์ต่อไป



รูป 3.6 กราฟมาตรฐานสารประกอบแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัมต่อลิตร)

การคำนวณหาปริมาณแคโรทีนอยด์

นำค่าที่อ่านได้จากสารละลายเบต้าแคโรทีนมาตรฐานที่เตรียมไว้ในขั้นตอนการสร้างกราฟมาตรฐาน มาคำนวณหาสูตรสมการเส้นตรงได้ ดังนี้

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

โดย y = ค่าดูดกลืนแสงที่อ่านได้ของตัวอย่างแคโรทีนอยด์

x = ปริมาณแคโรทีนอยด์ในตัวอย่าง (มิลลิกรัมต่อลิตร)

จากนั้นนำค่า x ที่ได้มา คำนวณปริมาณแคโรทีนอยด์ ในตัวอย่าง ต่อไป

ตัวอย่าง สารละลายมีปริมาณแคโรทีนอยด์เท่ากับ 246.24 มิลลิกรัมต่อลิตร

สารละลายเจือจางปริมาตร 1000 มิลลิลิตร มีแคโรทีนอยด์

= 246.24 มิลลิกรัม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารละลายเจือจางปริมาตร 50 มิลลิลิตร มีแคโรทีนอยด์

= (246.24 × 50)/1000

= 12.312 มิลลิกรัมสมมูลของเบต้าแคโรทีน

ปริมาณแคโรทีนอยด์ที่ได้มาจากตัวอย่างน้ำใบบัวบกแห้ง 5 กรัม

ดังนั้นน้ำใบบัวบกแห้ง 1 กรัม จะมีปริมาณแคโรทีนอยด์

= 12.312/5

= 2.462 มิลลิกรัมสมมูลของเบต้าแคโรทีน

ตัวอย่างน้ำใบบัวบกแห้ง 1 กรัม ได้มาจากน้ำใบบัวบก 38.73 มิลลิลิตร

น้ำใบบัวบกสด 38.73 มิลลิลิตร จะมีปริมาณกรดแคโรทีนอยด์

= 2.462 มิลลิกรัมสมมูลของเบต้าแคโรทีน

ดังนั้นน้ำใบบัวบกสด 100 มิลลิกรัม จะ มีปริมาณกรดแอสคอร์บิก

= (2.462 × 100)/38.73

= 6.35 มิลลิกรัมสมมูลของเบต้าแคโรทีนต่อหนึ่งร้อยมิลลิลิตร

7) ปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมดในน้ำใบบัวบก โดยใช้วิธีทางสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ดัดแปลงจากวิธีการวิเคราะห์ของ Mahanom *et al.* (1999)

โดยทั่วไปในพืชมีคลอโรฟิลล์ 2 ชนิด คือ คลอโรฟิลล์เอ (chlorophyll a) และ คลอโรฟิลล์บี (chlorophyll b) โดยรงควัตถุทั้งสองสามารถดูดกลืนแสงในย่านสเปกตรัมสีน้ำเงินและแดง แต่สามารถดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นที่จำเพาะแตกต่างกันโดยคลอโรฟิลล์เอมีความสามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 663 นาโนเมตร ส่วนคลอโรฟิลล์บี มีความสามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 645 นาโนเมตร เนื่องจากสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของคลอโรฟิลล์ทั้งสองชนิดซ้อนทับกัน ดังนั้น การคำนวณหาปริมาณคลอโรฟิลล์ มีวิธีการคำนวณ ดังสมการต่อไปนี้ (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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีวิเคราะห์

ชั่งตัวอย่างน้ำใบบัวบกที่ผ่านการอบแห้งแบบแช่เยือกแข็ง 1 กรัม ใส่ในหลอดทดลอง เติมแคลเซียมคาร์บอเนต (Merck, Germany) 0.2 กรัม และสารละลายอะซิโตนความเข้มข้นร้อยละ 80 โดยปริมาตร ปริมาณ 10 มิลลิลิตร เขย่านาน 3 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็ว 4,200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 645 และ 663 นาโนเมตร โดยใช้อะซิโตนความเข้มข้นร้อยละ 80 โดยปริมาตร เป็นสารละลายแบลงค์ แล้วคำนวณหาปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด

การคำนวณหาปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด

สารละลายตัวอย่าง มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 663 นาโนเมตร เท่ากับ 4.6513

สารละลายตัวอย่าง มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 645 นาโนเมตร เท่ากับ 1.8214

คลอโรฟิลล์ เอ (ไมโครกรัมต่อกรัม) = $((12.7 \times 4.6513) - (2.6 \times 1.8214)) \times 10$

= 543.35 ไมโครกรัมต่อกรัม

= 0.54 มิลลิกรัมต่อกรัม

คลอโรฟิลล์ บี (ไมโครกรัมต่อกรัม) = $((22.9 \times 1.8214) - (4.68 \times 4.6513)) \times 10$

= 199.41 ไมโครกรัมต่อกรัม

= 0.20 มิลลิกรัมต่อกรัม

ปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด = 0.54 + 0.20

= 0.74 มิลลิกรัมต่อกรัม

ปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมดที่ได้มาจากตัวอย่างน้ำใบบัวบกแห้ง 1 กรัม

ตัวอย่างน้ำใบบัวบกแห้ง 1 กรัม ได้มาจากน้ำใบบัวบก 38.73 มิลลิลิตร

น้ำใบบัวบกสด 38.73 มิลลิลิตร จะมีปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด

= 0.74 มิลลิกรัม

ดังนั้นน้ำใบบัวบกสด 100 มิลลิลิตร จะ มีปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด

= $(0.74 \times 100)/38.73$

= 1.91 มิลลิกรัมต่อหนึ่งร้อยมิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา

1) จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total Plate Count) โดยวิธีการวิเคราะห์ของ BAM (2000)

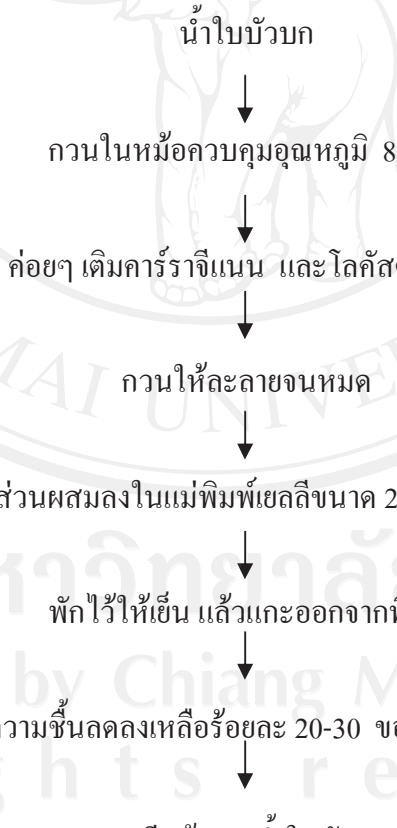
2) จำนวนยีสต์และรา (Yeast and Mould) โดยวิธีการวิเคราะห์ของ BAM (2000)

3) จำนวน Coliform bacteria และ *Escherichia coli* โดยวิธีการวิเคราะห์ของ BAM (2000)

ตอนที่ 2 พัฒนาสูตรที่เหมาะสมของเยลลีแห้งจากน้ำใบบัวบก

2.1 ศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างคาร์ราจีแนนกับโลคัสต์บีนกัมในการผลิตเยลลีแห้งน้ำใบบัวบก

ก่อนทำการผลิตเยลลีแห้งน้ำบัวบกจะต้องนำน้ำใบบัวบกแช่แข็ง มาละลายน้ำแข็งก่อนแล้วจึงนำมาผลิต ซึ่งมีสูตรที่ผันแปรอัตราส่วนระหว่างคาร์ราจีแนนกับโลคัสต์บีนกัม ดังตาราง 3.1 และกรรมวิธีการผลิตเยลลีแห้งจากน้ำใบบัวบกแบบเบื้องต้นแสดงดังรูป 3.7



รูป 3.7 กรรมวิธีการผลิตเยลลีแห้งจากน้ำใบบัวบก

ที่มา: ดัดแปลงจากวิภาพร (2547)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 3. 1 สิ่งทดลองที่ผันแปรอัตราส่วนของคาร์ราจีแนนกับโลคัสต์บีนกัม

สิ่งทดลองที่	น้ำใบบัวบก (ร้อยละ)	คาร์ราจีแนน (ร้อยละ)	โลคัสต์บีนกัม (ร้อยละ)
1	99.0	1.0	0.0
2	99.0	0.8	0.2
3	99.0	0.6	0.4
4	99.0	0.4	0.6

เมื่อได้เยลลีแห้งจากน้ำใบบัวบกที่ผลิตตามสูตรที่กำหนดไว้แล้ว จากนั้นนำมาวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ เคมี และทางประสาทสัมผัส ดังนี้

การวิเคราะห์ทางกายภาพ

1) ค่าสี ด้วยเครื่องวัดสี (Chroma meter, Minolta : CR-310, Japan)

2) วัดลักษณะเนื้อสัมผัสด้วยวิธี Texture profile analysis (TPA) ด้วยเครื่องวัดเนื้อสัมผัส (Texture Analyzer, TA- Xtplus, England)

การวิเคราะห์ทางเคมี

1) ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (total soluble solid) ด้วยเครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (Hand Refractometer, ATAGO, Japan)

2) ค่ากิจกรรมของน้ำ (a_w) ด้วยเครื่องวัดค่าวอเตอร์แอคติวิตี้ (Water Activity Meter, AquaLab : Model series 3, Decagon Devices Inc., USA)

3) ปริมาณความชื้น (moisture content) โดยใช้ตู้อบแบบสุญญากาศ (Vacuum oven, Binder : VD 53, Germany) ตามวิธี AOAC (2000)

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design: CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้วิเคราะห์ผลทางสถิติ โดยวิเคราะห์ความแปรปรวน(ANOVA) แล้วเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การวิเคราะห์ทางประสาทสัมผัส

นำเยลลีแห้งน้ำใบบัวบกที่ผันแปรอัตราส่วนระหว่างคาร์ราจีแนนกับโลคัสต์บีนกัมแต่ละสูตรไปทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัส โดยใช้ผู้ทดสอบชิมที่เป็นผู้บริโภคทั่วไปจำนวน 50 คน ทดสอบความชอบและการยอมรับด้วยวิธี 9 Point Hedonic Scaling Test (ไพโรจน์, 2535) ทดสอบคุณภาพด้านลักษณะปรากฏ สี กลิ่นใบบัวบก ความเหนียวขณะเคี้ยว ความยืดหยุ่น และความชอบรวม วางแผนการทดลองแบบสุ่มบล็อกสมบูรณ์ (Randomized Complete Block Design: RCBD) วิเคราะห์ความแปรปรวนแล้วเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

2.2 ศึกษาปริมาณน้ำตาลที่เหมาะสมในการผลิตเยลลีแห้งจากน้ำบัวบก

คัดเลือกเยลลีแห้งจากน้ำใบบัวบกสูตรที่ดีที่สุดจากตอนที่ 2.1 มาทำการศึกษาปริมาณน้ำตาลที่เหมาะสมในการผลิตเยลลีแห้งจากน้ำใบบัวบก โดยศึกษาปริมาณน้ำตาล 4 ระดับ คือ ร้อยละ 5 10 15 และ 20 วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design : CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วจึงนำไปวิเคราะห์คุณภาพเช่นเดียวกับตอนที่ 2.1

ตอนที่ 3 ศึกษาคุณภาพของเยลลีจากน้ำใบบัวบกที่ทำแห้งด้วยวิธีปั๊มความร้อนภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลตและอินฟราเรดภายใต้สุญญากาศ

3.1 ศึกษาผลของการทำแห้งด้วยวิธีปั๊มความร้อนภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลตต่อคุณภาพของเยลลีน้ำใบบัวบก

นำเยลลีแห้งจากน้ำใบบัวบกสูตรที่ดีที่สุดจากตอนที่ 2 ไปลดความชื้นด้วยวิธีปั๊มความร้อนภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลต โดยใช้ช่วงอุณหภูมิ 4 ช่วงคือ 30-50 30-60 40-50 และ 40-60°ซ เนื่องจากไม่สามารถตั้งอุณหภูมิของเครื่องให้คงที่ได้ โดยอุณหภูมิจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นจากอุณหภูมิต่ำไปถึงอุณหภูมิสูงสุดที่ตั้งไว้ หลังจากนั้นอุณหภูมิจะค่อยๆ ลดลงมาจนถึงอุณหภูมิต่ำสุดที่ตั้งค่าไว้ และอุณหภูมิจะค่อยๆ เพิ่มสูงขึ้น เป็นวงจรต่อเนื่องจนสิ้นสุดระยะเวลาที่ใช้ในการอบแห้ง เมื่อได้เยลลีแห้งจากน้ำใบบัวบกที่ผ่านการอบแห้งในแต่ละช่วงอุณหภูมิ วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design: CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำไปวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ และประสาทสัมผัสเช่นเดียวกับตอนที่ 2 วิเคราะห์คุณภาพทางเคมี และจุลชีววิทยาเช่นเดียวกับตอนที่ 1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2 ศึกษาผลของการทำแห้งด้วยอินฟราเรดภายใต้สุญญากาศต่อคุณภาพของเยลลีน้ำใบบัวบก

นำเยลลีแห้งจากน้ำใบบัวบกสูตรที่ดีที่สุดจากตอนที่ 2 ไปอบแห้งด้วยวิธีอินฟราเรดภายใต้สุญญากาศ โดยผันแปรอุณหภูมิในการอบแห้ง 3 ระดับคือ 40 50 และ 60°ซ เมื่อได้เยลลีแห้งจากน้ำใบบัวบกที่ผ่านอบแห้งในแต่ละอุณหภูมิแล้ว วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design : CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำไปวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ และประสาทสัมผัสเช่นเดียวกับตอนที่ 2 วิเคราะห์คุณภาพทางเคมี และจุลชีววิทยาเช่นเดียวกับตอนที่ 1

ตอนที่ 4 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพในระหว่างการเก็บรักษาของเยลลีแห้งจากน้ำใบบัวบก

คัดเลือกเยลลีแห้งน้ำใบบัวบกที่ดีที่สุดจากตอนที่ 3.1 และ 3.2 บรรจุในบรรจุภัณฑ์ชนิดไนลอนลามิเนตในสภาวะสุญญากาศ และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 และ 30°ซ เป็นเวลา 3 เดือน โดยตัวอย่างที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°ซ จะเก็บตัวอย่างทุก ๆ 15 วัน และตัวอย่างที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30°ซ จะเก็บตัวอย่างทุก ๆ 7 วัน เพื่อวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพเช่นเดียวกับตอนที่ 2 วิเคราะห์คุณภาพทางเคมี และจุลชีววิทยาเช่นเดียวกับตอนที่ 1

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design : CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้วิเคราะห์ผลทางสถิติ โดยวิเคราะห์ความแปรปรวน(ANOVA) แล้วเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved