



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “ชุดทดสอบโพลิฟีนอลทั้งหมดในชา”

โดย
ธีรพงษ์ เทพกรณ์

มีนาคม 2552

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “ชุดทดสอบโพลีฟีนอลทั้งหมดในชา”

Test kit for Total Polyphenols in Tea

ผู้วิจัย

ธีรพงษ์ เทพกรณ์

สังกัด

สำนักวิชาอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

ชุดโครงการ “สมุนไพรเพื่อคุณภาพชีวิต”

สนับสนุนโดย สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

EXECUTIVE SUMMARY

บทสรุปผู้บริหาร

งานวิจัยของนักวิทยาศาสตร์ทั่วโลกหลายชิ้นชี้ให้เห็นถึงคุณประโยชน์ของโพลีฟีนอลในชา ทำให้ผู้บริโภคในปัจจุบันหันมาใส่ใจสุขภาพโดยการบริโภคชามากยิ่งขึ้น เนื่องจากปริมาณโพลีฟีนอลในชาเป็นสิ่งที่บ่งชี้ถึงปริมาณสารสำคัญที่ผู้บริโภคจะได้รับจากการดื่มชา ดังนั้น โครงการวิจัยนี้จึงได้ประดิษฐ์ชุดทดสอบหาปริมาณโพลีฟีนอลในชา โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อประดิษฐ์ชุดทดสอบอย่างง่าย ประหยัด รวดเร็ว ถูกต้อง และใช้น้ำยาเคมีที่สังเคราะห์ขึ้นเองโดยไม่ต้องนำเข้าน้ำยาเคมีจากต่างประเทศ และไม่ต้องใช้เครื่องมือวิทยาศาสตร์ชั้นสูงในการวิเคราะห์

จากการประดิษฐ์ชุดทดสอบในโครงการวิจัยนี้ ทำให้ได้ “ชุดทดสอบโพลีฟีนอลทั้งหมดในชา” ที่ใช้น้ำยาเคมี Folin-Ciocalteu's phenol reagent ที่สังเคราะห์ขึ้นเอง ชุดทดสอบใช้ได้กับตัวอย่างชาแห้ง มีช่วงการทดสอบ 2.5-25.0% โดยน้ำหนัก ระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ 2.5% โดยน้ำหนัก ชุดทดสอบประกอบด้วย ครกบด และที่บด, ช้อนพลาสติก, ขวดสีกัด, ขวดเจือจาง, เข็มฉีดยา, หลอดทดลอง, น้ำยาเคมี FC-MFU, น้ำยาเคมี MFU1, น้ำยาเคมี MFU2 และแถบสีมาตรฐาน

ขั้นตอนการทดสอบแบ่งเป็น 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนการสกัดชา และขั้นตอนการวิเคราะห์วิธีการทดสอบทำได้ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 การสกัดชา

- 1.1 บดใบชาแห้งด้วยครกบดจนละเอียด ใช้ช้อนตักชาใส่ในขวดสีกัด
- 1.2 เติมน้ำเดือดลงขวดสีกัดจนถึงขีดปริมาตร ปิดฝา และเขย่าเป็นเวลา 5 นาที
- 1.3 ใช้เข็มฉีดยาดูดน้ำชา 2 มิลลิลิตรใส่ในขวดเจือจาง เติมน้ำจนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน

ขั้นตอนที่ 2 การวิเคราะห์

- 2.1 หยดน้ำยาเคมี FC-MFU 3 หยดลงในหลอดทดลอง
- 2.2 หยดน้ำยาเคมี MFU1 จนถึงขีดที่ 1 เขย่าให้เข้ากัน
- 2.3 ใช้เข็มฉีดยาดูดน้ำชาเจือจาง (ข้อ 1.3) 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เขย่าให้เข้ากัน
- 2.4 หยดน้ำยาเคมี MFU2 จนถึงขีดที่ 2 เขย่าให้เข้ากัน
- 2.5 ตั้งทิ้งไว้ ประมาณ 10 นาที เทียบสีกับแถบสีมาตรฐาน

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ศ. ดร. นันทวัน บุญยะประภัศร ผู้ประสานงานชุดโครงการสมุนไพรรักษาชีวิต ที่ได้ช่วยเหลือ ประสานงาน และสนับสนุนให้โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ ผู้ทรงคุณวุฒิทุกท่าน ที่ได้ช่วยตรวจสอบ ประเมิน ให้ข้อคิด ข้อแก้ไข ตลอดจนคำแนะนำต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์ ทำให้โครงการวิจัยนี้เสร็จสิ้นอย่างสมบูรณ์ที่สุด

ขอขอบคุณ สำนักวิชาอุตสาหกรรมเกษตร โครงการจัดตั้งสถาบันฯ และศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง ที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับงานโครงการวิจัยนี้

ขอขอบคุณ คณาจารย์ และเพื่อนพนักงานในสำนักวิชาอุตสาหกรรมเกษตร เพื่อนพนักงานในโครงการจัดตั้งสถาบันฯ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง ที่มีส่วนร่วมในการทำงานทุกคน

ขอขอบคุณ บิดา มารดา ที่ให้กำเนิด และอบรมสั่งสอนจนมีวันนี้ ขอขอบคุณในกำลังใจที่มีให้อย่างสม่ำเสมอ

ธีรพงษ์ เทพภรณ์

บทคัดย่อ

โครงการ ชุตทดสอบโพลิฟีนอลทั้งหมดในชา

งานวิจัยนี้เป็นการประดิษฐ์ชุตทดสอบโพลิฟีนอลทั้งหมดในชาโดยเทคนิคทำให้เกิดสีด้วยสาร Folin-Ciocalteu reagent (FC) ชุตทดสอบที่ประดิษฐ์ขึ้นนี้เหมาะสำหรับการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ชาเขียว ชาอู่หลง และชาดำ ในงานวิจัยนี้ได้ทำการสังเคราะห์ FC และใช้ทดสอบหาโพลิฟีนอลทั้งหมดพบว่า FC ที่สังเคราะห์ขึ้นสามารถใช้วิเคราะห์ได้ผลการทดสอบไม่ต่างจาก FC ทางการค้าที่นำเข้าจากต่างประเทศ วิธีการวิเคราะห์โพลิฟีนอลในชาด้วยน้ำยาเคมีที่สังเคราะห์ขึ้นได้พัฒนาและเปรียบเทียบกับวิธีอ้างอิงมาตรฐาน พบว่าวิธีของชุตทดสอบสามารถใช้วิเคราะห์ได้อย่างประมาณด้วยความรวดเร็ว สะดวก ง่าย และประหยัด วิธีการทดสอบแบ่งเป็น 2 ขั้นตอน คือ การสกัด และการวิเคราะห์ ในขั้นแรกโพลิฟีนอลในชาถูกสกัดด้วยน้ำเดือดในขวดสกัด จากนั้นเจือจางสารสกัดในขวดเจือจาง ขั้นตอนที่สองทำการวิเคราะห์ซึ่งโพลิฟีนอลในสารสกัดเจือจางจะทำปฏิกิริยาในสภาวะต่างกับน้ำยาสังเคราะห์ Folin-Ciocalteu reagent ทำให้เกิดสีน้ำเงิน ปริมาณโพลิฟีนอลในชาหาได้จากการเทียบความเข้มของสีน้ำเงินกับแถบสีมาตรฐาน

ABSTRACT

Test Kit for Total Polyphenols in Tea

The invention provides a kit that can be used to assay total polyphenol content in teas by colorimetric method using Folin-Ciocalteu reagent (FC). It is applicable to green, oolong and black tea products. In this research, the Folin-Ciocalteu reagent (FC) was synthesized and was used to determine total polyphenol content. The synthesized FC did not show significantly differences compared to the imported commercial FC. Next, a new method was developed and was compared to the reference standard method. The newly developed method could be approximately used providing the rapid, convenient, simple and economical test kit. The test method is a two-step procedure which comprises extraction and analysis. Firstly, polyphenols in teas are extracted with boiled water in an extraction bottle. The extracted solution is then diluted in a dilution bottle. Secondly, polyphenols in the diluted extract are determined using the synthesized Folin-Ciocalteu reagent under an alkaline condition which yields a blue color. The amount of polyphenols in teas is quantitatively determined by comparing the color intensity to the standard color strip.

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
Executive Summary	I
กิตติกรรมประกาศ	II
บทคัดย่อ	III
Abstract	IV
สารบัญ	V
สารบัญตาราง	VII
สารบัญรูป	VIII
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของเรื่อง	1
1.2 วัตถุประสงค์	1
1.3 แนวทางการวิจัย	2
1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ	2
1.5 ระยะเวลาการวิจัย	2
1.6 งบประมาณทั้งหมด	2
บทที่ 2 ทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 สารประกอบฟีนอล	3
2.2 พันธุ์ชา	5
2.3 ประเภทของชา	5
2.4 กระบวนการหมักชา	6
2.5 การวิเคราะห์โพลีฟีนอล	7
2.6 วิธี Folin-Ciocalteu assay	8
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	10
3.1 วัตถุดิบ สารเคมี และเครื่องมือ	10
3.2 การดำเนินงานวิจัย	11
บทที่ 4 การประดิษฐ์ชุดทดสอบ	12
4.1 ตัวอย่างชา	12
4.2 การสังเคราะห์ และการตรวจสอบความใช้ได้ของ Folin-Ciocalteu reagent (FC)	12
4.2.1 การสังเคราะห์ Folin-Ciocalteu's phenol reagent (FC)	13
4.2.2 การเปรียบเทียบสมบัติของ Folin-Ciocalteu's phenol reagent (FC)	15

4.2.3	การดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง FC และสารประกอบฟีนอล	16
4.2.4	การเปรียบเทียบความใช้ได้ของ Folin-Ciocalteu's phenol reagent	17
4.2.5	การเปรียบเทียบราคาของ Folin Ciocalteu's phenol reagent (FC)	19
4.2.6	ความคงตัวของน้ำยา Folin Ciocalteu's phenol reagent (FC)	20
4.3	การศึกษาวิธีมาตรฐานการวิเคราะห์โพลีฟีนอลในชาเพื่อออกแบบชุดทดสอบ	21
4.4	วิธีการสกัดที่เหมาะสมของชุดทดสอบ	22
4.4.1	ผลของวิธีการสกัดต่อปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดในตัวอย่างชา	22
4.4.2	การออกแบบวิธีการสกัดชาของชุดทดสอบ	23
4.4.3	การหาวิธีการสกัดที่เหมาะสมของชุดทดสอบ	24
4.4.4	การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีสกัด	25
4.5	วิธีการวิเคราะห์ที่เหมาะสมของชุดทดสอบ	27
4.5.1	การออกแบบวิธีการวิเคราะห์ของชุดทดสอบ	27
4.5.2	ความเข้มข้นของ 2 N Folin-Ciocalteu reagent ต่อผลการวิเคราะห์	28
4.5.3	การติดตามการดำเนินไปของปฏิกิริยาการวิเคราะห์	30
4.5.4	ความเข้มข้นของ Sodium carbonate ต่อการดำเนินไปของปฏิกิริยา	31
4.5.5	การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์	33
4.6	การพัฒนาชุดทดสอบที่ได้ออกแบบ	36
4.6.1	ระยะเวลาที่เหมาะสมในการอ่านผลทดสอบ	37
4.6.2	สีของปฏิกิริยาการวิเคราะห์ของมาตรฐานเมื่อเกิดปฏิกิริยากับ FC-MFU	39
4.6.3	การทำแถบสีบ่งชี้ปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด	39
4.7	การตรวจสอบความใช้ได้ของชุดทดสอบ	41
4.7.1	ความใช้ได้ของชุดทดสอบ	41
4.7.2	ความถูกต้องของการวิเคราะห์	43
4.8	การจัดทำเอกสารคู่มือการใช้งานและการออกแบบกล่อง	45
บทที่ 5 สรุปผลและข้อเสนอแนะ		51
เอกสารอ้างอิง		53
ภาคผนวก		55

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1	ปริมาณความชื้นในตัวอย่างชา
4.2	สมบัติบางประการของ Folin-Ciocalteu's phenol reagent
4.3	ค่าความชัน จุดตัดแกน Y และ R^2 จากกราฟมาตรฐาน
4.4	ผลการทดสอบความใช้ได้ของ Folin-Ciocalteu's phenol reagents
4.5	การเปรียบเทียบต้นทุนสารเคมีในการสังเคราะห์
4.6	วิธีการสกัด
4.7	น้ำหนักของชา (กรัม) ที่ชั่งโดยช้อนตัก
4.8	การเปรียบเทียบความใช้ได้ของวิธีการสกัด
4.9	ผลการจำแนกของ FC-MFU ต่อปริมาณกรดแกลลิกที่หาได้
4.10	ผลของจำนวนหยดของ FC-MFU ต่อปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดในตัวอย่างชา
4.11	การเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์โดยวิธีมาตรฐานและวิธีของชุดทดสอบ
4.12	การเปรียบเทียบผลของการทดสอบ
4.13	ความถูกต้องของการวิเคราะห์เมื่อเทียบกับกราฟมาตรฐาน
4.14	ความถูกต้องของการวิเคราะห์เมื่อเทียบกับแถบสีของชุดทดสอบ

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	โครงสร้างของคาเทชินในชา	4
2.2	การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักชา	6
2.3	Theaflavins ที่พบในชา	7
4.1	ตัวอย่างชาที่ใช้ในงานวิจัย	12
4.2	วิธีการสังเคราะห์ Folin-Ciocalteu reagent	14
4.3	การสังเคราะห์ Folin-Ciocalteu's phenol reagent	14
4.4	FC ที่สังเคราะห์ได้กับ FC ที่ขายจากบริษัท	15
4.5	ค่าการดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการวิเคราะห์สารมาตรฐาน	16
4.6	ค่าการดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการวิเคราะห์ชา	17
4.7	กราฟมาตรฐานกรดแกลลิกที่ได้จากการใช้ FC ต่างๆ	18
4.8	การเปรียบเทียบราคา (บาท) ต่อ Folin-Ciocalteu's phenol reagent ปริมาตร 500 ml	20
4.9	ความคงตัวของน้ำยา FC	20
4.10	ขั้นตอนการวิเคราะห์โพลีฟีนอลทั้งหมดตามวิธีมาตรฐาน ISO 14502-1: 2005	21
4.11	ผลของวิธีสกัดต่อปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดในชา	23
4.12	ชุดสกัดชา	23
4.13	ขั้นตอนและวิธีการสกัด	25
4.14	การออกแบบชุดน้ำยาเคมี	27
4.15	การวิเคราะห์โพลีฟีนอลทั้งหมดในชา	28
4.16	กราฟมาตรฐานกรดแกลลิกที่ได้จากการใช้ FC-MFU จำนวน 1, 2, 3 และ 4 หยด	29
4.17	วิธีการวิเคราะห์โพลีฟีนอลทั้งหมดในชา	30
4.18	การดำเนินไปของปฏิกิริยา	30
4.19	ปริมาณกรดแกลลิก (a) และ %Relative error ณ เวลาต่าง ๆ (b)	31
4.20	ผลของโซเดียมคาร์บอเนตต่อการดำเนินไปของปฏิกิริยา	32
4.21	ผลของโซเดียมคาร์บอเนตต่อค่าพีเอชของปฏิกิริยา	32
4.22	วิธีการวิเคราะห์โพลีฟีนอลทั้งหมดในชา	33
4.23	วิธีการวิเคราะห์ตามแบบมาตรฐาน และวิธีการวิเคราะห์ของชุดทดสอบ	34
4.24	อุปกรณ์ในชุดทดสอบที่ได้ออกแบบ	36
4.25	ขั้นตอนการวิเคราะห์ของชุดทดสอบ	37
4.26	ผลของเวลาในการทดสอบต่อค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยา	38

รูปที่		หน้า
4.27	ผลของเวลาในการทดสอบต่อค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยา	38
4.28	สีของสารมาตรฐานกรดแกลลิกความเข้มข้น 0-100 µg/ml ที่ทำปฏิกิริยากับ FC-MFU	39
4.29	สีของสารมาตรฐานกรดแกลลิกความเข้มข้น 0-50 µg/ml	40
4.30	การเทียบสีของสารมาตรฐานกรดแกลลิกกับแถบสี	40
4.31	แถบสีมาตรฐานสำหรับเทียบหาปริมาณโพลีฟีนอลในชา	41
4.32	การเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์โดยวิธีมาตรฐานและวิธีชุดทดสอบ	42
4.33	เอกสารคู่มือการใช้งานในรูปแบบกระดาษ A4 พับครึ่ง หน้า 1	45
4.34	เอกสารคู่มือการใช้งานในรูปแบบกระดาษ A4 พับครึ่ง หน้า 2	46
4.35	เอกสารคู่มือการใช้งานในรูปแบบกระดาษ A4 พับครึ่ง หน้า 3	47
4.36	เอกสารคู่มือการใช้งานในรูปแบบกระดาษ A4 พับครึ่ง หน้า 4	48
4.37	ฉลากสำหรับบ่งชี้ขวดต่าง ๆ ในชุดทดสอบ	49
4.38	การวางอุปกรณ์ในชุดทดสอบ	49
4.39	รูปแบบกล่อง และการพับกล่อง	50

บทที่ 1

บทนำ

1.7 ความเป็นมาและความสำคัญของเรื่อง

ชา เป็นพืชเศรษฐกิจชนิดหนึ่งที่ปลูกกันมากบนพื้นที่สูงในจังหวัดทางภาคเหนือของไทย ชาที่ปลูกเป็นชาพันธุ์อัสสัม (*Camellia sinensis* var. *assamica*) และชาจีน (*Camellia sinensis* var. *sinesis*) ใบชาที่เกษตรกรผลิตได้ส่วนใหญ่จะนำไปแปรรูปเป็นชาใบได้แก่ ชาเขียวหรือชาไม่หมัก (green tea, non-fermented tea), ชาอู่หลงหรือชากึ่งหมัก (Oolong tea, semi-fermented tea) และ ชาดำหรือชาหมัก (black tea, fully-fermented tea) สารต้านอนุมูลอิสระที่อยู่ในชาโดยมากเป็นอนุพันธ์ของกรดแกลลิก (gallic acid) และคาเทชิน (catechins) รวมเรียกว่าโพลีฟีนอล ในการผลิตชาอู่หลงและชาดำ ใบชาจะผ่านกระบวนการหมักซึ่งทำให้เอนไซม์ polyphenol oxidase เร่งปฏิกิริยา oxidation และ polymerization ของ monomeric polyphenols ทำให้เกิด dimers และสารประกอบเชิงซ้อนของ polyphenols ในกลุ่มของ Theaflavins และ Thearubigins ใบชาจะมีปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดประมาณ 20-30% ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งโพลีฟีนอลในใบชามีคุณค่าทางอาหารและเป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ช่วยลดความเสี่ยงของการเกิดโรคมะเร็ง และโรคหัวใจ ผลิตภัณฑ์ชาใบที่ขายในท้องตลาดโดยส่วนใหญ่เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการเพาะปลูก เก็บเกี่ยว และแปรรูปที่ยังคงยึดการผลิตแบบดั้งเดิมที่ถ่ายทอดมาจากประสบการณ์ของคนรุ่นหนึ่งไปสู่อีกรุ่นหนึ่ง ทำให้คุณภาพของผลิตภัณฑ์ใบชาจากแหล่งผลิตต่าง ๆ มีความแตกต่างกันทั้งทางด้านเคมี จุลชีววิทยา และประสาทสัมผัส สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม ได้ระบุมาตรฐานชาใบไว้เป็นมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมชาใบ (ชาจีน) มอก.460-2526 และมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมชาผง (ชาฝรั่ง) มอก.461-2526 นอกจากนี้รัฐบาลยังได้ปรับปรุงประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 196 พ.ศ. 2543) ว่าด้วยเรื่องของชา โดยกำหนดให้ชาเป็นอาหารที่ต้องกำหนดคุณภาพหรือมาตรฐาน ซึ่งได้กำหนดให้ชาใบที่ทำแห้งแล้วต้องมีคุณภาพตามมาตรฐาน หนึ่งมาตรฐานของชาที่ได้กำหนดนี้เป็นเพียงมาตรฐานทางเคมีเบื้องต้น มิได้กำหนดมาตรฐานปริมาณโพลีฟีนอลซึ่งเป็นสารสำคัญในชาที่ผู้บริโภคต้องการจากการดื่มชา ในความเป็นจริงปริมาณโพลีฟีนอลในผลิตภัณฑ์ชาจะแตกต่างกันไปตามการเพาะปลูก การเก็บเกี่ยว และลักษณะการผลิตของผู้ผลิตแต่ละราย ปริมาณโพลีฟีนอลในชาเป็นสิ่งที่สามารถบอกถึงปริมาณสารสำคัญที่ผู้บริโภคจะได้รับจากการดื่มชาชนิด ดังนั้น โครงการวิจัยนี้จึงได้คิดค้นเพื่อประดิษฐ์ชุดทดสอบหาปริมาณโพลีฟีนอลในชา โดยมีวัตถุประสงค์ในการประดิษฐ์ชุดทดสอบแบบประมาณอย่างง่าย ประหยัด รวดเร็ว และถูกต้อง ใช้น้ำยาเคมีที่สังเคราะห์ขึ้นเองโดยไม่ต้องนำเข้าน้ำยาเคมีจากต่างประเทศ ไม่ต้องใช้เครื่องมือวิทยาศาสตร์ขั้นสูงในการวิเคราะห์

1.8 วัตถุประสงค์

เพื่อประดิษฐ์ชุดทดสอบหาปริมาณโพลีฟีนอลในผลิตภัณฑ์ชาใบและตรวจสอบความใช้ได้ของชุดทดสอบ

1.9 แนวทางการวิจัย

1. ศึกษาวิธีมาตรฐานที่ใช้วิเคราะห์หาปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด
2. สังเคราะห์ Folin-Ciocalteu reagent และทดสอบความคงตัว
3. ศึกษาวิธีการสกัดสารจากใบชาแห้ง
4. ศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่ส่งผลต่อการเกิดปฏิกิริยา
5. การออกแบบชุดทดสอบ
6. การทำแถบสีเพื่อบ่งชี้ปริมาณโพลีฟีนอล
7. การตรวจสอบความใช้ได้ของชุดทดสอบที่ประดิษฐ์ขึ้น
8. การเปรียบเทียบผลการทดสอบระหว่างวิธีมาตรฐาน และวิธีวิเคราะห์โดยชุดทดสอบ
9. จัดทำเอกสารคู่มือการใช้งาน
10. จัดทำรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

1.10 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ชุดทดสอบหาปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดในชา
2. ได้อนุสิทธิบัตรชุดทดสอบหาปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดในชา

1.11 ระยะเวลาการวิจัย

1 กันยายน 2550 – 31 สิงหาคม 2551

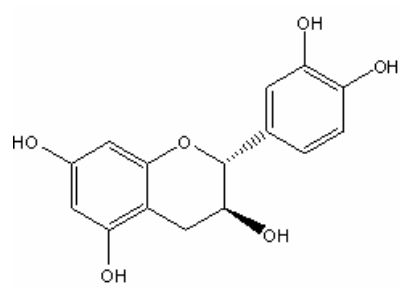
บทที่ 2

ทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง

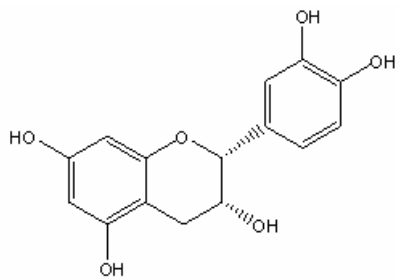
2.1 สารประกอบฟีนอล

สารประกอบฟีนอล (phenolic compounds) หรือ โพลีฟีนอล (polyphenols) เป็นสารธรรมชาติที่พบในผักและผลไม้ เป็นสารที่ประกอบด้วย aromatic ring และ hydroxyl group อย่างน้อย 1 หมู่ และรวมไปถึงอนุพันธ์ของสารประกอบฟีนอลซึ่งมีการแทนที่ด้วยหมู่เคมีต่างๆ ตัวอย่างสารประกอบฟีนอล ได้แก่ flavonoids, lignin, cinnamic acid, caffeic acid, chlorogenic acid, กรดอะมิโน tyrosine, phenylalanine และ dihydroxy-phenylalanine (DOPA) สารประกอบฟีนอลเป็นตัวแทนของสารในธรรมชาติที่นับว่ามีปริมาณมากชนิดหนึ่งและมีความสำคัญเนื่องจากหน้าที่เกี่ยวข้องกับ สี และกลิ่นรสของผักผลไม้

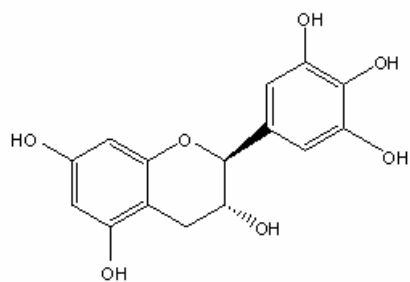
ในยอดใบชาจะพบประกอบสารประกอบฟีนอลเช่นเดียวกับที่พบในผักและผลไม้ ปริมาณโพลีฟีนอล (polyphenols) ในยอดใบชามีประมาณประมาณ 20-35% (dry weight) โดยสารประกอบ polyphenols นี้ประกอบไปด้วยกลุ่มของสารประกอบ 6 กลุ่มได้แก่ flavanols, hydroxy-4-flavonols, anthocyanins, flavones, flavonols และ phenolic acids โดย flavanols เป็นองค์ประกอบที่พบมากที่สุด และเป็นสารในกลุ่มที่เรียกว่า catechins (คาเทชิน) ซึ่งมีอยู่ประมาณ 60-70% ของปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดในชา กลุ่มของ catechins ที่พบมากในชา ได้แก่ (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG), (-)-epigallocatechin (EGC), (-)-epicatechin-3-gallate (ECG) และ (-)-epicatechin (EC) โดย catechins เหล่านี้มีอยู่ประมาณ 90% ของคาเทชินทั้งหมด กลุ่มของ catechins ที่พบในปริมาณน้อยลงมาได้แก่ (-)-gallocatechin (GC), (+)-catechin (C) และ catechins อื่น ๆ เช่น (-)-gallocatechin gallate (GCG) และ (-)-catechin gallate (CG) โครงสร้างของ catechins แสดงดังรูปที่ 2.1 คาเทชินที่มีอยู่ในชามีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นประโยชน์สำคัญของชา นอกจากนี้ยังมีประโยชน์ต่อสุขภาพอีกมากได้แก่ เป็นสารช่วยลดความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งในอวัยวะต่าง ๆ ยับยั้งการขยายตัวของเซลล์มะเร็ง และช่วยควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด



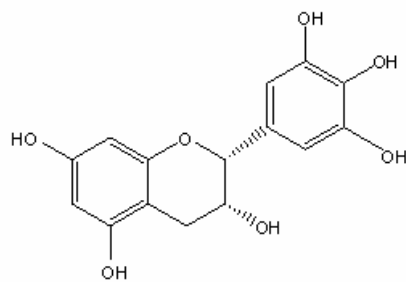
(+)-Catechin (C)



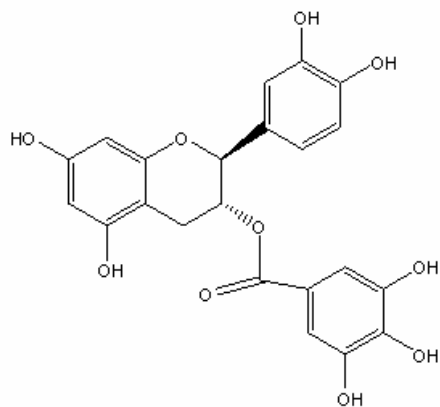
(-)-Epicatechin (EC)



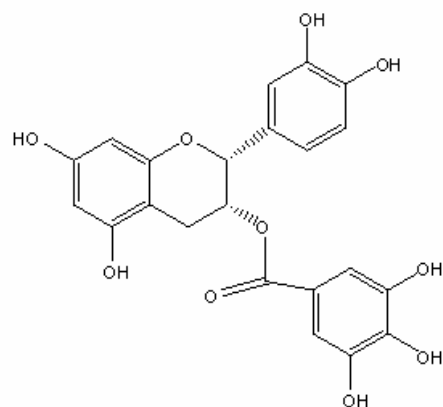
(-)-Gallocatechin (GC)



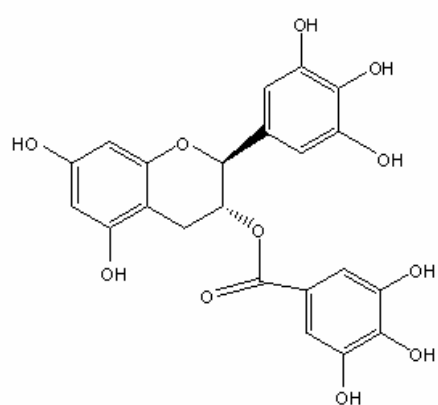
(-)-Epigallocatechin (EGC)



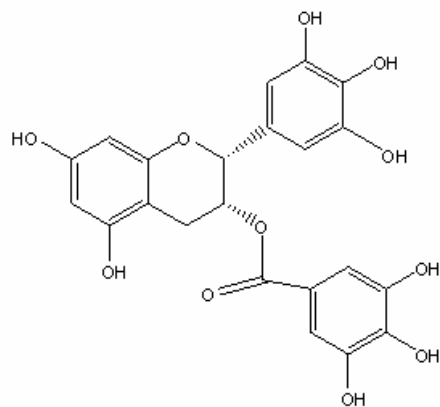
(-)-Catechin gallate (CG)



(-)-Epicatechin gallate (ECG)



(-)-Gallocatechin gallate (GCG)



(-)-Epigallocatechin gallate (EGCG)

รูปที่ 2.1 โครงสร้างของคาเทชินในชา

2.2 พันธุ์ชา

พันธุ์ชาที่ปลูกทางการค้าของไทย แบ่งได้เป็นกลุ่มใหญ่ ๆ 2 กลุ่มคือ

1. กลุ่มชาพันธุ์อัสสัม (Assam Tea)

กลุ่มนี้มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Camellia sinensis* var. *assamica* ลักษณะเป็นลำต้นเดี่ยว ต้นใหญ่ สูงประมาณ 6-18 เมตร ใบเดี่ยว ขนาดใหญ่ ใบสีเขียวอ่อน แผ่นใบโปนเป็นคลื่น ขอบใบหยักแบบฟันเลื่อย ปลายใบแหลม ใบแก่ การเรียงตัวของใบเป็นแบบสลับและเกลียว ต้นเจริญเติบโตเร็ว ทนแล้ง ปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี ชาอัสสัม 1 กิโลกรัมมียอดชาสดประมาณ 700 ยอด

2. กลุ่มชาพันธุ์จีน (Chinese Tea)

กลุ่มนี้มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Camellia sinensis* var. *sinensis* ลักษณะลำต้นเป็นพุ่มเตี้ย สูงประมาณ 2-6 เมตร ใบมีสีเขียวเข้ม ขนาดเล็ก ยาวแคบ ตั้งตรง ขอบใบหยักแบบฟันเลื่อย ผิวใบเรียบ ใบค่อนข้างตั้งกว่าชาอัสสัม การเรียงตัวของใบเป็นแบบสลับและเกลียว ต้นเจริญเติบโตช้ากว่าชาอัสสัม ทนทานต่ออุณหภูมิต่ำและสภาพแวดล้อมที่แปรปรวนได้ดี ให้ผลผลิตต่ำกว่าชาอัสสัม ชาจีน 1 กิโลกรัมมียอดชาสดประมาณ 900 ยอด

2.3 ประเภทของชา

ชาที่วางขายกันตามท้องตลาดทั่วไปผลิตมาจากใบของต้นชา *Camellia sinensis* (L.) เมื่อแบ่งตามกระบวนการผลิตจะแบ่งได้ 3 ประเภทใหญ่ ๆ คือ

1. ชาเขียว (Green tea)

เป็นชาที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก (Non-fermented tea) กรรมวิธีการผลิตเริ่มจากการหยุดการทำงานของเอนไซม์ Polyphenol oxidase ที่อยู่ในใบชาสดโดยการอบด้วยไอน้ำ (steaming) หรือการคั่วบนกระทะร้อน (pan firing) เพื่อทำให้เอนไซม์ polyphenol oxidase ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยา oxidation และ polymerization ของ polyphenols ที่อยู่ในใบชาได้ เสร็จแล้วนำไปนวด (rolling) เพื่อให้เซลล์แตกและนวดเพื่อให้ใบชาม้วนตัว จากนั้นนำไปอบแห้ง สีของน้ำชาประเภทนี้จะมีสีเขียวถึงเขียวอมเหลือง

2. ชาอู่หลง (Oolong tea)

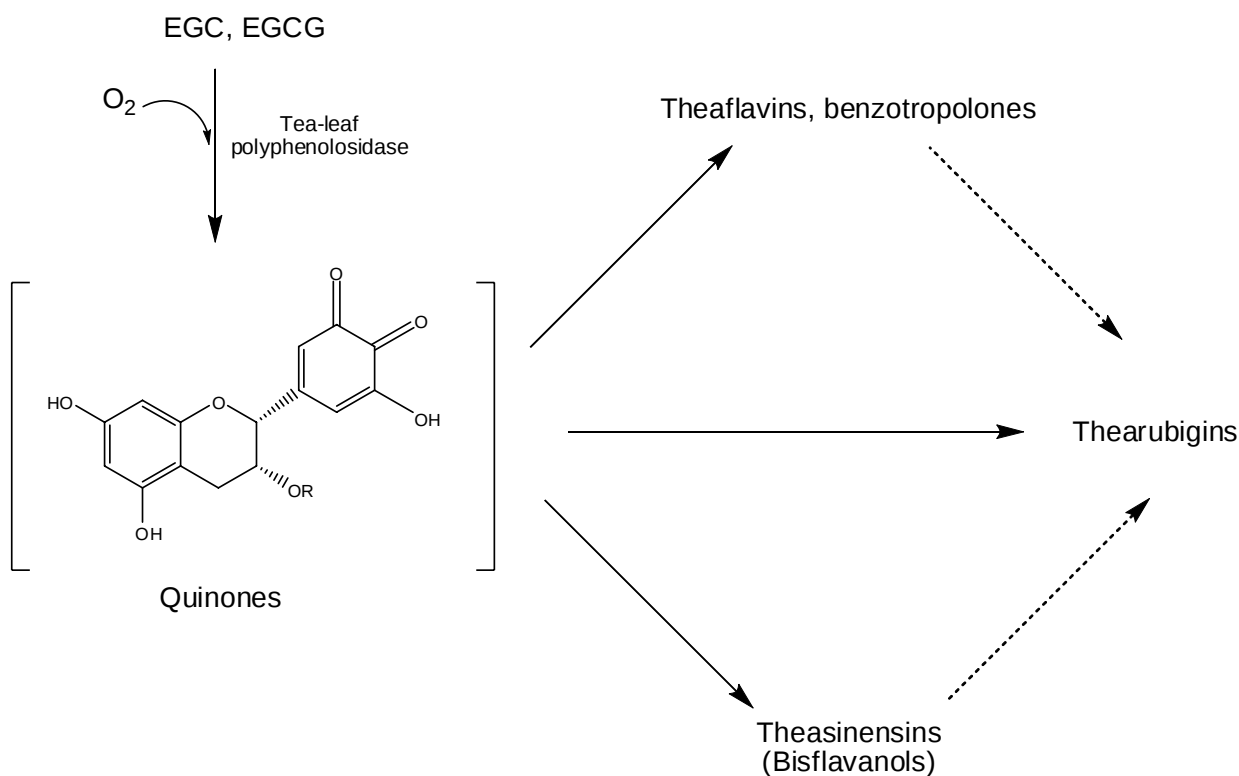
เป็นชาที่ผ่านกระบวนการหมักเพียงบางส่วน (Semi-fermented tea) ก่อนหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ด้วยความร้อน กรรมวิธีการผลิตจะมีการผึ่งแดด (withering) ประมาณ 20-40 นาที ภายหลังผึ่งแดดใบชาจะถูกผึ่งในร่มอีกครั้งพร้อมเขย่ากระตุ้นให้ชาตี้นตัว การผึ่งนี้เป็นกระบวนการหมักซึ่งทำให้เอนไซม์ polyphenol oxidase เร่งปฏิกิริยา oxidation และ polymerization ของ polyphenols ทำให้เกิด dimers และสารประกอบเชิงซ้อนของ polyphenols สารประกอบที่เกิดขึ้นนี้ทำให้อู่หลงมีกลิ่นและสีที่แตกต่างไปจากชาเขียว น้ำชาอู่หลงจะมีสีเหลืองอมเขียว และสีน้ำตาลอมเขียว

3. ชาดำ (Black tea)

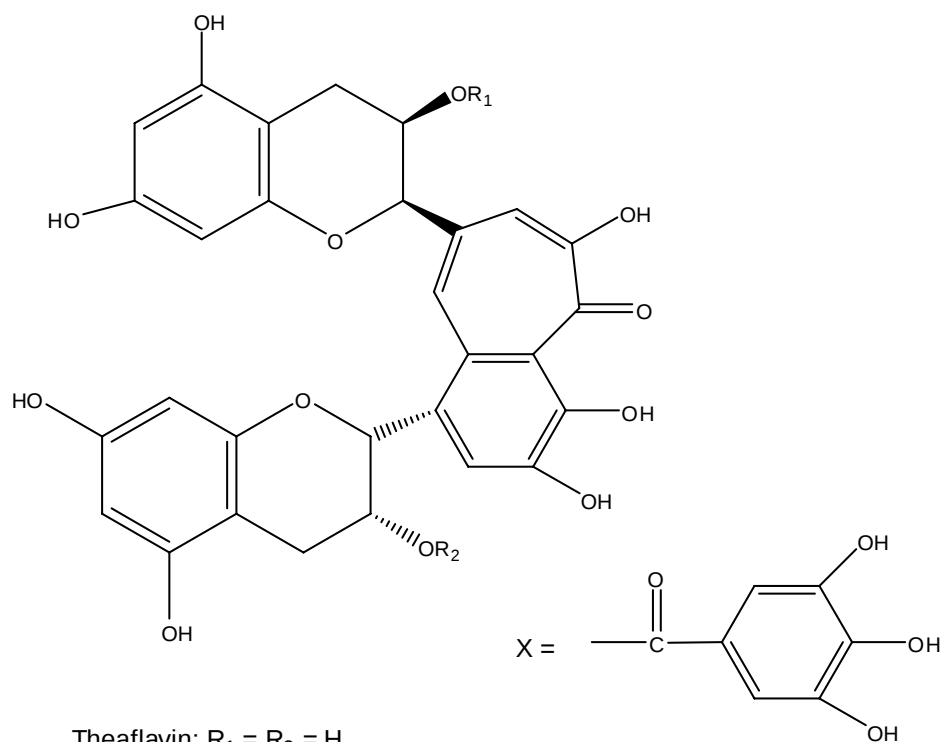
เป็นชาที่ผ่านกระบวนการหมักอย่างสมบูรณ์ (Completely-fermented tea) ใบชาจะถูกผึ่งให้เอนไซม์ polyphenol oxidase เร่งปฏิกิริยาอย่างเต็มที่ ซึ่ง polyphenols จะถูก oxidized อย่างสมบูรณ์เกิดเป็นสารประกอบกลุ่ม Theaflavins และ Thearubigins ทำให้ชาดำมีสีน้ำตาลแดง

2.4 กระบวนการหมักชา

ในการผลิตชาอู่หลงและชาดำเอนไซม์ polyphenol oxidase (PPO) จะเร่งปฏิกิริยา oxidation และ polymerization ของ catechins ให้เปลี่ยนเป็นสารโพลีฟีนอลที่ใหญ่ขึ้น (รูปที่ 2.2) โดยเป็นกลุ่มของ Theaflavins และ Thearubigins ซึ่งจะส่งผลต่อ สี รสชาติ และกลิ่นของชา ปฏิกิริยานี้เริ่มจากเอนไซม์ PPO เร่งการเกิดออกซิเดชันของ monomeric catechins จำพวก(-)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG), (-)-Epigallocatechin (EGC), (-)-Epicatechin-3-gallate (ECG) และ (-)-Epicatechin (EC) ได้เป็นสารประกอบ orthobenzoquinones จากนั้นจะเกิด polymerizations ได้เป็น dimeric catechins ในกลุ่ม Theaflavins และ Theasinensins และเกิดปฏิกิริยารวมตัวกับองค์ประกอบอื่นๆ ได้เป็นสาร Thearubigins ที่มีโมเลกุลใหญ่ กลุ่มของโพลีฟีนอลในชาหมักที่พบมากคือ Theaflavins และ Thearubigins โดยชาที่ผ่านการหมักอย่างสมบูรณ์ จะพบ Thearubigins มาก ปัจจุบันพบว่า Theaflavins ที่พบในชามี 4 ชนิด (รูปที่ 2.3) ส่วน Thearubigins เป็นสารที่มีโครงสร้างซับซ้อน ยังไม่สามารถ identify ได้



รูปที่ 2.2 การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักชา



Theaflavin; $R_1 = R_2 = \text{H}$
 Theaflavin-3-gallate; $R_1 = \text{X}, R_2 = \text{H}$
 Theaflavin-3'-gallate; $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{X}$
 Theaflavin-3,3'-digallate; $R_1 = R_2 = \text{X}$

รูปที่ 2.3 Theaflavins ที่พบในชา

2.5 การวิเคราะห์โพลีฟีนอล

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลในพืชโดยส่วนใหญ่ใช้เทคนิคทางสเปกโตรโฟโตเมตรี ซึ่งสามารถทำได้หลายวิธี โดยแต่ละวิธีจะมีหลักการวิเคราะห์ที่แตกต่างกันไป ในปัจจุบันการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลได้ถูกพัฒนาและปรับปรุงให้มีประสิทธิภาพมากขึ้นมาอย่างต่อเนื่อง (Antolovich et al., 2000; Deshpande et al., 1986; Hagerman et al., 1997; Jackman et al., 1987; Makkar, 1989; Porter, 1989; Scalbert et al., 1989; Scalbert, 1992; Tempel, 1982) เทคนิคการวิเคราะห์ต่าง ๆ สามารถแบ่งเป็นการวิเคราะห์กลุ่มโพลีฟีนอลทั้งหมด (Total phenolic compounds) (Earp et al., 1981; Price and Butler, 1977; Swain and Hillis, 1959) และวิเคราะห์ฟีนอลจำเพาะ (Specific phenolic compound) (Tzagoloff, 1963; Naczki et al., 1992; Brune et al., 1991; Mole and Waterman, 1987a, b; Naczki and Shahidi, 1989; Price et al., 1978) วิธีวิเคราะห์ทั้งหลายนี้มีข้อดีข้อเสีย และข้อจำกัดที่แตกต่างกันไป อย่างไรก็ตาม วิธีที่ง่าย ให้ผลค่อนข้างแม่นยำ และเป็นวิธีใช้กันมากในการวิเคราะห์คือ วิธี Folin-Ciocalteu method

2.6 วิธี Folin-Ciocalteu Assay

แรกเริ่มการวิเคราะห์โพลีฟีนอลได้ถูกเสนอโดย Folin และ Denis เรียกว่า Folin-Dennis assay ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้หาปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดโดยใช้สาร phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent (Folin-Denis; FD) ทำปฏิกิริยากับสารประกอบฟีนอล อย่างไรก็ตามในการตรวจวัดพบว่าเกิดตะกอนสีขาวซึ่งส่งผลต่อการวิเคราะห์โดยเทคนิค colorimetry ต่อมา Otto Folin และ Vinitila Ciocalteu ได้พัฒนาน้ำยาเคมีวิเคราะห์โดยการเพิ่มสัดส่วนของ molybdate และเพิ่ม Lithium sulfate ลงในน้ำยาวิเคราะห์ เพื่อป้องกันการตกตะกอน การเปรียบเทียบผลการทดสอบระหว่าง Folin-Denis reagent (FD) และ Folin-Ciocalteu reagent (FC) พบว่า FC ให้ค่า sensitivity และ reproducibility ที่สูงกว่า ดังนั้นวิธีที่นิยมใช้กันมากในปัจจุบันคือ Folin-Ciocalteu assay

2.6.1 การสังเคราะห์ Folin-Ciocalteu reagent (FC)

Folin-Ciocalteu reagent สามารถสังเคราะห์ได้โดยละลาย 100 กรัม sodium tungstate ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 25 กรัม sodium molybdate ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ในน้ำกลั่นประมาณ 700 ml เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 100 ml และ 50 ml ของ 85% Phosphoric acid นำไปต้มและรีฟลักซ์ประมาณ 10 ชั่วโมง ล้างคอนเดนเซอร์ด้วยน้ำเล็กน้อย เติม 150 กรัม Li_2SO_4 น้ำกลั่น 50 ml และ 1 หยดของ Bromine รีฟลักซ์ต่อ 15 นาที ทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น จะได้สารประกอบเชิงซ้อน Hexavalent phosphomolybdic/phosphotungstic acid ตามสูตรโมเลกุลดังนี้ (Peterson, 1979)



2.6.2 เคมีของปฏิกิริยาการวิเคราะห์

สารประกอบฟีนอลเมื่ออยู่ในสภาวะฟีนอลประมาณ 10 จะเกิดเป็น phenolate ion เมื่ออิเล็กตรอนใน phenolate ion ถูกสูญเสีย หรือถูกดึงออกไป จะได้ semiquinone free radical หากมีการสูญเสียอิเล็กตรอนที่สองจาก ortho หรือ para-diphenol จะทำให้เกิดเป็น quinone ซึ่งสารผลของ phenol และ quinone จะอยู่สมดุลกัน โดยมี semiquinone free radical เป็น intermediate โดย semiquinone เป็น free radical (อนุมูลอิสระ) ที่มีอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยวที่ว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยา อิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยวนี้สามารถ resonate ได้กับหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง ortho และ para ของวงแหวนเบนซีน (ตำแหน่งที่ 2, 4 และ 6 ของวงแหวนเบนซีน) สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ง่ายกับอนุมูลอิสระอื่น ๆ เกิดการฟอร์มพันธะโควาเลนต์ได้เป็นสารใหม่

น้ำยา Folin-Ciocalteu reagent ประกอบด้วยสารประกอบเชิงซ้อนที่สังเคราะห์ขึ้น เป็นสารผสม heteropolyphosphotungstates-molybdates โดย polyphosphotungstates เป็นสารที่ไม่มีสี ส่วน polyphosphomolybdate (Mo) จะมีสีเหลือง โครงสร้างในกรดจะประกอบด้วยสารผสมเชิงซ้อน hydrate octahedral ของ metal oxide ฟอร์มโคออดิเนชันรอบ ๆ โมเลกุลของ phosphate ในปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในการวิเคราะห์โพลีฟีนอลทั้งหมด tungstate และ molybdate จะเป็นตัวรับอิเล็กตรอนจาก semiquinone free radical

ในสภาวะต่าง โดย tungstate forms เป็นตัวรับอิเล็กตรอนได้น้อยกว่า molybdate forms ซึ่ง tungstate forms จะมีความจำเพาะต่อการถ่ายโอนอิเล็กตรอน 1 ตัว (one-electron transfer) ทำให้มีความจำเพาะต่อการตรวจวัด ortho-dihydric phenols โดยจะไม่สามารถตรวจวัด monophenols หรือ meta-dihydric phenols ได้ molybdate forms ใน Folin-Ciocalteu reagent สามารถรับอิเล็กตรอนได้ง่ายและดีกว่า tungstate forms เมื่อรับอิเล็กตรอนจาก semiquinone free radical จะได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงิน โครงสร้างของสารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงินนี้ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด

ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการรับอิเล็กตรอนของ tungstate และ molybdate จะมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดแตกต่างกัน โดย phosphotungstate product จะมีค่า λ_{max} ที่ความยาวคลื่นสั้นกว่า และมี molar absorptivities ที่ต่ำกว่า phosphomolybdate blue product เนื่องจาก phosphomolybdate blue product ประกอบด้วยสารเชิงซ้อนหลายชนิดทำให้ค่าการดูดกลืนแสงของ phosphomolybdate blue product ค่อนข้างกว้างในช่วง 750-770 nm แม้ว่าสารเชิงซ้อนสีน้ำเงินจะดูดกลืนแสงในช่วงที่กว้าง แต่ในธรรมชาติมักไม่พบสารประกอบที่ดูดกลืนแสงในช่วงนี้ ดังนั้นการวิเคราะห์สามารถทำได้โดยการตรวจวัดที่ความยาวคลื่นในช่วง 750-770 nm

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 วัตถุดิบ สารเคมี และเครื่องมือ

3.1.1 ชา

ตัวอย่างชาที่ใช้เป็นตัวอย่างชาแห้งชนิดต่าง ๆ รวม 14 ตัวอย่าง ได้แก่ ชาเขียว ชาอู่หลง ชาดำ ชาแต่งกลิ่น และชาผงปรุงสำเร็จ

3.1.2 สารเคมี

ชื่อ	สูตรโมเลกุล	มวลโมเลกุล	เกรด	บริษัท
Bromine	Br ₂	159.82	Analysis	Carlo Erba
Folin-Ciocalteu's phenol reagent	-	-	Analysis	Fluka
Folin-Ciocalteu's phenol reagent	-	-	Analysis	Sigma
Folin-Ciocalteu's phenol reagent	-	-	Analysis	BDH
Folin-Ciocalteu's phenol reagent	-	-	Analysis	Merck
Folin-Ciocalteu's phenol reagent	-	-	Analysis	Carlo Erba
Gallic acid	C ₇ H ₆ O ₅	107.12	Analysis	Sigma
Hydrochloric acid 37%	HCl	36.46	Analysis	Carlo Erba
Lithium sulfate	LiSO ₄ •2H ₂ O	127.95	Analysis	Carlo Erba
ortho-Phosphoric acid 85%	H ₃ PO ₄	97.99	Analysis	Carlo Erba
Sodium carbonate	Na ₂ CO ₃	105.99	Analysis	Merck
Sodium molybdate	Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O	241.95	Analysis	Carlo Erba
Sodium tungstate	Na ₂ WO ₄ •2H ₂ O	329.86	Analysis	Carlo Erba

3.1.3 เครื่องมือ

Analytical balance 2, 4 ตำแหน่ง, High speed blender, UV-Visible Spectrophotometer, Hot air oven, Heating mantle, Vortex mixer, Heater, pH meter

3.2 การดำเนินงานวิจัย

3.2.1 วิธีมาตรฐานที่ใช้วิเคราะห์หาปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด

ศึกษาวิธีมาตรฐาน ISO 14502-1 Determination of substances characteristic of green and black tea – Part 1: Content of total polyphenols in tea-Calorimetric method using Folin-Ciocalteu reagent เพื่อใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์กับวิธีของชุดทดสอบ

3.2.2 การสังเคราะห์ Folin-Ciocalteu reagent และทดสอบความคงตัว

เพื่อผลิตชุดทดสอบที่ใช้น้ำยาทดสอบที่ผลิตขึ้นเอง จึงได้ศึกษาวิธีการสังเคราะห์ Folin-Ciocalteu reagent ซึ่งเป็นสารที่ได้จากการทำปฏิกิริยาระหว่าง sodium tungstate, sodium molybdate, phosphoric acid, hydrochloric acid, lithium sulfate และ bromine จากนั้นหาลักษณะเฉพาะเช่น สี ความเข้มข้นกรด ความหนาแน่น เปรียบเทียบผลกับน้ำยาทดสอบที่ซื้อจากต่างประเทศ รวมถึงดำเนินการศึกษาความเสถียรของน้ำยาทดสอบ

3.2.3 วิธีการสกัดสารจากใบชาแห้ง

ศึกษาวิธีการสกัดโพลีฟีนอลในใบชาโดยวิธีต่าง ๆ เช่น สกัดด้วยน้ำเดือด สกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ความเข้มข้นต่าง ๆ ผลของเวลาที่ใช้สกัด และเปรียบเทียบปริมาณโพลีฟีนอลที่วิเคราะห์ได้ เลือกวิธีการสกัดที่ทำให้ได้ง่าย สะดวก ประหยัด และให้ผลเป็นที่น่ายอมรับ

3.2.4 ศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่ส่งผลต่อการเกิดปฏิกิริยา

ศึกษาอิทธิพลของพีเอช ความเข้มข้นของน้ำยาทดสอบ ความเข้มข้นของสารสกัด เวลาการเกิดในปฏิกิริยา และสัดส่วนที่เหมาะสมของสารต่อจุดยุติของปฏิกิริยา

3.2.5 การออกแบบชุดทดสอบ

ทำการออกแบบชุดทดสอบ รวบรวมวัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในชุดทดสอบ ทดสอบความยากง่าย ของการใช้ งาน ปรับปรุงชุดทดสอบให้เหมาะสมกับการใช้งานจริงการทำแถบสีเพื่อบ่งชี้ปริมาณโพลีฟีนอล

3.2.6 การตรวจสอบความใช้ได้ของชุดทดสอบที่ประดิษฐ์ขึ้น

ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบที่ประดิษฐ์ขึ้น โดยหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ (Limit of Detection, LOD) ความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจวัดได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ (Limit of Quantitation, LOQ) ช่วงของความเป็นเส้นตรง (Range of Linearity) ตรวจสอบความถูกต้อง (accuracy) โดยการทำให้ Spiked sample ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

3.2.7 การเปรียบเทียบผลการทดสอบระหว่างวิธีมาตรฐาน และวิธีวิเคราะห์โดยชุดทดสอบ

ดำเนินการวิเคราะห์ตัวอย่างใบชาแห้งต่าง ๆ ใช้สถิติตรวจสอบความแตกต่างของวิธีทดสอบ

3.2.8 จัดทำเอกสารคู่มือการใช้งาน

บทที่ 4

การประดิษฐ์ชุดทดสอบ

4.1 ตัวอย่างชา

เก็บรวบรวมตัวอย่างใบชา (รูปที่ 4.1) นำมาเตรียมตัวอย่างโดยการปั่นในเครื่องปั่นผสม และบดด้วยครกบด จากนั้นหาความชื้นในตัวอย่างชาแต่ละชนิด เพื่อรายงานผลการทดสอบโพลีฟีนอลทั้งหมดในรูปน้ำหนักแห้ง



รูปที่ 4.1 ตัวอย่างชาที่ใช้ในงานวิจัย

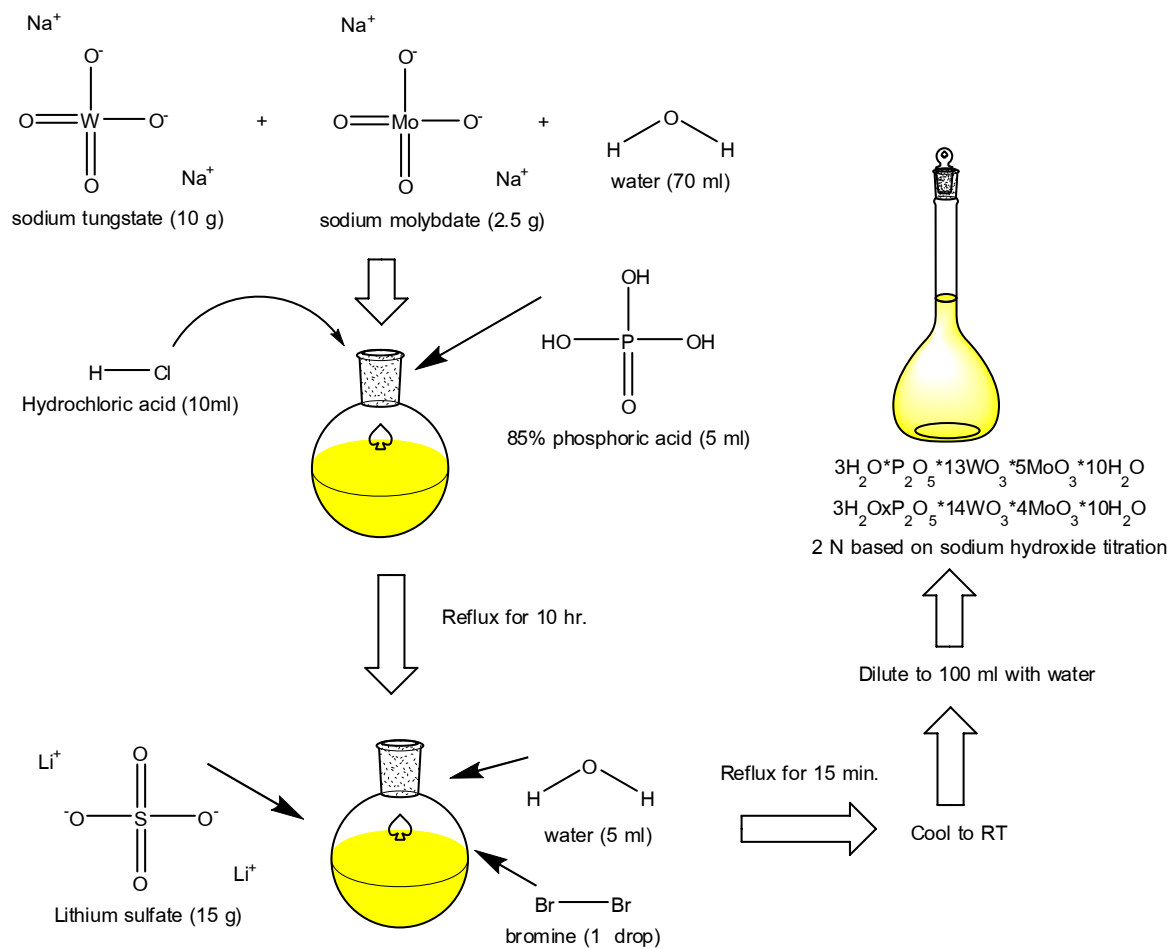
ตารางที่ 4.1 ปริมาณความชื้นในตัวอย่างชา

No.	Sample code	Moisture content (%w/w)	Standard deviation
1	T 001	4.66	0.01
2	T 002	3.21	0.00
3	T 003	5.20	0.01
4	T 004	4.48	0.02
5	T 005	4.54	0.01
6	T 006	4.76	0.02
7	T 007	6.21	0.02
8	T 008	7.02	0.03
9	T 009	4.45	0.02
10	T 010	3.28	0.00
11	T 011	7.86	0.01
12	T 012	1.41	0.01
13	T 013	7.12	0.01
14	T014	3.99	0.01

4.2 การสังเคราะห์ และการตรวจสอบความใช้ได้ของ Folin-Ciocalteu reagent (FC)

4.2.1 การสังเคราะห์ Folin-Ciocalteu's phenol reagent (FC)

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการสังเคราะห์สาร Folin-Ciocalteu's phenol reagent (FC) ซึ่งเป็นสารสำคัญสำหรับหาปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด วิธีการสังเคราะห์แสดงดังรูปที่ 4.2 และ 4.3 Folin-Ciocalteu reagent สังเคราะห์ได้โดยละลาย 100 กรัม sodium tungstate ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 25 กรัม sodium molybdate ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ในน้ำกลั่นประมาณ 700 ml เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 100 ml และ 50 ml ของ 85% Phosphoric acid นำไปต้มและรีฟลักซ์ประมาณ 10 ชั่วโมง ล้างคอนเดนเซอร์ด้วยน้ำเล็กน้อย เติม 150 กรัม Li_2SO_4 น้ำกลั่น 50 ml และ 1 หยดของ bromine รีฟลักซ์ต่อ 15 นาที ทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น จะได้สารประกอบเชิงซ้อน Hexavalent phosphomolybdic/phosphotungstic acid จากการสังเคราะห์ FC พบว่ามีลักษณะสี สีเหลืองเข้ม ค่อนข้างข้น และหนืดเล็กน้อย มีลักษณะปรากฏเหมือนกับ FC ที่ขายจากบริษัทต่างประเทศ



รูปที่ 4.2 วิธีการสังเคราะห์ Folin-Ciocalteu reagent



รูปที่ 4.3 การสังเคราะห์ Folin-Ciocalteu's phenol reagent

4.2.2 การเปรียบเทียบสมบัติของ Folin-Ciocalteu's phenol reagent (FC)

รูปที่ 4.4 แสดง FC ที่สังเคราะห์ได้ (FC-MFU) และ FC จากบริษัทผลิตสารเคมีหลัก ๆ จำนวน 5 ตัวอย่างได้แก่ Sigma-Aldrich, Merck, Fluka, BDH และ Carlo-Erba



รูปที่ 4.4 FC ที่สังเคราะห์ได้กับ FC ที่ขายจากบริษัท

FC ทั้งหมดได้ถูกวิเคราะห์สมบัติทางเคมีในเบื้องต้น ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 4.2 พบว่าสมบัติต่าง ๆ ของสารที่สังเคราะห์ได้ไม่แตกต่างกับสมบัติของสารที่ซื้อจากบริษัทผลิตสารเคมี

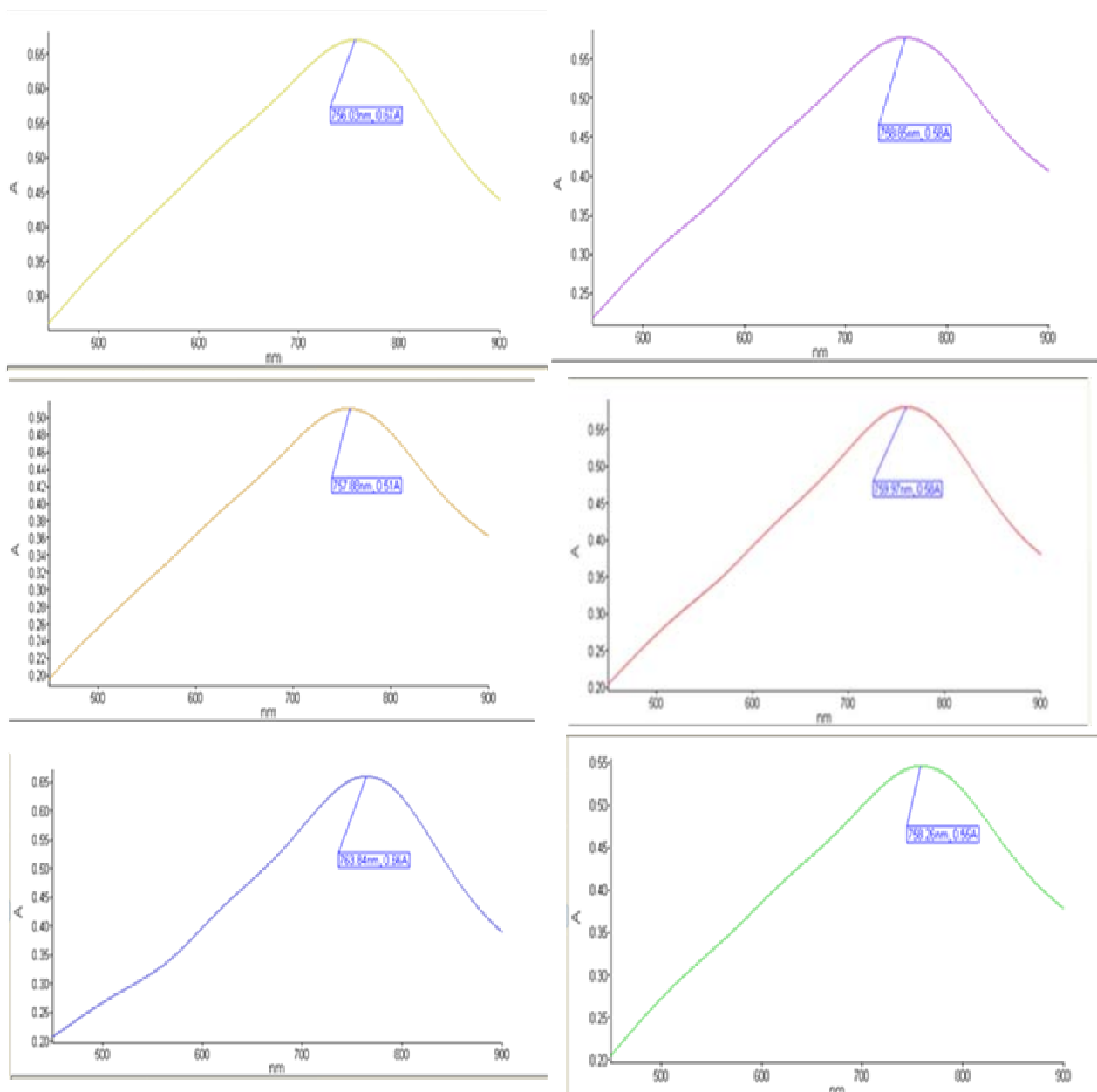
ตารางที่ 4.2 สมบัติบางประการของ Folin-Ciocalteu's phenol reagent

Company	pH	Density (g/ml)	Acid concentration (N)	Color		
				L*	a*	b*
Fluka	0.35	1.24 ± 0.002	2.13 ± 0.15	90.6	-14.39	102.35
BDH	0.32	1.24 ± 0.004	2.20 ± 0.10	91.13	-11.15	110.30
Merck	0.33	1.23 ± 0.00	2.00 ± 0.00	90.61	-13.33	104.79
Carlo Erba	0.36	1.22 ± 0.001	2.17 ± 0.15	91.06	-12.15	107.79
Sigma	0.34	1.24 ± 0.005	2.00 ± 0.00	91.7	-13.39	104.86
FC-MFU	0.33	1.22 ± 0.001	2.17 ± 0.15	89.6	-10.6	108.79

หมายเหตุ: L* แสดงถึงความสว่าง, a* ค่าบวกแสดงถึงสีแดง ค่าลบแสดงถึงสีเขียว, b* ค่าบวกแสดงถึงสีเหลือง ค่าลบแสดงถึงสีน้ำเงิน

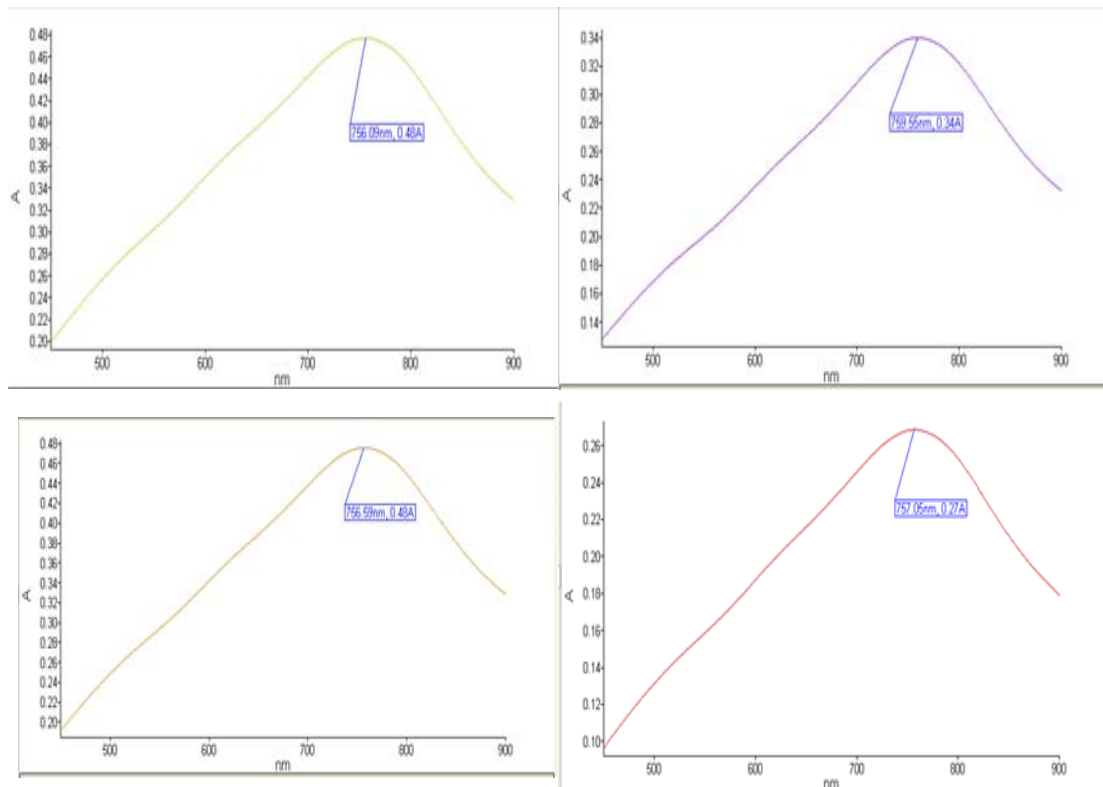
4.2.3 การดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง FC และสารประกอบฟีนอล

ได้ทำการสแกนค่าการดูดกลืนแสงของสารผลิตภัณฑ์สีน้ำเงินซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยาของ FC-reagent และสารประกอบฟีนอล ในการทดสอบนี้ใช้วิธีมาตรฐาน ISO 14502-1: 2005 Determination of substances characteristic of green and black tea – Part 1: Content of total polyphenols in tea-Calorimetric method using Folin-Ciocalteu reagent ใช้ FC ที่สังเคราะห์ได้ และที่ซื้อมาจากบริษัท 5 บริษัท ตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์คือ สารมาตรฐานกรดแกลลิกเข้มข้น 50 µg/ml ผลการสแกนแสดงดังรูปที่ 4.5 พบว่า ผลิตภัณฑ์สีน้ำเงินที่เกิดขึ้นโดยใช้ FC ที่ต่างกัน มี spectrum ที่คล้ายกัน spectrum ที่ได้มีค่าการดูดกลืนแสงที่กว้าง โดยช่วงที่ดูดกลืนแสงมากที่สุดอยู่ในช่วงความยาวคลื่น 750-770 nm ค่า λ_{max} เมื่อใช้ FC ต่าง ๆ อยู่ในช่วง 756-764 nm



รูปที่ 4.5 ค่าการดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์สีน้ำเงินที่เกิดขึ้นจากการวิเคราะห์โดยใช้ FC ต่าง ๆ วิเคราะห์สารมาตรฐาน

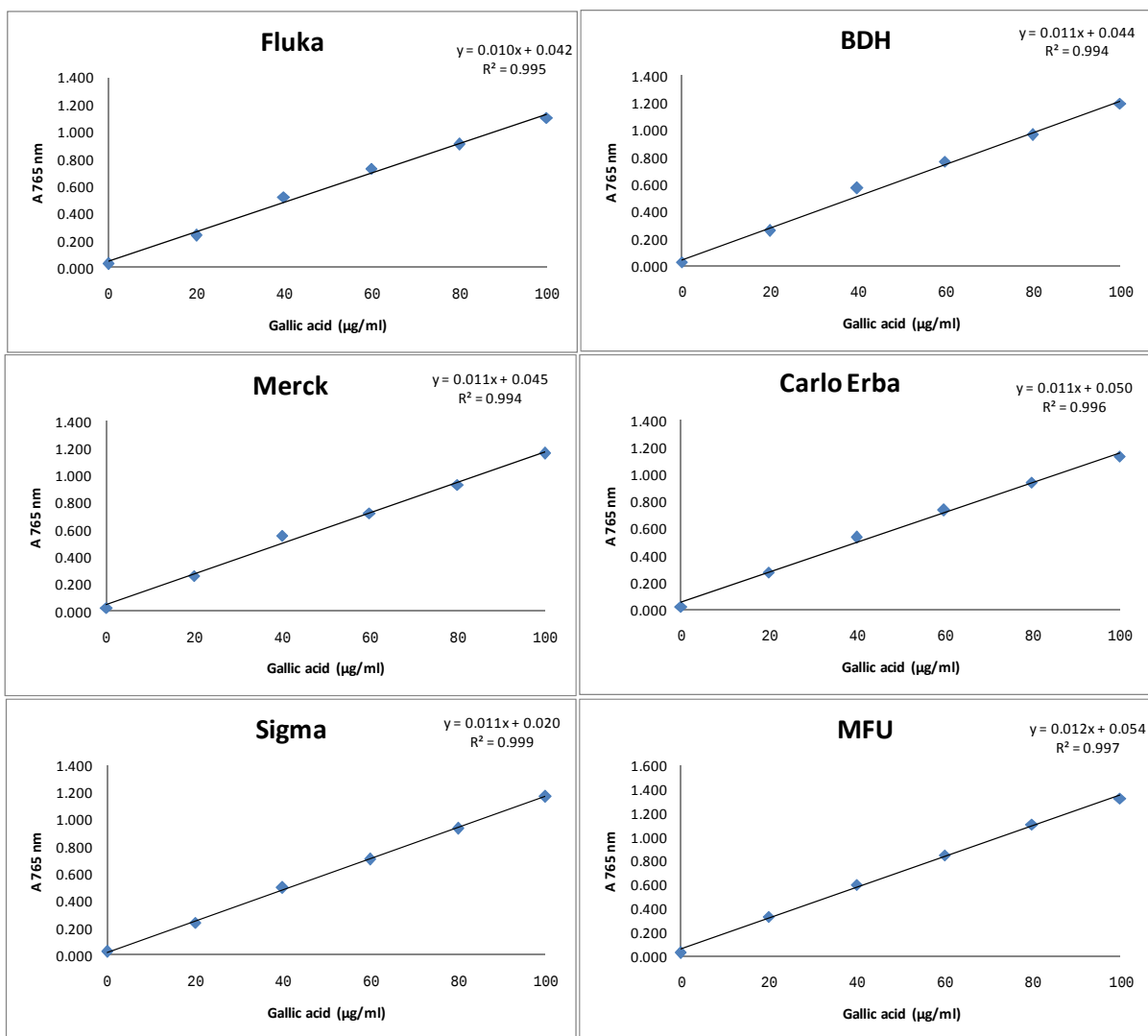
ได้ทำการสแกนค่าการดูดกลืนแสงของสารผลิตภัณฑ์สีน้ำเงินซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการวิเคราะห์โดยใช้ตัวอย่างชา 4 ตัวอย่าง ใช้ FC ที่สังเคราะห์ขึ้น และทำการทดสอบโดยวิธีมาตรฐาน ISO 14502-1: 2005 จากรูปที่ 4.6 พบว่า spectrum ของสารสีน้ำเงินที่เกิดขึ้นจากการวิเคราะห์ตัวอย่างชาคล้ายกับ spectrum จากการใช้สารมาตรฐานกรดแกลลิก ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นดูดกลืนแสงในช่วง 750-770 nm มีค่าการดูดกลืนแสงที่สูงที่สุดในช่วง 756-760 nm



รูปที่ 4.6 ค่าการดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์สีน้ำเงินที่เกิดขึ้นจากการวิเคราะห์โดยใช้ FC ต่าง ๆ วิเคราะห์ชา

4.2.4 การเปรียบเทียบความใช้ได้ของ Folin-Ciocalteu's phenol reagent

ในการทดลองนี้ได้ทดสอบความใช้ได้ของ Folin-Ciocalteu's phenol reagent ที่สังเคราะห์ได้ (FC-MFU) และที่ซื้อจากบริษัทผลิตสารเคมี 5 บริษัท โดยการสร้างกราฟมาตรฐานกรดแกลลิกที่ใช้ Folin-Ciocalteu's phenol reagent ชนิดต่าง ๆ (รูปที่ 4.7 และตารางที่ 4.3) จากนั้นหาปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดในตัวอย่างกรดแกลลิกมาตรฐานความเข้มข้น 60 ppm และตัวอย่างใบชาแห้งชนิดหนึ่งโดยใช้ Folin-Ciocalteu's phenol ที่สังเคราะห์ได้ และที่ซื้อจากบริษัทผู้ผลิต ทำการเปรียบเทียบ %Recovery และค่าโพลีฟีนอลทั้งหมดที่ได้ ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 4.4 พบว่า FC-MFU ที่สังเคราะห์ในงานวิจัยนี้สามารถใช้ในการวิเคราะห์โพลีฟีนอลทั้งหมดในชาได้ เนื่องจากให้ค่า %Recovery อยู่ในช่วงเกณฑ์การยอมรับ และเมื่อนำไปใช้วิเคราะห์ตัวอย่างชาให้ผลการทดสอบที่ใกล้เคียงกับค่าโพลีฟีนอลทั้งหมดที่วิเคราะห์จากสารที่ซื้อมาจากบริษัทผลิตสารเคมี



รูปที่ 4.7 กราฟมาตรฐานกรดแกลลิกที่ได้จากการใช้ FC ต่างๆ

ตารางที่ 4.3 ค่าความชัน จุดตัดแกน Y และ R^2 จากกราฟมาตรฐาน

Company	Slope	Y-Intercept	R^2
Fluka	0.010	0.042	0.995
BDH	0.011	0.044	0.994
Merck	0.011	0.045	0.994
Carlo Erba	0.011	0.050	0.996
Sigma	0.011	0.020	0.999
FC-MFU	0.012	0.054	0.997

ตารางที่ 4.4 ผลการทดสอบความใช้ได้ของ Folin-Ciocalteu's phenol reagents (n=5)

Company	%Recovery	Total polyphenols (%w/w, dry basis)
Fluka	104.69b	13.37±0.03b
BDH	101.97a	13.61±0.06a
Merck	100.81a	13.66±0.03a
Carlo Erba	102.67a	13.51±0.03a
Sigma	100.24a	13.61±0.06a
FC-MFU	101.89a	13.54±0.06a

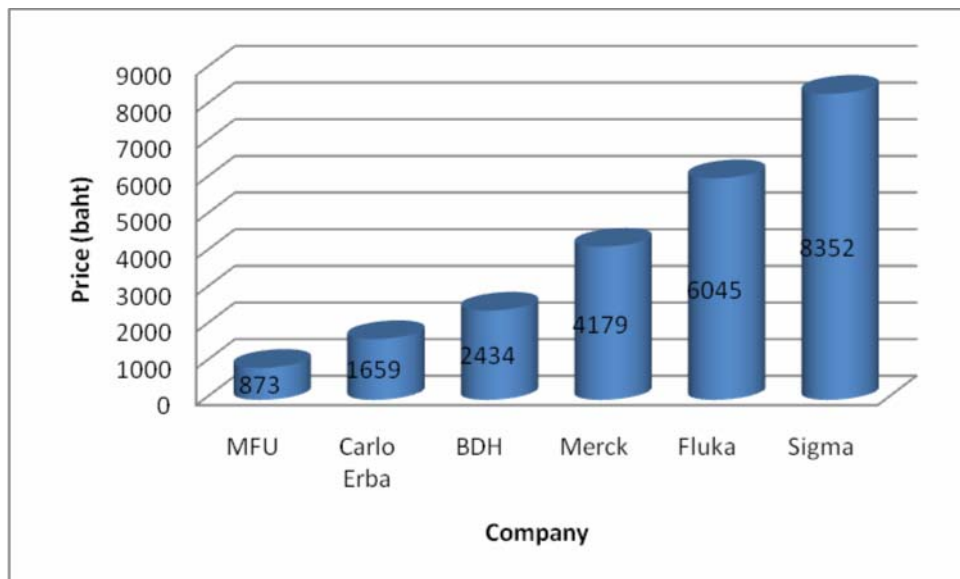
สัญลักษณ์ที่ต่างกันในแต่ละแถวหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

4.2.5 การเปรียบเทียบราคาของ Folin Ciocalteu's phenol reagent (FC)

ได้ทำการวิเคราะห์ต้นทุนสารเคมีที่ใช้ในการสังเคราะห์ FC เปรียบเทียบราคาที่ซื้อ FC จากบริษัทผู้ผลิตสารเคมี ผลการเปรียบเทียบพบว่า FC ที่สังเคราะห์ขึ้นมีต้นทุนสารเคมีอยู่ที่ประมาณ 860 บาทต่อ 500 ml (ตารางที่ 4.5) ต้นทุนสารเคมีที่มากที่สุดคือ lithium sulfate (45%) รองลงมาคือ sodium tungstate (36%) หากสามารถซื้อสารสองตัวได้ถูกกว่านี้จะทำให้ต้นทุนลดต่ำลง เมื่อเปรียบเทียบราคากับสารที่ซื้อมาจากบริษัทต่างประเทศพบว่าสารที่สังเคราะห์ได้มีต้นทุนสารเคมีที่ต่ำกว่าราคาของบริษัทที่ซื้อมาทั้งหมด (รูปที่ 4.8)

ตารางที่ 4.5 การเปรียบเทียบต้นทุนสารเคมีในการสังเคราะห์

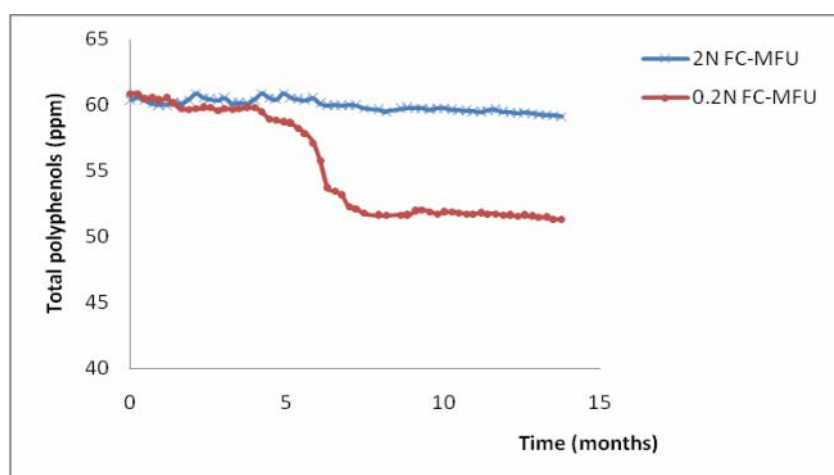
Name	Formula	FW	Grade	Company	Quantity	Unit	Price (baht)	Use	Unit	Cost (baht)	%Cost
Sodium tungstate	NaWO ₄ 2H ₂ O	329.86	ACS-analysis	Carlo Erba	500	g	2950	50	g	295	34
Sodium molybdate	Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	241.95	Analysis	Carlo Erba	100	g	980	12.5	g	122	14
Lithium sulfate	LiSO ₄ H ₂ O	127.95	Analysis	Carlo Erba	500	g	2450	75	g	367	42
Orthophosphoric acid 85%	H ₃ PO ₄	97.99	ACS-ISO analysis	Carlo Erba	1000	ml	500	25	ml	12	1
Hydrochloric acid 37%	HCl	36.46	ISO analysis	Carlo Erba	2500	ml	320	50	ml	6	1
Bromine	Br ₂	159.48	Analysis	Carlo Erba	250	ml	3000	1	ml	12	1
Vat 7%										57	7
Cost per 500 ml										873	100



รูปที่ 4.8 การเปรียบเทียบราคา (บาท) ต่อ Folin-Ciocalteu's phenol reagent ปริมาตร 500 ml

4.2.6 ความคงตัวของน้ำยา Folin Ciocalteu's phenol reagent (FC)

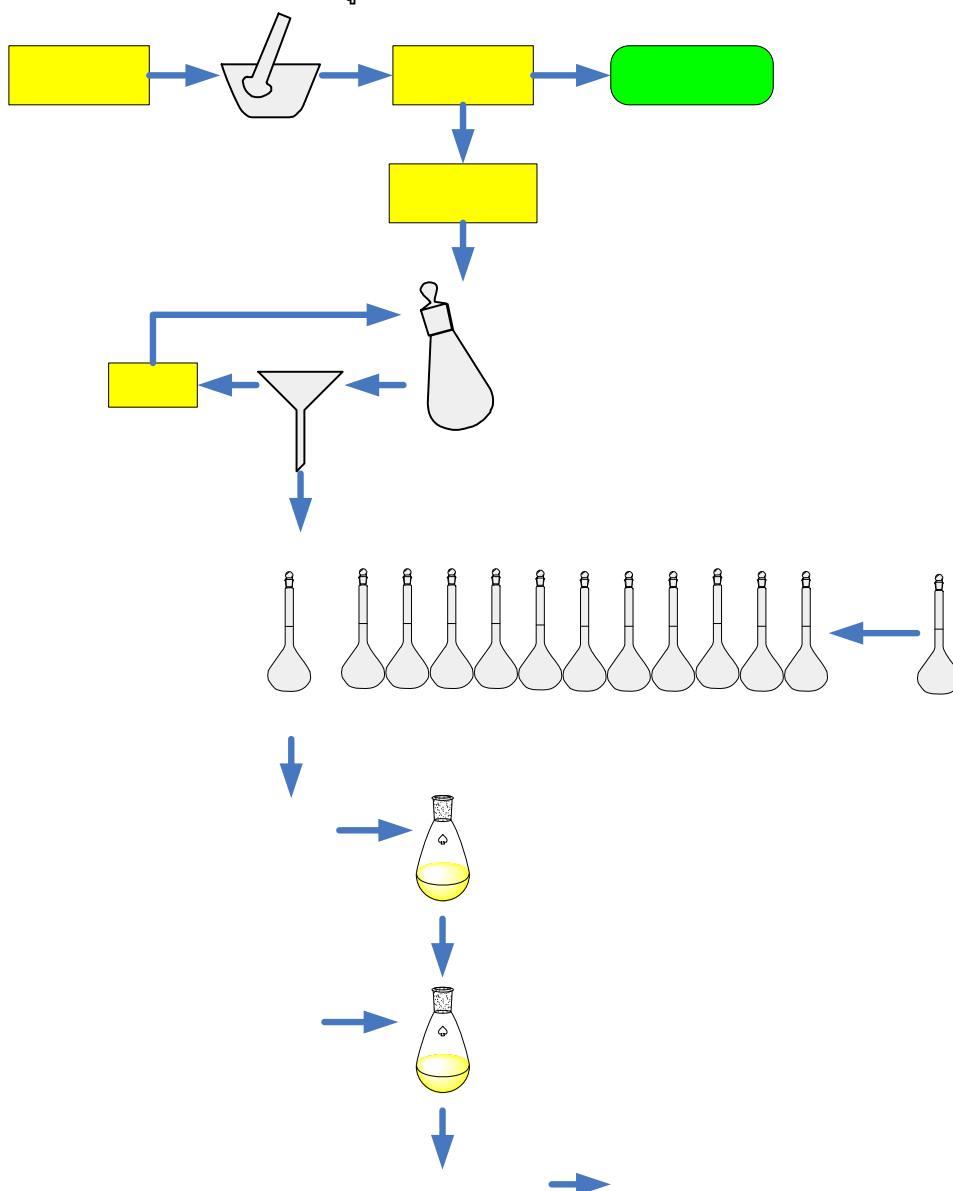
ศึกษาความคงตัวของน้ำยา FC ที่ได้สังเคราะห์ขึ้น โดยการเตรียมน้ำยา FC แบบเข้มข้น (2 N) และแบบเจือจาง (0.2 N) เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง นำน้ำยาทั้งสองตัวมาวิเคราะห์หาปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดโดยใช้สารมาตรฐานกรดแกลลิกความเข้มข้น 60 ppm เป็นตัวอย่าง จากการทดสอบพบว่าในการประดิษฐ์ชุดทดสอบนั้นไม่ควรเตรียมน้ำยา FC ในรูปเจือจาง (0.2 N) ควรเตรียมในรูปที่เข้มข้น (2 N) เนื่องจากให้ความคงตัวที่ดีกว่าน้ำยาในรูปเจือจาง จากรูปที่ 4.9 พบว่าน้ำยา FC ที่ได้สังเคราะห์ขึ้นมีความคงตัวสูง



รูปที่ 4.9 ความคงตัวของน้ำยา FC

4.3 การศึกษาวิธีมาตรฐานการวิเคราะห์โพลีฟีนอลในชาเพื่อออกแบบชุดทดสอบ

ได้ศึกษาวิธีมาตรฐาน ISO 14502-1: 2005 Determination of substances characteristic of green and black tea – Part 1: Content of total polyphenols in tea-Calorimetric method using Folin-Ciocalteu reagent ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบโพลีฟีนอลทั้งหมดในชา ในวิธีมาตรฐานนี้ ตัวอย่างชาจะถูกสกัดด้วย 70% methanol ที่อุณหภูมิ 70°C สารที่สกัดได้ทำปฏิกิริยากับ Folin-Ciocalteu reagent ซึ่งประกอบด้วย phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents สารดังกล่าวจะถูกรีดิวซ์โดย phenolic hydroxyl groups ของ total polyphenols เกิดเป็น tungsten และ molybdenum blue ซึ่งให้สีน้ำเงินและดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุด 765 nm ปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดหาได้โดยเทียบกับปริมาณของกรดแกลลิก ขั้นตอนการวิเคราะห์แสดงดังรูปที่ 4.10



รูปที่ 4.10 ขั้นตอนการวิเคราะห์โพลีฟีนอลทั้งหมดตามวิธีมาตรฐาน ISO 14502-1: 2005

จากรูป 4.10 จะเห็นว่าขั้นตอนการวิเคราะห์สามารถแบ่งได้ 2 ขั้นตอนหลัก ๆ ได้แก่ ขั้นตอนการสกัด และขั้นตอนการปฏิบัติกริยาเคมี ดังนั้น ในการออกแบบชุดทดสอบในขั้นต่อไป จะทำการศึกษาเพื่อหาวิธีการสกัดที่เหมาะสมที่สุด และวิธีการปฏิบัติกริยาเคมีที่เหมาะสมที่สุด

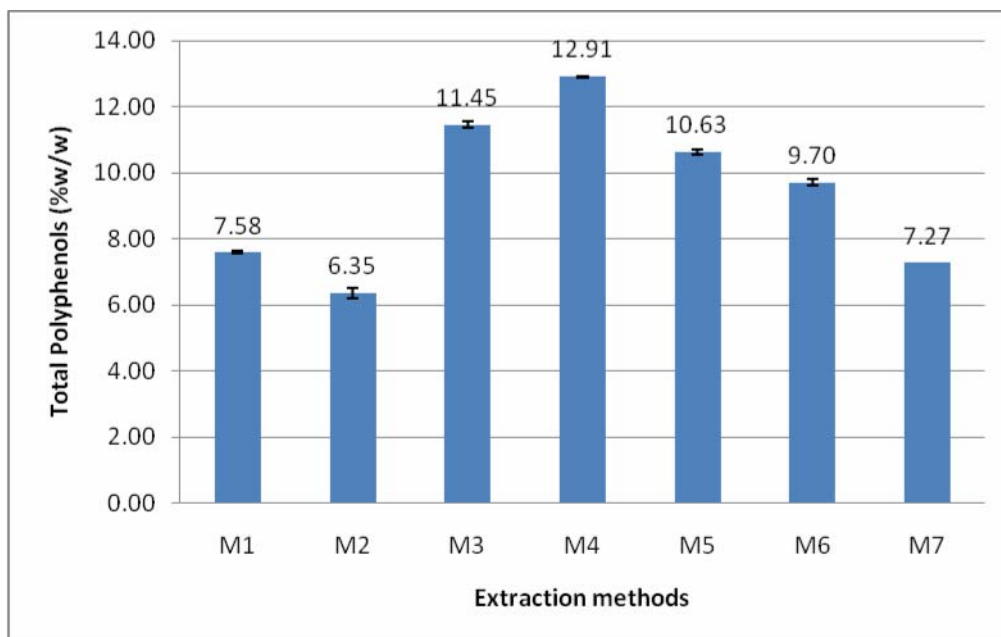
4.4 วิธีการสกัดที่เหมาะสมของชุดทดสอบ

4.4.1 ผลของวิธีการสกัดต่อปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดในตัวอย่างชา

วิธีการสกัดส่งผลต่อปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดในตัวอย่างชาที่วิเคราะห์ได้ การศึกษาผลของวิธีการสกัดต่อปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดในตัวอย่างชาในครั้งนี้ได้สกัดชาด้วยวิธีที่ต่างกัันดังตารางที่ 4.6 โดยเลือกการสกัดตามวิธีมาตรฐาน การสกัดด้วยเมทานอล การสกัดด้วยน้ำเดือด นำสารสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์ตามวิธีมาตรฐาน ผลการศึกษาแสดงดังรูปที่ 4.11 พบว่าวิธีการสกัดส่งผลต่อปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดในชา การสกัดด้วยเมทานอล 70%ตามวิธีมาตรฐาน (M1) และการสกัดด้วยเมทานอล 100% (M2) ให้ปริมาณโพลีฟีนอลต่ำกว่าการสกัดชาด้วยน้ำเดือด (M3 และ M4) ซึ่งให้ปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดในระดับที่สูงที่สุด การสกัดแบบ 2 ซ้ำ ให้ปริมาณโพลีฟีนอลมากกว่าสกัดครั้งเดียวเล็กน้อย การสกัดด้วยน้ำเดือดจากกระติกน้ำร้อนไฟฟ้า (M5, M6 และ M7) ให้ปริมาณโพลีฟีนอลน้อยกว่าการสกัดด้วยน้ำเดือด ในงานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายที่จะวิเคราะห์โพลีฟีนอลทั้งหมดในชาที่ได้จากการชงดื่มชาจริง ๆ ประกอบกับต้องการเลือกวิธีที่ง่าย สะดวก รวดเร็ว และไม่สิ้นเปลืองอุปกรณ์ในการสกัดมากจนเกินไป ดังนั้น ในขั้นต้นนี้จึงได้เลือกวิธีการสกัดแบบ M4 สำหรับการพัฒนาเพื่อประดิษฐ์ชุดทดสอบ ในลำดับต่อไป

ตารางที่ 4.6 วิธีการสกัด

สัญลักษณ์	รายละเอียดวิธีสกัด
M1	ชา 1 กรัม สกัดด้วย 70%v/v เมทานอล อุณหภูมิ 70°C 2 ครั้ง ปริมาตร 10 ml (วิธี ISO 14502-1)
M2	ชา 1 กรัม สกัดด้วย 100% เมทานอล อุณหภูมิห้อง Vortex 5 นาที ปริมาตร 100 ml
M3	ชา 1 กรัม สกัดด้วยน้ำเดือด อุณหภูมิ 95°C 5 นาที 1 ครั้ง ปริมาตร 100 ml
M4	ชา 1 กรัม สกัดด้วยน้ำเดือด อุณหภูมิ 95°C 5 นาที 2 ครั้ง ปริมาตร 100 ml
M5	ชา 1 กรัม สกัดด้วยน้ำเดือดจากกระติกน้ำร้อนไฟฟ้า อุณหภูมิ 80°C Vortex 5 นาที ปริมาตร 100 ml
M6	ชา 1 กรัม สกัดด้วยน้ำเดือดจากกระติกน้ำร้อนไฟฟ้า อุณหภูมิ 80°C เขย่า 5 นาที ปริมาตร 100 ml
M7	ชาแห้ง 0.2 กรัม สกัดด้วยน้ำเดือดจากหม้อต้มไฟฟ้า อุณหภูมิ 80°C เขย่า 5 นาที ปริมาตร 25 ml



รูปที่ 4.11 ผลของวิธีสกัดต่อปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดในชา

4.4.2 การออกแบบวิธีการสกัดชาของชุดทดสอบ

ได้ทำการออกแบบวิธีการสกัดชาโดยในขั้นต้นคิดว่าในขั้นตอนสกัดควรประกอบด้วยอุปกรณ์ต่าง ๆ ดังนี้ (รูปที่ 4.12)

1. ครก และสาก สำหรับบดตัวอย่างชา
2. ช้อนพลาสติก สำหรับตักตัวอย่างชา
3. ขวดสกัด สำหรับสกัดชา
4. ขวดเจือจาง สำหรับเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมกับการวิเคราะห์
5. เข็มฉีดยา สำหรับดูดสารสกัดชา



รูปที่ 4.12 ชุดสกัดชา

4.4.3 การหาวิธีการสกัดที่เหมาะสมของชุดทดสอบ

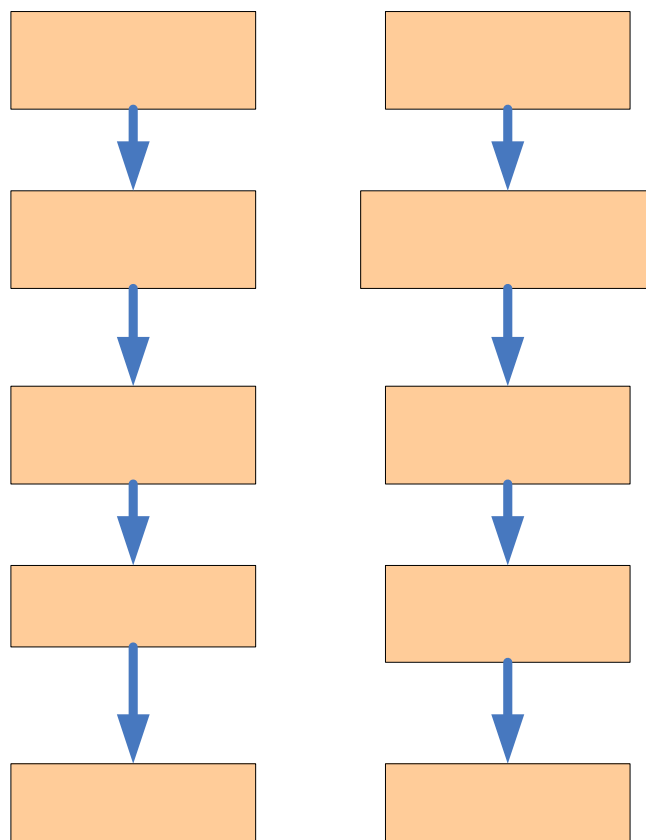
วิธีการสกัดแบบ M4 ใช้ชา 1 กรัม สกัดด้วยน้ำเดือด 2 ครั้ง ปริมาตร 100 ml ทำการเจือจาง 50 เท่า แล้วนำไปวิเคราะห์ วิธีนี้จะได้ความเข้มข้นของชาในตอนสกัด 10 mg/ml และตอนเจือจาง 0.2 mg/ml ดังนั้นจึงได้ใช้ข้อมูลเบื้องต้นนี้ในการหาวิธีการสกัดที่เหมาะสมของชุดทดสอบ ในขั้นแรกได้ทำการหาน้ำหนักโดยประมาณของชาที่ตกจากช้อนตัก ทำโดยบดตัวอย่างชา 5 ตัวอย่าง ด้วยครกและสากให้เป็นผง จากนั้นใช้ช้อนตักชาตักตัวอย่างชาแต่ละชนิด นำไปชั่งเพื่อหาน้ำหนักของตัวอย่าง จำนวน 7 ช้ำ หาค่าเฉลี่ย พบว่าน้ำหนักชาที่ชั่งมาแต่ละครั้งประมาณ 0.2 กรัม (ตารางที่ 4.7) ดังนั้นในการสกัดชาจึงได้ใช้น้ำเดือดในการสกัด 20 ml ทำการสกัดโดยเขย่าในขวดสกัด จากนั้นเจือจาง 50 เท่าโดยตุตสารละลาย 2 ml ลงในขวดเจือจาง ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 ml

ตารางที่ 4.7 น้ำหนักของชา (กรัม) ที่ชั่งโดยช้อนตัก

Trial	Weight of Tea Samples (gram)				
	T001	T002	T003	T004	T005
1	0.2003	0.1998	0.2103	0.2201	0.2055
2	0.1989	0.2044	0.2086	0.2182	0.2071
3	0.2028	0.1988	0.2071	0.2195	0.2101
4	0.2071	0.2017	0.2115	0.2099	0.2128
5	0.1997	0.2051	0.2161	0.2176	0.2082
6	0.2057	0.2028	0.2111	0.2186	0.2057
7	0.2033	0.1987	0.2093	0.2197	0.2111
Average	0.2025	0.2016	0.2106	0.2177	0.2086
SD	0.0031	0.0026	0.0029	0.0035	0.0028
%RSD	1.5318	1.2970	1.3618	1.6232	1.3351

4.4.4 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีสกัด

ทำการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์จำนวน 14 ตัวอย่างที่สกัดโดยวิธี M4 และวิธีที่ได้ได้ออกแบบขึ้นตามข้อ 4.4.3 (รูปที่ 4.13) นำสารสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์ตามวิธีมาตรฐาน ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 4.8 เมื่อนำผลการทดสอบที่สกัดทั้ง 2 วิธีไปทดสอบค่าทางสถิติ paired-sample t-test พบว่าข้อมูลทั้ง 2 ชุดมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% แสดงว่าวิธีการสกัดที่ได้ออกแบบให้ง่ายขึ้นนั้นสามารถใช้สกัดหาได้



รูปที่ 4.13 ขั้นตอนและวิธีการสกัด

ตารางที่ 4.8 การเปรียบเทียบความใช้ได้ของวิธีการสกัด

No.	Sample code	Total polyphenols (%w/w)	
		วิธี M4	วิธีชุดทดสอบ
1	T 001	8.55±0.08	5.90±0.05
2	T 002	2.31±0.02	1.77±0.01
3	T 003	4.04±0.01	3.26±0.01
4	T 004	12.69±0.06	14.51±0.10
5	T 005	7.47±0.01	6.03±0.02
6	T 006	19.38±0.06	20.19±0.10
7	T 007	22.62±0.08	24.61±0.10
8	T 008	14.76±0.09	15.23±0.05
9	T 009	15.59±0.01	15.18±0.10
10	T 010	15.06±0.06	15.18±0.05
11	T 011	17.49±0.09	17.72±0.16
12	T 012	13.78±0.08	14.53±0.11
13	T 013	21.42±0.09	22.63±0.11
14	T 014	12.98±0.08	13.45±0.12

4.5 วิธีการวิเคราะห์ที่เหมาะสมของชุดทดสอบ

4.5.1 การออกแบบวิธีการวิเคราะห์ของชุดทดสอบ

จากที่พบว่าน้ำยาเคมีที่สังเคราะห์ขึ้นในงานวิจัยนี้สามารถใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดในชาได้ ดังนั้นในการทดลองนี้จะเป็นการออกแบบวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดในชาด้วยน้ำยาที่สังเคราะห์ขึ้น

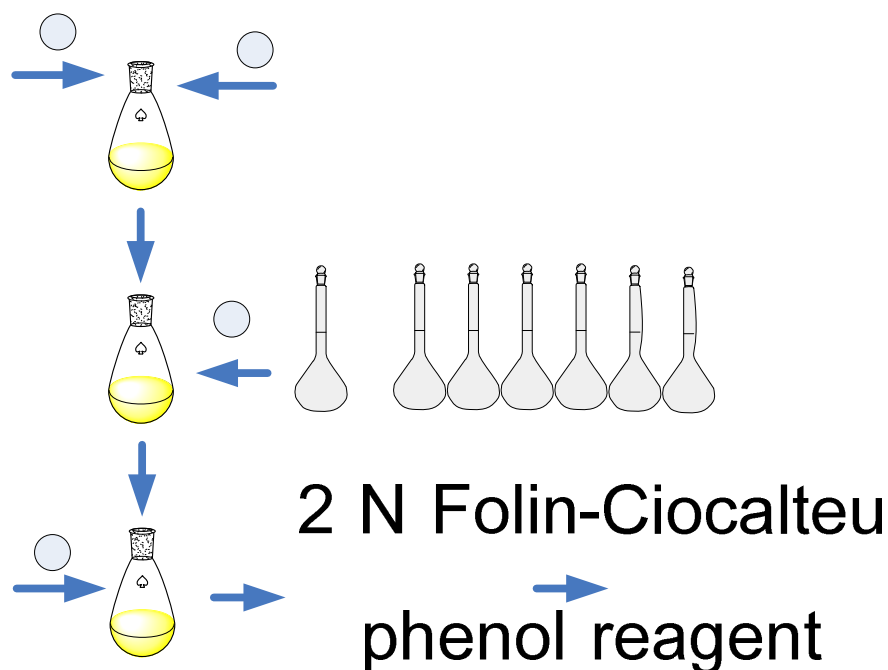
การวิเคราะห์โพลีฟีนอลทั้งหมดในชาตามวิธีมาตรฐานจะประกอบด้วยสารต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องในปฏิกิริยา ดังนี้

1. Folin-Ciocalteu's phenol reagent
2. Sodium carbonate
3. สารละลายชาสกัด

มีรายงานหลายชิ้นได้กล่าวว่าสารละลาย Folin-Ciocalteu's phenol reagent ความเข้มข้น 10%v/v ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาจะต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้ เนื่องจากเมื่อเจือจางแล้วน้ำยาเคมีจะไม่มีควมคงตัว และไม่สามารถเก็บไว้ได้นาน ดังนั้นในการประดิษฐ์ชุดทดสอบที่มีความคงตัวสูง อาจจะต้องเตรียมสารละลาย Folin-Ciocalteu's phenol reagent ในรูปที่เข้มข้น (ประมาณ 2 N) และเจือจางก่อนนำไปใช้ ดังนั้น ในเบื้องต้นนี้ผู้วิจัยได้ออกแบบชุดทดสอบให้ประกอบด้วยน้ำยาเคมี 3 ชนิด (รูปที่ 4.14) คือ FC-MFU, sodium carbonate และ น้ำกลั่น ทำการวิเคราะห์ด้วยสภาวะการวิเคราะห์ดังรูปที่ 4.15



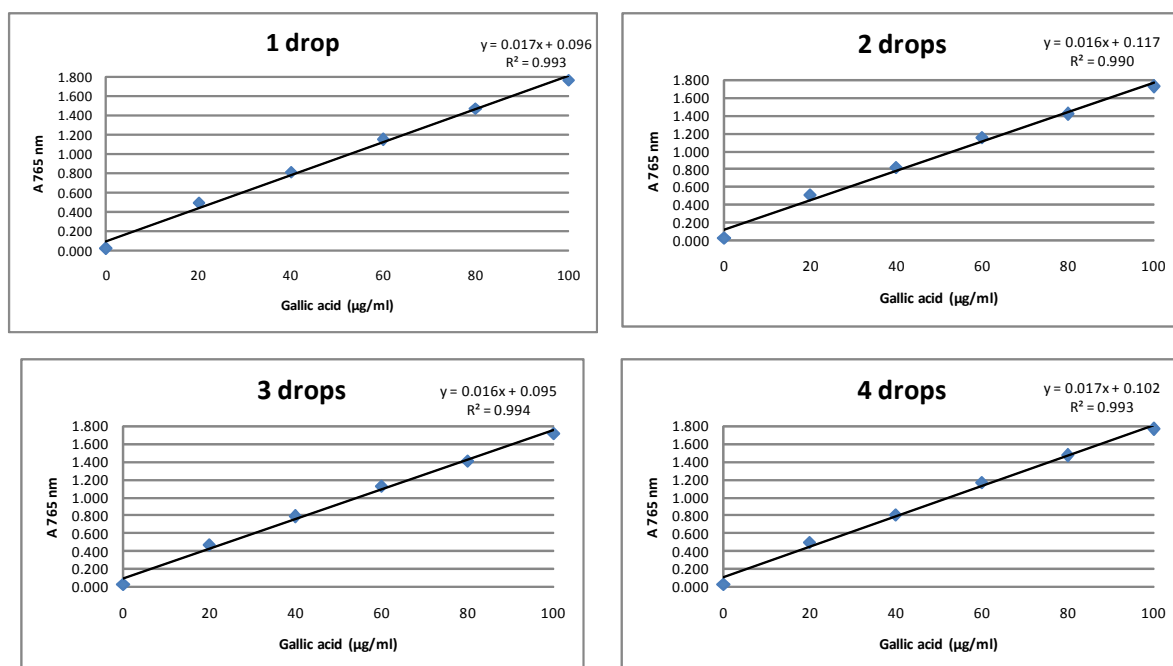
รูปที่ 4.14 การออกแบบชุดน้ำยาเคมี



รูปที่ 4.15 การวิเคราะห์โพลีฟีนอลทั้งหมดในชา

4.5.2 ความเข้มข้นของ 2 N Folin-Ciocalteu reagent ต่อผลการวิเคราะห์

จากชุดน้ำยาเคมีและวิธีการวิเคราะห์ที่ได้ออกแบบไว้ ผู้วิจัยได้ศึกษาผลของความเข้มข้นของ FC-MFU ต่อผลการทดสอบ ในการทดสอบนี้ผู้วิจัยได้วิเคราะห์โพลีฟีนอลทั้งหมดดังรูปที่ 4.15 โดยใช้ปริมาณ 2N FC-MFU ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน โดยหยดจากขวดหยดจำนวน 1, 2, 3 และ 4 หยด ซึ่งทำให้เกิดปฏิกิริยา 60 นาที ตัวอย่างที่ทดสอบคือสารมาตรฐานกรดแกลลิกความเข้มข้น 50 µg/ml และตัวอย่างชา 1 ตัวอย่าง โดยปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดในตัวอย่างชาเมื่อวิเคราะห์ตามสภาวะการทดสอบของวิธีมาตรฐานมีค่า 13.54 %w/w จากตารางที่ 4.9 และ 4.10 พบว่าความเข้มข้นของ FC-MFU ส่งผลต่อค่าโพลีฟีนอลทั้งหมดในชา โดยเมื่อทดสอบกับสารมาตรฐานกรดแกลลิก พบว่าจะได้ค่าที่ค่อนข้างถูกต้องเมื่อใช้ FC-MFU 3-4 หยด จำนวนหยดที่น้อย (1-2 หยด) ทำให้ได้ค่าที่คลาดเคลื่อนไปจากความเป็นจริง ในทำนองเดียวกันเมื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ในตัวอย่างชาจะพบว่า FC-MFU จำนวนหยด 3-4 หยด ให้ผลการวิเคราะห์ที่ใกล้เคียงกับค่าที่วิเคราะห์ตามวิธีมาตรฐานมากที่สุด (13.54%) ดังนั้นในการประดิษฐ์ชุดทดสอบจะใช้ FC-MFU ประมาณ 3 หยด แผนภาพวิธีการทดสอบที่ได้พัฒนาแสดงดังรูปที่ 4.17



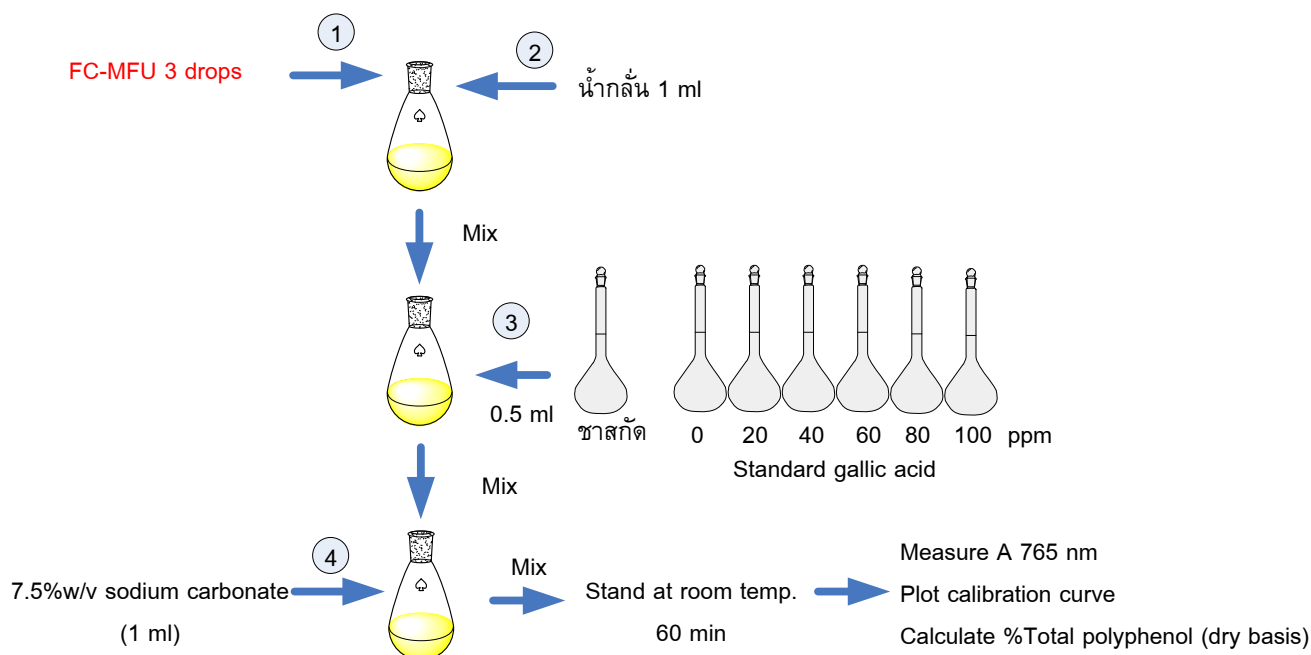
รูปที่ 4.16 กราฟมาตรฐานกรดแกลลิกที่ได้จากการใช้ FC-MFU จำนวน 1, 2, 3 และ 4 หยด

ตารางที่ 4.9 ผลการคำนวณหาค่าของ FC-MFU ต่อปริมาณกรดแกลลิกที่หาได้

จำนวนหยดของ FC-MFU	ปริมาณกรดแกลลิก (µg/ml)	%Relative error
1	52.94	5.88
2	51.59	3.18
3	50.36	0.72
4	50.44	0.88

ตารางที่ 4.10 ผลของจำนวนหยดของ FC-MFU ต่อปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดในตัวอย่างชา

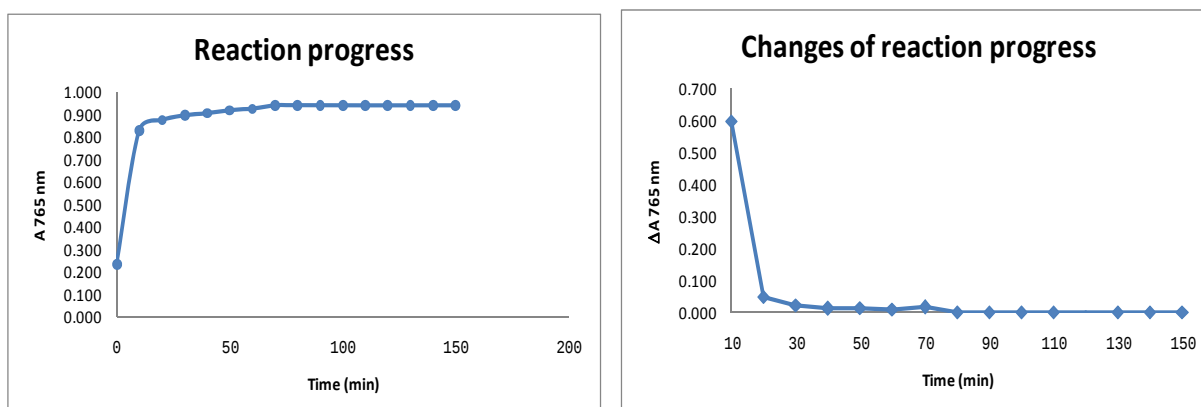
จำนวนหยดของ FC-MFU	ปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด (%w/w dry basis)	%Relative error
1	16.35	44.68
2	15.00	11.78
3	13.80	2.51
4	13.98	3.25



รูปที่ 4.17 วิธีการวิเคราะห์โพลีฟีนอลทั้งหมดในชา

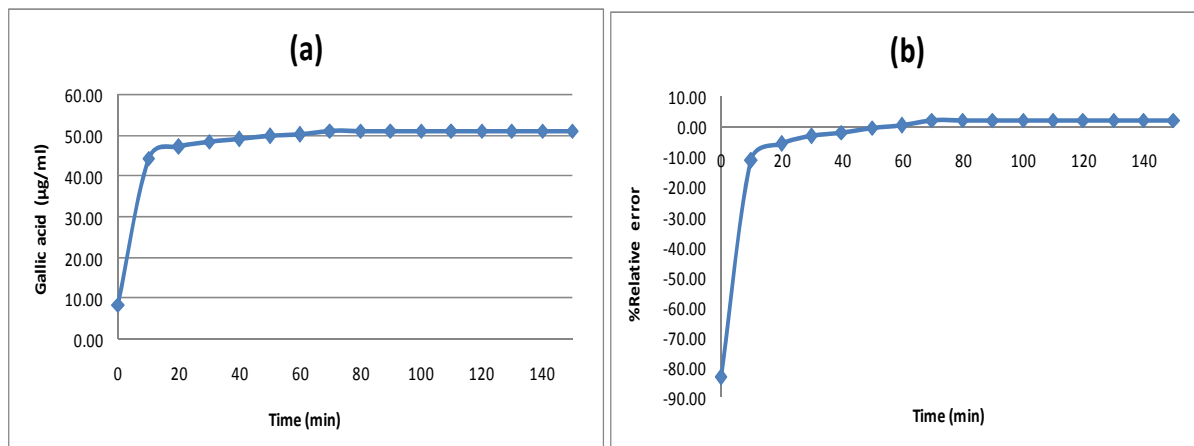
4.5.3 การติดตามการดำเนินไปของปฏิกิริยาการวิเคราะห์

การดำเนินไปของปฏิกิริยาระหว่างสารประกอบฟีนอลและ FC-MFU ได้ถูกติดตามและตรวจวัด ในการทดสอบนี้ใช้สารมาตรฐานกรดแกลลิกเข้มข้น 50 $\mu\text{g/ml}$ ทำปฏิกิริยาดังวิธีการวิเคราะห์ในรูปที่ 4.17 ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 nm เทียบกับเวลา (0-150 นาที) จากรูปที่ 4.18 พบว่าปฏิกิริยาระหว่างสารประกอบฟีนอลและ FC-MFU เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วภายใน 10 นาทีแรกของการวิเคราะห์ ปฏิกิริยาเกิดการเปลี่ยนแปลงค่อนข้างน้อยและช้าภายหลังจาก 10 นาที ที่เวลาประมาณ 90 ถึง 150 นาทีค่าการดูดกลืนแสงของสารคงที่ แสดงให้เห็นว่าปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์และสิ้นสุดลง



รูปที่ 4.18 การดำเนินไปของปฏิกิริยา

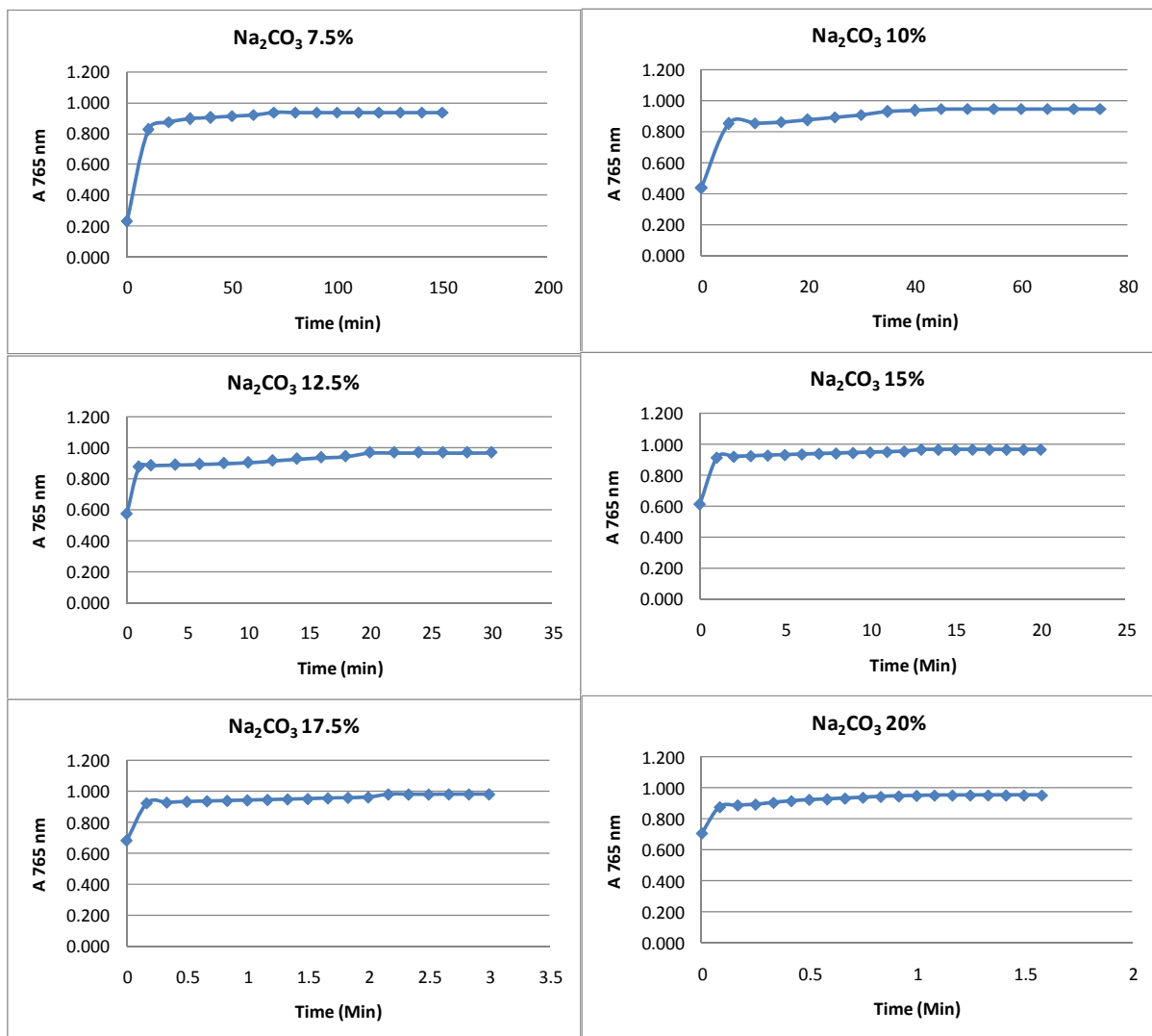
อย่างไรก็ตาม เมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงที่เวลาต่าง ๆ มาคำนวณปริมาณกรดแกลลิกจากกราฟมาตรฐานจะพบว่าเวลาการอ่านค่าการดูดกลืนแสงมีผลต่อค่าปริมาณกรดแกลลิก ปริมาณที่คำนวณได้จะเข้าใกล้ค่าจริง (50) ที่เวลาในการทำปฏิกิริยาประมาณ 50-60 นาที เมื่อเวลามากกว่า 60 นาที จะคำนวณได้เกินค่าจริงคิดเป็น %relative error ประมาณ 2% (รูปที่ 4.19)



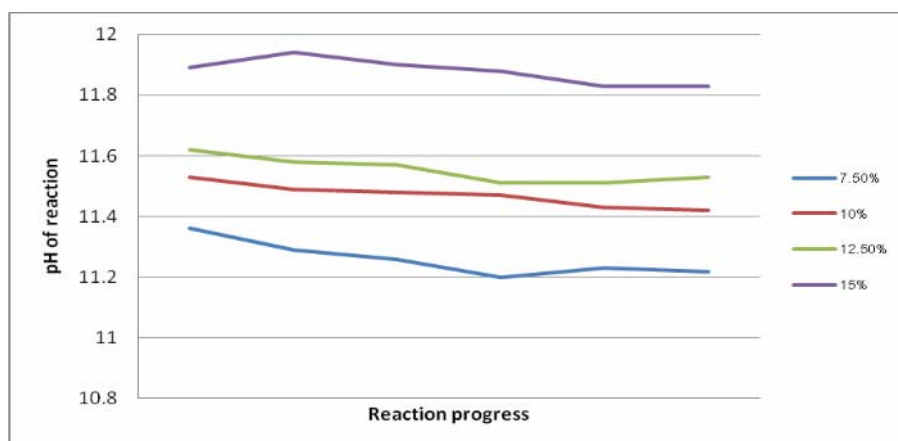
รูปที่ 4.19 ปริมาณกรดแกลลิก (a) และ %Relative error ณ เวลาต่าง ๆ (b)

4.5.4 ความเข้มข้นของ Sodium carbonate ต่อการดำเนินไปของปฏิกิริยา

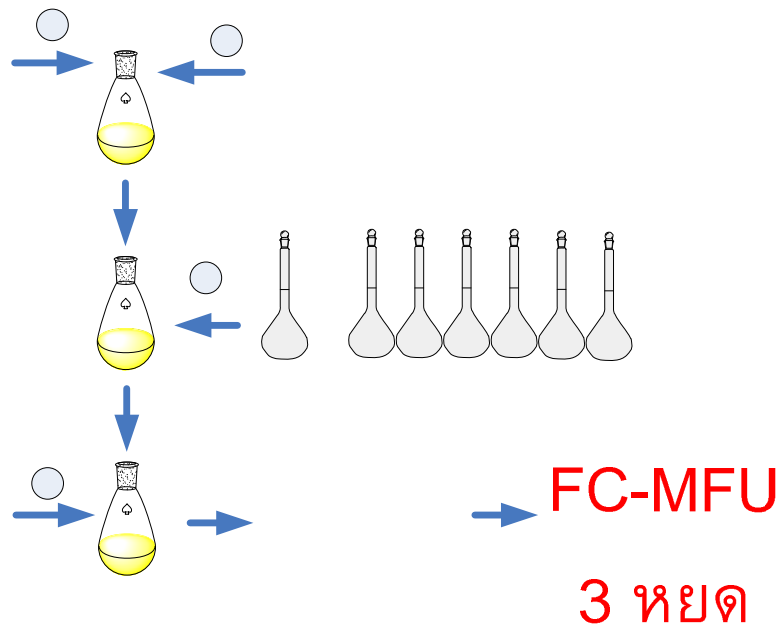
ในการศึกษานี้ได้วิเคราะห์โพลิฟีนอลทั้งหมดดังรูปที่ 4.17 โดยใช้ความเข้มข้นของโซเดียมคาร์บอเนต 7.5, 10, 12.5, 15, 17.5 และ 20 %w/v (pH 12.99, 13.01, 13.03, 13.06, 13.07 และ 13.11 ตามลำดับ) ตรวจวัดการดำเนินไปของปฏิกิริยาระหว่างสารประกอบฟีนอลและ FC-MFU โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 nm และวัดพีเอช ณ เวลาต่าง ๆ ตัวอย่างที่ทดสอบคือสารมาตรฐานกรดแกลลิกเข้มข้น 50 µg/ml จากการทดสอบพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคาร์บอเนตเป็นการเพิ่มพีเอชของ reaction mixture ซึ่งค่าพีเอชนี้จะส่งผลต่ออัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยา โดยจะทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารประกอบฟีนอลและ FC-MFU เกิดได้เร็วขึ้น โดยปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงแรก และจะเปลี่ยนแปลงอย่างต่อเนื่องจนกระทั่งคงที่ (รูปที่ 4.20) เมื่อปฏิกิริยาดำเนินไปค่าพีเอชของ reaction mixture จะลดลง (รูปที่ 4.21) เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคาร์บอเนตให้มากกว่าวิธีมาตรฐาน ปฏิกิริยาจะเกิดเร็วขึ้น ทำให้ลดเวลาในการวิเคราะห์ลง ดังนั้นในการออกแบบวิธีการวิเคราะห์เพื่อให้สามารถวิเคราะห์ได้อย่างรวดเร็วจะต้องเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคาร์บอเนต จากรูปที่ 4.20 พบว่าความเข้มข้นที่ 15, 17.5 และ 20 ทำให้สามารถวิเคราะห์ได้อย่างรวดเร็ว ในการออกแบบวิธีการวิเคราะห์นี้ได้เลือกความเข้มข้นของโซเดียมคาร์บอเนตที่ระดับ 15%w/v เนื่องจากใช้ปริมาณน้อยที่สุด แผนผังการวิเคราะห์ที่ได้พัฒนาขึ้นแสดงดังรูป 4.22



รูปที่ 4.20 ผลของโซเดียมคาร์บอเนตต่อการดำเนินไปของปฏิกิริยา



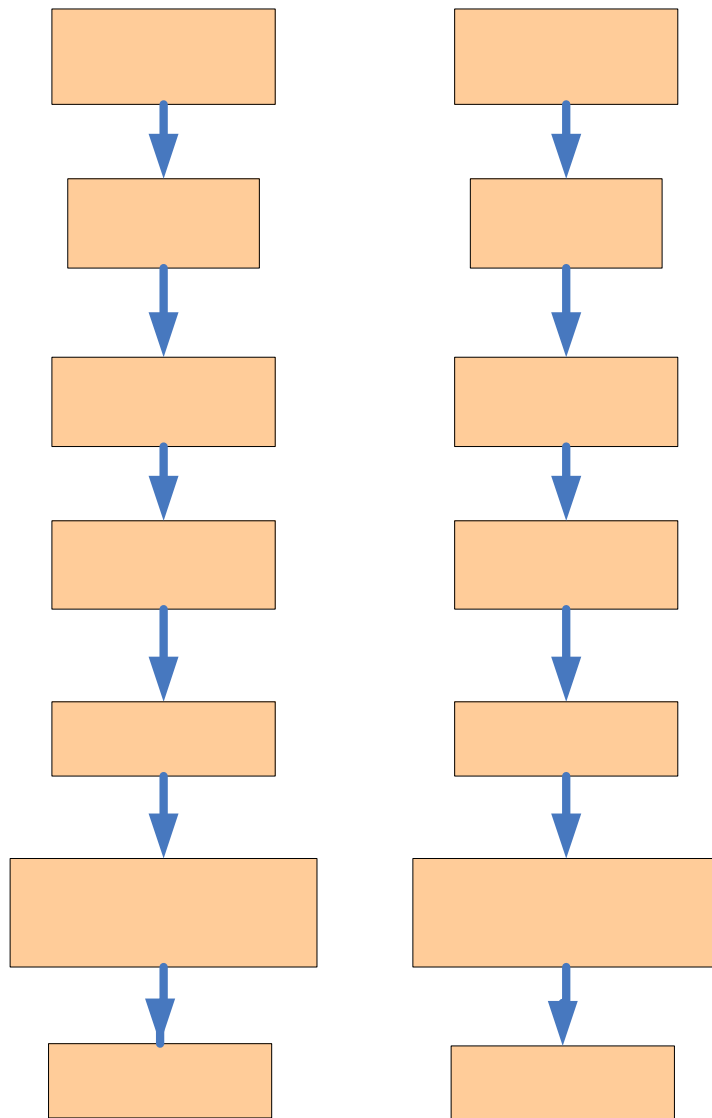
รูปที่ 4.21 ผลของโซเดียมคาร์บอเนตต่อค่าพีเอชของปฏิกิริยา



รูปที่ 4.22 วิธีการวิเคราะห์โพลิฟีนอลทั้งหมดในชา

4.5.5 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์

ทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ที่ได้ออกแบบโดยการสกัดตัวอย่างชา 14 ตัวอย่างตามวิธีการสกัด M4 และวิธีการสกัดของชุดทดสอบ นำสารสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์ตามวิธีมาตรฐาน และวิธีวิเคราะห์ของชุดทดสอบ (รูปที่ 4.23) เมื่อนำผลการวิเคราะห์ทั้ง 2 วิธีไปทดสอบค่าทางสถิติ paired-sample t-test พบว่า วิธีการวิเคราะห์มาตรฐาน และวิธีของชุดทดสอบให้ผลการทดสอบที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% แสดงว่าวิธีการวิเคราะห์ของชุดทดสอบสามารถใช้วิเคราะห์และให้ผลการทดสอบที่ไม่แตกต่างไปจากวิธีมาตรฐาน (ตารางที่ 4.11)



รูปที่ 4.23 วิธีการวิเคราะห์ตามแบบมาตรฐาน และวิธีการวิเคราะห์ของชุดทดสอบ

วิธีการวิ

ช

10

ตารางที่ 4.11 การเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์โดยวิธีมาตรฐานและวิธีของชุดทดสอบ

No.	Sample code	Total polyphenols (%w/w)			
		สกัดตามวิธี M4		สกัดตามวิธีชุดทดสอบ	
		วิธีมาตรฐาน	วิธีชุดทดสอบ	วิธีมาตรฐาน	วิธีชุดทดสอบ
1	T 001	8.55±0.08	7.98±0.04	5.90±0.05	5.11±0.07
2	T 002	2.31±0.02	2.12±0.01	1.77±0.01	1.55±0.08
3	T 003	4.04±0.01	3.90±0.01	3.26±0.01	3.51±0.08
4	T 004	12.69±0.06	12.50±0.08	14.51±0.10	12.81±0.16
5	T 005	7.47±0.01	6.87±0.01	6.03±0.02	6.36±0.07
6	T 006	19.38±0.06	19.15±0.04	20.19±0.10	19.11±0.12
7	T 007	22.62±0.08	22.56±0.06	24.61±0.10	24.51±0.11
8	T 008	14.76±0.09	14.03±0.08	15.23±0.05	15.80±0.12
9	T 009	15.59±0.01	15.34±0.08	15.18±0.10	15.06±0.08
10	T 010	15.06±0.06	14.85±0.06	15.18±0.05	15.31±0.14
11	T 011	17.49±0.09	17.02±0.06	17.72±0.16	17.69±0.12
12	T 012	13.78±0.08	13.06±0.06	14.53±0.11	14.03±0.11
13	T 013	21.42±0.09	21.03±0.06	22.63±0.11	22.16±0.08
14	T 014	12.98±0.08	12.78±0.06	13.45±0.12	13.83±0.16

4.6 การพัฒนาชุดทดสอบที่ได้ออกแบบ

การออกแบบชุดทดสอบในเบื้องต้นที่ได้ศึกษาไปแล้วนั้นประกอบด้วย การสังเคราะห์และตรวจสอบความใช้ได้ของน้ำยา FC-MFU การออกแบบและตรวจสอบความใช้ได้ของชุดสกัด การออกแบบและตรวจสอบความใช้ได้ของน้ำยาเคมี จากการทดลองพบว่า มีความเป็นไปได้ที่จะผลิตชุดทดสอบโพลิฟีนอลในชาโดยใช้น้ำยา Folin-Ciocalteu reagent ที่สังเคราะห์ขึ้นเอง

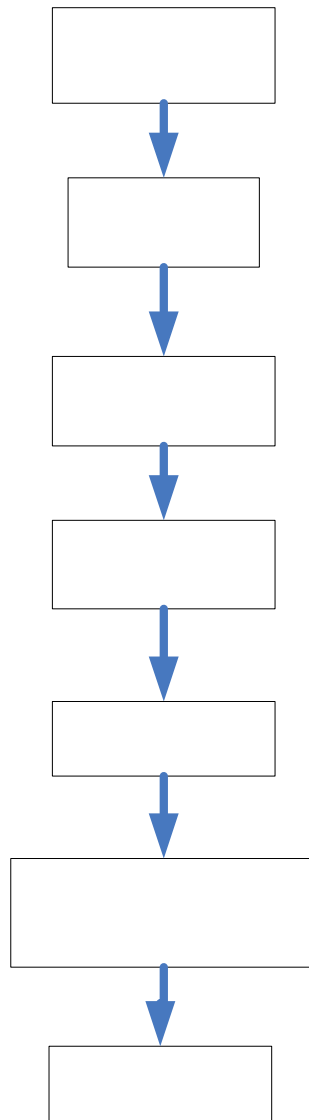
ชุดทดสอบที่ได้ออกแบบไว้ประกอบไปด้วย 2 ส่วนคือ การสกัด และการวิเคราะห์ ซึ่งอุปกรณ์และน้ำยาเคมีในชุดทดสอบประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ (รูปที่ 4.24) ดังนี้ คือ

- | | |
|------------------------------|--------------|
| 1. ครกบด และที่บด | จำนวน 1 ชุด |
| 2. ข้อนพลาสติก | จำนวน 2 อัน |
| 3. ขวดสกัด | จำนวน 1 ขวด |
| 4. ขวดเจือจาง | จำนวน 1 ขวด |
| 5. เข็มฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร | จำนวน 2 อัน |
| 6. หลอดทดลอง | จำนวน 4 หลอด |
| 7. น้ำยาเคมี FC-MFU | จำนวน 1 ขวด |
| 8. น้ำยาเคมี MFU1 | จำนวน 1 ขวด |
| 9. น้ำยาเคมี MFU2 | จำนวน 1 ขวด |



รูปที่ 4.24 อุปกรณ์ในชุดทดสอบที่ได้ออกแบบ

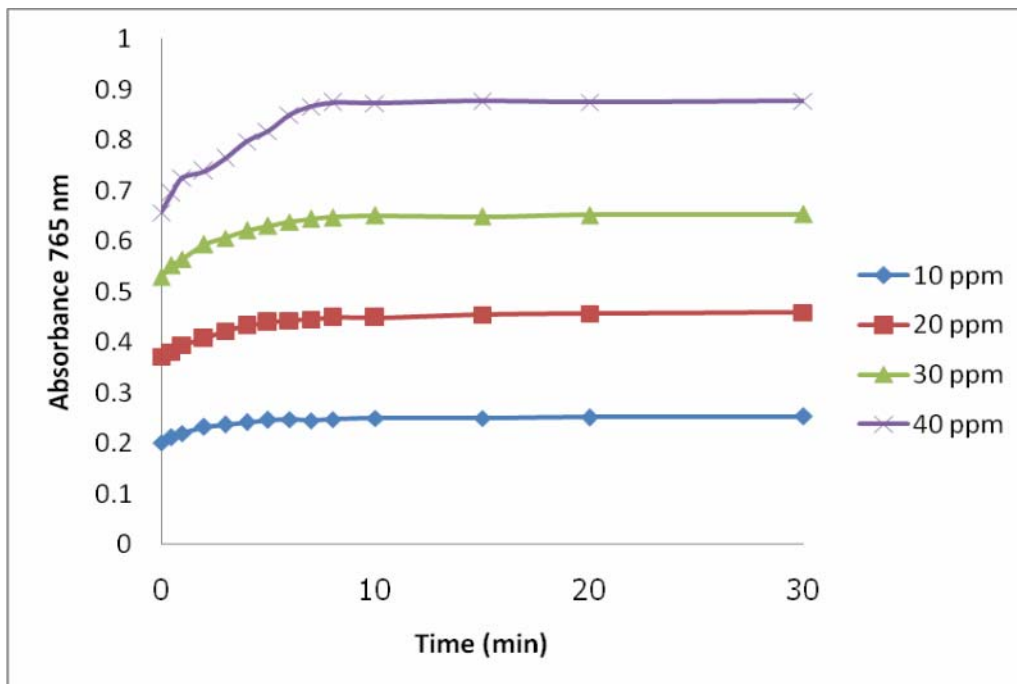
อย่างไรก็ตาม ชุดทดสอบที่ได้ออกแบบนี้จำเป็นต้องพัฒนาชุดทดสอบให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น โดยการศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่ส่งผลต่อการทดสอบ และทำมาตรฐานเพื่อหาความเข้มข้นของโพลิฟีนอลในชา ดังนั้นในการพัฒนาชุดทดสอบที่จะศึกษานี้จะเป็นการพัฒนาชุดทดสอบตามรูปแบบที่ได้ออกแบบไว้ และตามวิธีการวิเคราะห์ที่เหมาะสมตามที่ได้เคยศึกษาไว้ (รูปที่ 4.25)



รูปที่ 4.25 ขั้นตอนการวิเคราะห์ของชุดทดสอบ

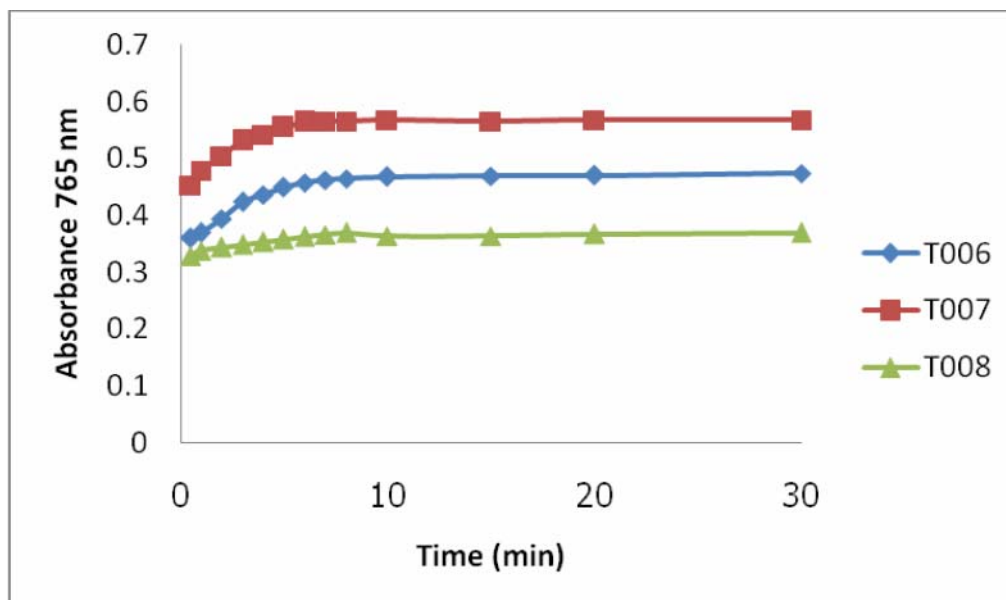
4.6.1 ระยะเวลาที่เหมาะสมในการอ่านผลทดสอบ

ในการทดสอบนี้ใช้สารมาตรฐานกรดแกลลิก ความเข้มข้น 10, 20, 30 และ 40 $\mu\text{g/ml}$ เป็นตัวอย่างที่ทราบค่าจริงในการวิเคราะห์ ทำการวิเคราะห์โดยวิธีของชุดทดสอบ (รูป 4.25) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 nm ตั้งแต่ 0-30 นาที จากรูป 4.26 พบว่าความเข้มข้นของโพลิฟีนอลส่งผลต่อระยะเวลาที่เหมาะสมในการอ่านผล กล่าวคือ โพลิฟีนอลที่ความเข้มข้นต่ำจะมีเวลาที่ค่าการดูดกลืนแสงจะคงที่เร็วกว่าโพลิฟีนอลที่ความเข้มข้นสูง พบว่า ณ เวลานั้นที่ 10 ค่าการดูดกลืนแสงเริ่มคงที่ ดังนั้นเวลาในการอ่านผลควรเริ่มอ่านภายหลังจากเวลา 10 นาที



รูปที่ 4.26 ผลของเวลาในการทดสอบต่อค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยา

ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบโดยใช้ตัวอย่างชา 3 ตัวอย่าง ทำการสกัดและวิเคราะห์ตามวิธีทดสอบ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 nm ตั้งแต่ 0 -30 นาที ผลการทดสอบแสดงดังรูปที่ 4.27 พบว่าค่าการดูดกลืนแสงของชาตัวอย่างคงที่ที่เวลา 10 นาที เช่นเดียวกับการใช้สารมาตรฐานกรดแกลลิก ดังนั้น ในการอ่านผลทดสอบจึงเลือกอ่านผลภายหลัง 10 นาที หลังทำปฏิกิริยา



รูปที่ 4.27 ผลของเวลาในการทดสอบต่อค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยา

4.6.2 สีของสารมาตรฐานเมื่อทำปฏิกิริยากับ FC-MFU

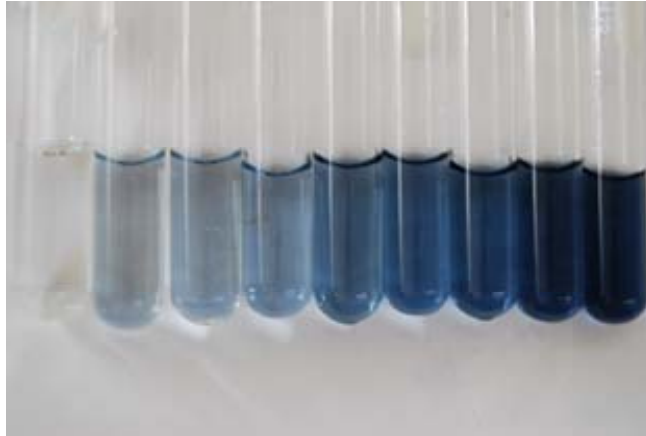
ในการทดสอบนี้มีวัตถุประสงค์ในการทำแถบสีมาตรฐานเพื่อบ่งชี้ความเข้มข้นของโพลิฟีนอลในตัวอย่าง ในการทดลองนี้ได้เตรียมสารมาตรฐานกรดแกลลิกความเข้มข้นตั้งแต่ 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ (ตามวิธีมาตรฐาน) จากนั้นทำปฏิกิริยาตามวิธีชุดทดสอบ ภายหลังจาก 10 นาที สังเกตสีของสารมาตรฐาน และถ่ายรูป ดังแสดงในรูปที่ 4.28 จากการสังเกตสีด้วยตาเปล่าพบว่าสามารถแยกความแตกต่างของสีด้วยตาเปล่าได้ที่ระดับความเข้มข้น 0-50 $\mu\text{g/ml}$ ที่ระดับความเข้มข้นสูงกว่านี้สารละลายจะมีสีน้ำเงินเข้ม ไม่สามารถบอกความแตกต่างได้ด้วยสายตาได้ ดังนั้น ในการทำสีเพื่อใช้เทียบมาตรฐานจะใช้ความเข้มข้นของกรดแกลลิกที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 0-50 $\mu\text{g/ml}$ เพื่อให้สามารถสังเกตสีได้ถูกต้อง



รูปที่ 4.28 สีของสารมาตรฐานกรดแกลลิกความเข้มข้น 0-100 $\mu\text{g/ml}$ ที่ทำปฏิกิริยากับ FC-MFU

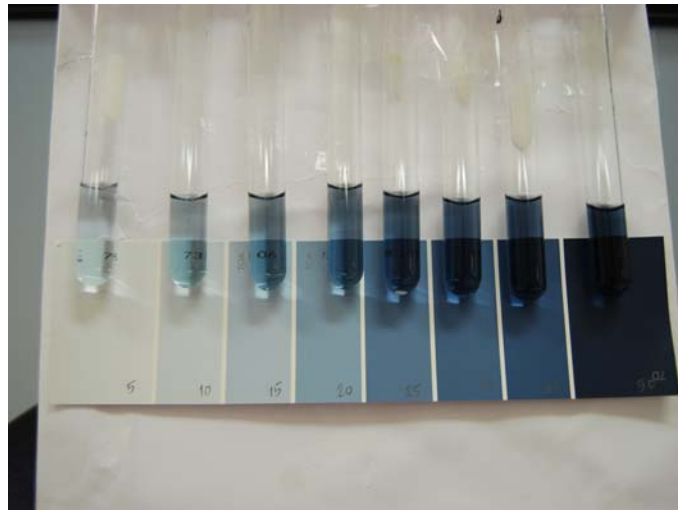
4.6.3 การทำแถบสีบ่งชี้ปริมาณโพลิฟีนอลทั้งหมด

การทำแถบสีเพื่อบ่งชี้ปริมาณโพลิฟีนอลทั้งหมดเริ่มจากการเตรียมสารละลายกรดแกลลิกมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้น 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 และ 50 $\mu\text{g/ml}$ ทำการวิเคราะห์ตามวิธีทดสอบที่ได้พัฒนาขึ้น (รูปที่ 4.25) สังเกตสีของสารเมื่อเวลาผ่านไป 10 นาที พบว่าการมองด้วยสายตาเปล่าสามารถบอกความแตกต่างของความเข้มสีได้ในช่วงความเข้มข้น 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 และ 50 $\mu\text{g/ml}$ (รูปที่ 4.29) ดังนั้นในการทำแถบสีมาตรฐานจะทำแถบสีที่ระดับความเข้มข้น ตั้งแต่ 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 และ 50 $\mu\text{g/ml}$



รูปที่ 4.29 สีของสารมาตรฐานกรดแกลลิกความเข้มข้น 0-50 µg/ml

ผู้วิจัยได้เทียบสีของสารมาตรฐานกรดแกลลิกความเข้มข้น 5-50 µg/ml กับแถบสีน้ำเงินที่มีความเข้มจากอ่อนถึงแก่โดยการสังเกตความเข้มสีด้วยสายตา และวัดค่าสีในหน่วย CMYK ได้แถบสีที่ใช้เทียบความเข้มข้นของกรดแกลลิกมาตรฐานดังแสดงดังรูปที่ 4.30

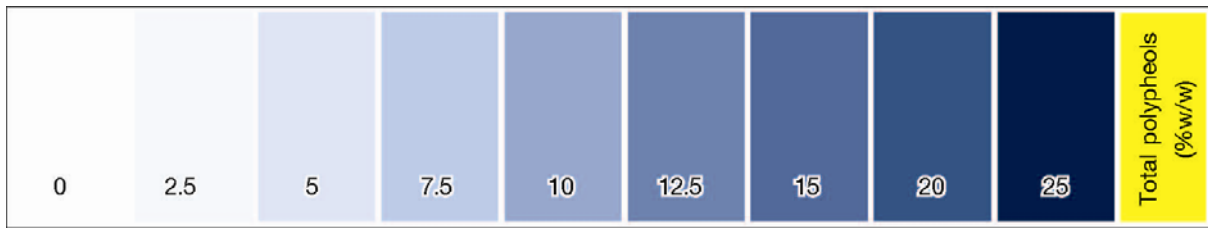


รูปที่ 4.30 การเทียบสีของสารมาตรฐานกรดแกลลิกกับแถบสี

จากแถบสีที่เทียบกับกรดแกลลิกมาตรฐานเข้มข้น 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 และ 50 µg/ml เมื่อนำค่าความเข้มข้นมาคำนวณหาปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดตามสูตรคำนวณด้านล่าง จะได้ปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดในหน่วยเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก เท่ากับ 0, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 20 และ 25%w/w ตามลำดับ แถบสีมาตรฐานที่ได้แสดงดังรูปที่ 4.31

$$\text{Total Polyphenols (\%w/w)} = \frac{C \times 100 \times 20 \times 100}{0.2 \times 2 \times 10^6} = 0.5 \times C$$

เมื่อ C คือความเข้มข้นของกรดแกลลิก 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 และ 50 µg/ml



รูปที่ 4.31 แถบสีมาตรฐานสำหรับเทียบหาปริมาณโพลีฟีนอลในชา

4.7 การตรวจสอบความใช้ได้ของชุดทดสอบ

การออกแบบและพัฒนาชุดทดสอบที่ได้ศึกษาไปแล้วนั้นประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ ดังนี้

1. การสังเคราะห์และตรวจสอบความใช้ได้ของน้ำยา FC-MFU
2. การออกแบบและตรวจสอบความใช้ได้ของชุดสกัดชา
3. การออกแบบและตรวจสอบความใช้ได้ของปฏิกิริยาเคมี
4. การทำแถบสีมาตรฐานเพื่อบ่งชี้ปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดในชา

ในหัวข้อนี้จะเป็นการตรวจสอบความใช้ได้ของชุดทดสอบที่ได้ออกแบบและพัฒนาขึ้น โดยชุดทดสอบประกอบไปด้วยส่วนต่าง ๆ ดังนี้ คือ

- | | |
|------------------------------|--------------|
| 1. ครกบด และที่บด | จำนวน 1 ชุด |
| 2. ช้อนพลาสติก | จำนวน 2 อัน |
| 3. ขวดสกัด | จำนวน 1 ขวด |
| 4. ขวดเจือจาง | จำนวน 1 ขวด |
| 5. เข็มฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร | จำนวน 2 อัน |
| 6. หลอดทดลอง | จำนวน 4 หลอด |
| 7. น้ำยาเคมี FC-MFU | จำนวน 1 ขวด |
| 8. น้ำยาเคมี MFU1 | จำนวน 1 ขวด |
| 9. น้ำยาเคมี MFU2 | จำนวน 1 ขวด |
| 10. แถบสีมาตรฐาน | จำนวน 1 ชิ้น |

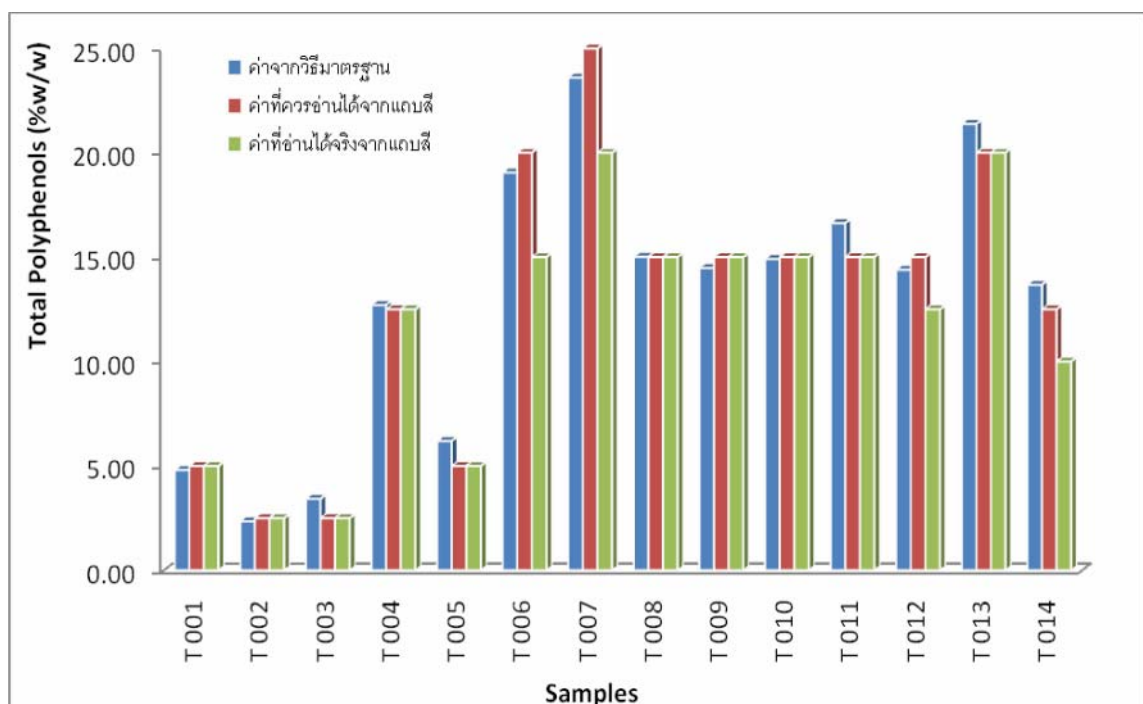
4.7.1 ความใช้ได้ของชุดทดสอบ

ศึกษาความใช้ได้ของชุดทดสอบในการวิเคราะห์โพลีฟีนอลทั้งหมดในชาโดยการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ระหว่างวิธีชุดทดสอบกับวิธีมาตรฐาน ทำโดยการเตรียมสารมาตรฐานกรดแกลลิกเข้มข้น 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 µg/ml ซึ่งใช้เป็นค่าจริงในการวิเคราะห์ ทำการวิเคราะห์ 2 วิธี คือวิธีทดสอบมาตรฐาน และวิธีของชุดทดสอบโดยเทียบผลจากแถบสีมาตรฐานที่ได้ทำขึ้น นำผลการทดสอบมาเปรียบเทียบกันดังแสดงในตารางที่ 4.12 พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 0, 10, 20, 30 และ 40 µg/ml สามารถอ่านค่าจากแถบสีได้ตรงกับค่าของสารมาตรฐาน อย่างไรก็ตามที่ระดับความเข้มข้น 50 µg/ml ไม่สามารถระบุค่าที่อ่านจากแถบสีได้ชัดเจนว่าเป็น 50 µg/ml เนื่องจากความเข้มสีที่ระดับ 40 และ 50 µg/ml มีค่าใกล้เคียงกัน ทำให้ไม่สามารถระบุความเข้มข้นได้อย่างชัดเจนเมื่อมองด้วยตาเปล่า

ตารางที่ 4.12 การเปรียบเทียบผลของการทดสอบ

ความเข้มข้นของ สารมาตรฐาน ($\mu\text{g/ml}$)	ค่าที่อ่านได้ ($\mu\text{g/ml}$)	
	วิธีมาตรฐาน	วิธีเทียบสีกับแถบสีของชุดทดสอบ
0	0	0
10	10.07	10
20	20.41	20
30	29.86	30
40	40.77	40
50	49.83	40-50

ผู้วิจัยได้ทำการสกัดชาจำนวน 14 ตัวอย่าง นำสารสกัดมาวิเคราะห์โดยวิธีทดสอบมาตรฐาน และวิธีของชุดทดสอบซึ่งเทียบผลจากแถบสีมาตรฐาน ผลการเปรียบเทียบแสดงดังตารางที่ 4.13 พบว่าจากตัวอย่างชาจำนวนทั้งหมด 14 ตัวอย่าง มีผลการทดสอบของวิธีชุดทดสอบที่ให้ค่าใกล้เคียงกับวิธีมาตรฐานจำนวน 10 ตัวอย่าง ผลการทดสอบที่ไม่ผ่านมีจำนวน 4 ตัวอย่าง โดยผลการทดสอบที่ไม่ผ่านเนื่องจากผู้ทดสอบอ่านค่าจากแถบสีได้น้อยกว่าค่าที่ควรอ่านได้จากแถบสี



รูปที่ 4.32 การเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์โดยวิธีมาตรฐานและวิธีชุดทดสอบ

4.7.2 ความถูกต้องของการวิเคราะห์

ในการทดสอบนี้ได้ทำการ spike สารมาตรฐานลงในตัวอย่างชา 3 ตัวอย่าง ที่ระดับความเข้มข้น 5, 10 และ 15%w/w จำนวน 7 ซ้ำ ทำการสกัดและวิเคราะห์โดยวิธีชุดทดสอบ หาความเข้มข้นของโพลีฟีนอล 2 วิธีได้แก่ การเทียบกับกราฟมาตรฐานที่วัดความเข้มข้นโดย spectrophotometer และการเทียบจากแถบสีมาตรฐานที่ได้ประดิษฐ์ขึ้น ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 4.13 และ 4.14 พบว่าการเติมสารมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนลงไปในการสกัดสามารถตรวจวัดระดับความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นได้โดยด้วยการเทียบแถบสี แสดงให้เห็นว่าชุดทดสอบที่ประดิษฐ์ขึ้นสามารถใช้ตรวจวัดปริมาณโพลีฟีนอลในชาได้ อย่างไรก็ตามมีผลการทดสอบที่ไม่ผ่านอยู่บ้าง ทั้งนี้การสังเกตด้วยสายตาเปล่าอาจทำให้ผลคลาดเคลื่อนไปบ้างได้

ตารางที่ 4.13 ความถูกต้องของการวิเคราะห์เมื่อเทียบกับกราฟมาตรฐาน

Sample	ความเข้มข้นที่เติม (%w/w)	Total Polyphenols (%w/w)			%Recovery
		ค่าที่อ่านได้เริ่มต้น	ค่าที่ควรอ่านได้	ค่าที่อ่านได้จริง	
T001	5	5.04	10.04	10.79	115.06
	10	5.04	15.04	15.03	99.94
	15	5.04	20.04	19.98	99.59
T002	5	2.43	7.43	7.34	98.18
	10	2.43	12.43	12.40	99.68
	15	2.43	17.43	17.45	100.14
T003	5	3.62	8.62	8.55	98.59
	10	3.62	13.62	13.22	96.04
	15	3.62	18.62	18.25	97.55

ตารางที่ 4.14 ความถูกต้องของการวิเคราะห์เมื่อเทียบกับแถบสีของชุดทดสอบ

Sample	ความเข้มข้นที่เติม (%w/w)	Total Polyphenols (%w/w)			ผลการ ทดสอบ
		ค่าที่อ่านได้ เริ่มต้น	ค่าที่ควรอ่านได้	ค่าที่อ่านได้จริง	
T001	5	5.0	10.0	10.0	ผ่าน
	10	5.0	15.0	15.0	ผ่าน
	15	5.0	20	15	ไม่ผ่าน
T002	5	2.5	7.5	7.5	ผ่าน
	10	2.5	12.5	12.5	ผ่าน
	15	2.5	17.5	17.5	ผ่าน
T003	5	2.5	7.5	7.5	ผ่าน
	10	2.5	12.5	12.5	ผ่าน
	15	2.5	17.5	17.5	ผ่าน

4.8 การจัดทำเอกสารคู่มือการใช้งานและการออกแบบกล่อง

ได้ทำการจัดทำเอกสารคู่มือการใช้งาน ออกแบบกล่อง และสติ๊กเกอร์ต่างๆ ผลการจัดทำและออกแบบแสดงดังรูปที่ 4.33-4.39

ชุดทดสอบโพลีฟีนอลทั้งหมดในชา

ชุดทดสอบโพลีฟีนอลทั้งหมดในชา เป็นชุดตรวจวัดปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดในชาแห้งด้วยวิธี Folin-Ciocalteu assay โดยการทำปฏิกิริยาระหว่าง Folin-Ciocalteu reagent และสารประกอบฟีนอลในชาได้ผลิตภัณฑ์สีน้ำเงิน ทำการตรวจวัดปริมาณโพลีฟีนอลโดยเทียบระดับความเข้มของสีกับแถบสีมาตรฐาน

ตัวอย่าง

ช่วงของการทดสอบ

ค่าต่ำสุดที่ตรวจวัดได้

อายุของชุดทดสอบ

สถานะการเก็บ

จำนวนทดสอบ

ส่วนประกอบของชุดทดสอบ

ชาแห้ง

2.5 – 25 % โดยน้ำหนัก

2.5 % โดยน้ำหนัก

1 ปี

อุณหภูมิห้อง

75 ครั้ง

1. ครกบด และที่บด	จำนวน 1 ชุด
2. ข้อนพลาสติก	จำนวน 2 อัน
3. ขวดสกัด	จำนวน 1 ขวด
4. ขวดเจือจาง	จำนวน 1 ขวด
5. เข็มฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร	จำนวน 2 อัน
6. หลอดทดสอบ	จำนวน 4 หลอด
7. น้ำยาเคมี FC-MFU	จำนวน 1 ขวด
8. น้ำยาเคมี MFU1	จำนวน 1 ขวด
9. น้ำยาเคมี MFU2	จำนวน 1 ขวด
10. แถบสีมาตรฐาน	จำนวน 1 ชุด

วิธีการทดสอบ

วิธีการทดสอบแบ่งเป็น 2 ขั้นตอน คือ การสกัดชา และการวิเคราะห์

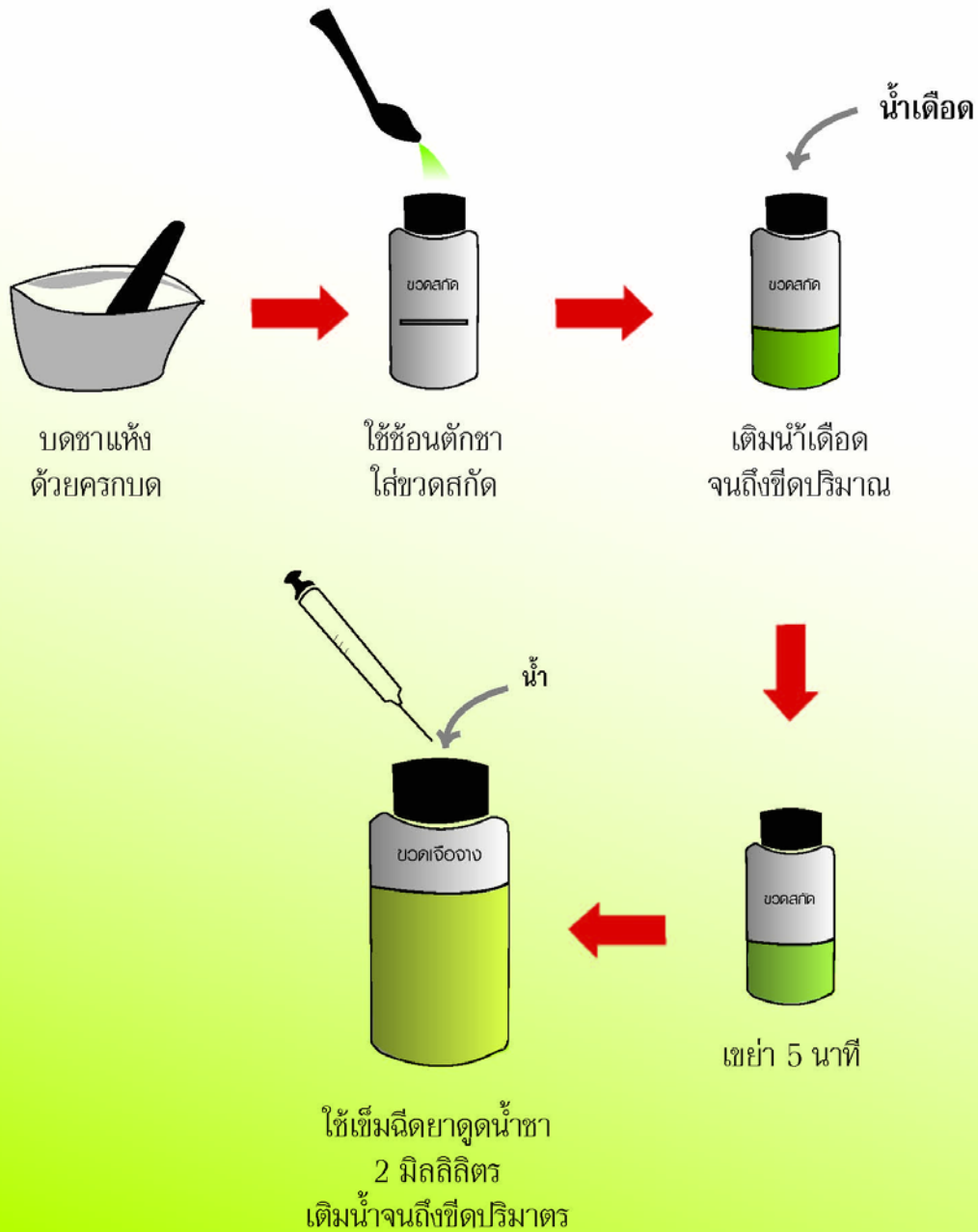
ขั้นตอนที่ 1 การสกัดชา

- 1.1 บดใบชาแห้งด้วยครกบดจนละเอียด ใช้ช้อนตักชาใส่ในขวดสกัด
- 1.2 เติมน้ำเดือดลงขวดสกัดจนถึงขีดปริมาตร ปิดฝา และเขย่าเป็นเวลา 5 นาที
- 1.3 ใช้เข็มฉีดยาดูดน้ำชา 2 มิลลิลิตร ใส่ในขวดเจือจาง เติมน้ำจนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน

ขั้นตอนที่ 2 การวิเคราะห์

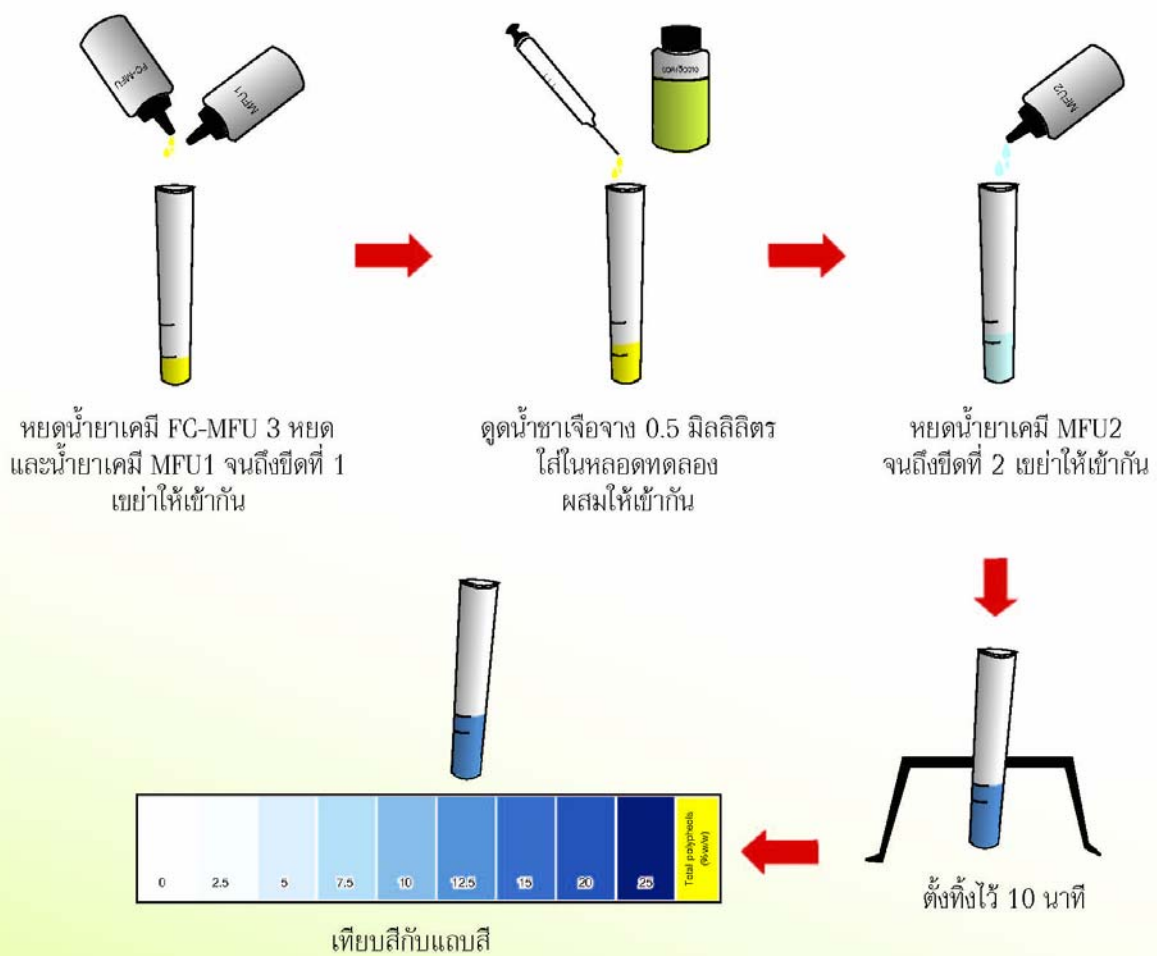
- 2.1 หยดน้ำยาเคมี FC-MFU 3 หยดลงในหลอดทดลอง
- 2.2 หยดน้ำยาเคมี MFU1 จนถึงขีดที่ 1 เขย่าให้เข้ากัน
- 2.3 ใช้เข็มฉีดยาดูดน้ำชาเจือจาง (ข้อ 1.3) 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เขย่าให้เข้ากัน
- 2.4 หยดน้ำยาเคมี MFU2 จนถึงขีดที่ 2 เขย่าให้เข้ากัน
- 2.5 ตั้งทิ้งไว้ ประมาณ 10 นาที เทียบสีกับแถบสีมาตรฐาน

ขั้นตอนที่ 1 การสกัดยา



รูปที่ 4.35 เอกสารคู่มือการใช้งานในรูปแบบกระดาษ A4 พับครึ่ง หน้า 3

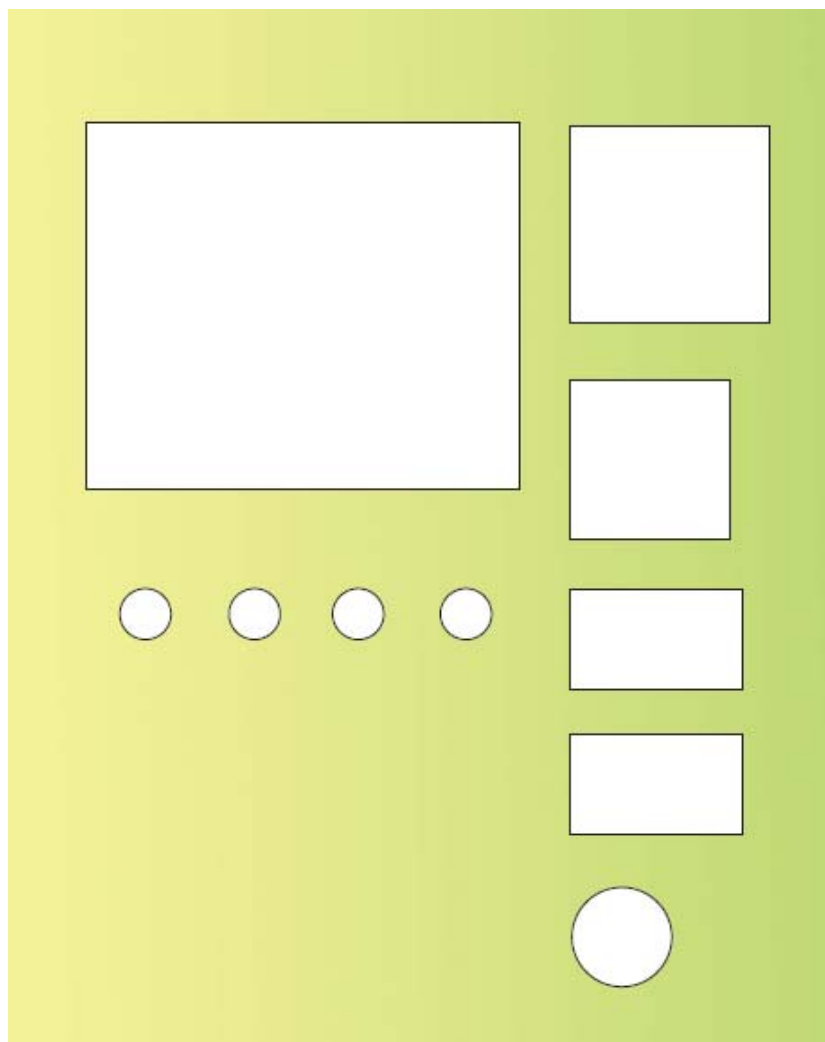
ขั้นตอนที่ 2 การวิเคราะห์



รูปที่ 4.36 เอกสารคู่มือการใช้งานในรูปแบบกระดาษ A4 พับครึ่ง หน้า 4



รูปที่ 4.37 ฉลากสำหรับบ่งชี้ขวดต่าง ๆ ในชุดทดสอบ



รูปที่ 4.38 การวางอุปกรณ์ในชุดทดสอบ



รูปที่ 4.39 รูปแบบกล่อง และการพับกล่อง

บทที่ 5

สรุปผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผล

5.1.1 การสังเคราะห์ และการตรวจสอบความใช้ได้ของ Folin-Ciocalteu reagent (FC)

ในโครงการวิจัยนี้สามารถทำการสังเคราะห์ Folin-Ciocalteu reagent (FC) ได้ และเรียกสารที่สังเคราะห์ขึ้นนี้ว่า FC-MFU โดย FC-MFU มีสมบัติเบื้องต้น ได้แก่ pH สี ความหนาแน่น และความเข้มข้นของกรดใกล้เคียงกับ Folin-Ciocalteu reagent (FC) ที่ผลิตจากต่างประเทศ ราคาต้นทุนสารเคมีในการสังเคราะห์ 873 บาทต่อ 500 ml เมื่อเปรียบเทียบความใช้ได้ของน้ำยาเคมี FC-MFU พบว่าสามารถใช้วิเคราะห์หาโพลีฟีนอลทั้งหมดได้ไม่แตกต่างไปจากน้ำยาเคมี FC ที่ซื้อจากต่างประเทศ น้ำยาเคมี FC-MFU มีความคงตัวอย่างน้อย 12 เดือนเมื่อเก็บไว้ในที่อุณหภูมิห้องปกติ ดังนั้นสามารถผลิตชุดทดสอบโพลีฟีนอลในชาโดยใช้น้ำยาเคมี FC-MFU ที่สังเคราะห์ขึ้นในงานวิจัยนี้ได้

5.1.2 วิธีการสกัดที่เหมาะสมของชุดทดสอบ

วิธีการสกัดส่งผลต่อปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดในชา ในงานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายที่จะวิเคราะห์โพลีฟีนอลทั้งหมดในชาที่ได้จากการชงดื่มชาจริง และต้องการเลือกวิธีสกัดที่ง่าย สะดวก รวดเร็ว ตลอดจนไม่สิ้นเปลืองอุปกรณ์ในการสกัดมากเกินไป จากการทดสอบได้วิธีการสกัดที่เหมาะสมของชุดทดสอบคือ สกัดชาผง 0.2 กรัม (1 ช้อน) ด้วยน้ำเดือดปริมาตร 20 ml ทำการสกัดโดยเขย่าในขวดสกัด จากนั้นเจือจาง 50 เท่าโดยดูดสารละลาย 2 ml จากขวดสกัดใส่ลงในขวดเจือจาง ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 ml

5.1.3 วิธีการวิเคราะห์ที่เหมาะสมของชุดทดสอบ

วิธีการวิเคราะห์ที่เหมาะสมของชุดทดสอบที่ได้ประดิษฐ์ขึ้นในโครงการวิจัยนี้ เริ่มจากหยดน้ำยาเคมี FC-MFU จำนวน 3 หยดในหลอดทดลอง ตามด้วยน้ำยาเคมี MFU1 ปริมาตร 1 ml เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นเติมน้ำชาเจือจาง 0.5 ml เขย่าให้เข้ากัน เติม 15% sodium carbonate ปริมาตร 1 ml เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที เปรียบเทียบความเข้มของสีกับแถบสีมาตรฐาน

5.1.4 ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์โดยชุดทดสอบ

ชุดทดสอบที่ได้ประดิษฐ์ขึ้นสามารถวิเคราะห์หาปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดได้ด้วยวิธีการที่ง่าย รวดเร็ว ไม่ต้องใช้อุปกรณ์ที่ซับซ้อน อย่างไรก็ตามความใช้ได้ของชุดทดสอบยังไม่สามารถเทียบเท่าได้กับวิธีมาตรฐาน เนื่องจากวิธีของชุดทดสอบเป็นวิธีที่เทียบความเข้มสีกับแถบสี ซึ่งอาจทำให้การอ่านผลตามระดับความเข้มสีด้วยสายตาของผู้ทดสอบผิดพลาดไปบ้าง ส่งผลให้อาจได้ค่าการทดสอบที่ผิดพลาดไปเมื่อเทียบกับวิธีทดสอบมาตรฐาน

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากการประดิษฐ์ชุดทดสอบ ผู้วิจัยมีข้อเสนอแนะ ดังนี้

1. ควรมีการจัดทำชุดน้ำยาเคมี เนื่องจากการสกัดชาสามารถใช้ชุดสกัดทำการสกัดชาในตัวอย่างต่อ ๆ ไป ได้โดยไม่ต้องเปลี่ยนชุดสกัด ดังนั้นควรมีการจัดทำชุดน้ำยาเคมีสำหรับการวิเคราะห์โดยเฉพาะ ซึ่งชุดน้ำยาเคมีควรประกอบด้วยน้ำยาเคมี 3 ชนิดคือ MFU1, MFU2 และ FC-MFU
2. ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาความคงตัวของน้ำยา FC-MFU เป็นเวลาประมาณ 13 เดือน และพบว่าน้ำยาเคมี FC-MFU ยังมีความคงตัว และสามารถวิเคราะห์ได้ ดังนั้นควรมีการศึกษาคงตัวของน้ำยาเคมี FC-MFU ต่อไปเรื่อย ๆ จนกว่าน้ำยาจะไม่สามารถใช้งานได้
3. การหาปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดในชุดทดสอบนี้เป็นการเทียบความเข้มข้นกับแถบสีมาตรฐาน ดังนั้นในการผลิตชุดทดสอบจริง ๆ นั้น แถบสีมาตรฐานที่ใช้เทียบความเข้มข้นควรมีสีที่ใกล้เคียงที่สุดกับสีที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างสารมาตรฐานกับ FC-MFU ดังนั้นการทำแถบสีมาตรฐานจะต้องเทียบสีกับทางโรงพิมพ์โดยกำหนดค่าสีในหน่วย CMYK ของแถบสีมาตรฐานในแต่ละความเข้มข้น นำพิมพ์ในโรงพิมพ์เพื่อให้ได้สีที่ใกล้เคียงมากที่สุด
4. การหาปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดในชุดทดสอบนี้เป็นการเทียบความเข้มข้นกับแถบสีมาตรฐาน ในบางตัวอย่างของการทดสอบพบว่าผู้ทดสอบอ่านผลผิดพลาดไปจากผลที่ควรอ่านได้ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะข้อผิดพลาดของแถบสีเอง และข้อผิดพลาดที่เกิดจากการแยกความเข้มข้นของผู้ทดสอบแต่ละคนด้วย ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาถึงผลของผู้ทดสอบต่อค่าที่อ่านได้จริงหลังจากทำแถบสีมาตรฐานที่ใกล้เคียงที่สุดแล้ว (ตามข้อ 3)
5. ควรมีการจัดทำชุดทดสอบจริง ๆ โดยส่งให้กับโรงพิมพ์และโรงงานทำกล่อง เมื่อได้ชุดทดสอบแล้วจึงนำออกเผยแพร่ให้กับโรงงานผลิตชา ร้านค้าชา และผู้บริโภคชา ได้รับรู้ถึงการตรวจสอบปริมาณโพลีฟีนอลในชาในลำดับต่อไป
6. น่าจะมีการประดิษฐ์ชุดทดสอบที่ใช้ได้กับตัวอย่างน้ำชา เช่น ชาที่ดื่มชงในถ้วย และชาบรรจุขวดพร้อมดื่ม โดยการหาช่วงการวิเคราะห์ที่เหมาะสม และทำแถบสีมาตรฐานที่เหมาะสมในช่วงของน้ำชา เพื่อจะได้ชุดทดสอบที่เป็นตัวบ่งชี้ปริมาณโพลีฟีนอลในน้ำชาที่ผู้บริโภคจะได้รับในหนึ่งหน่วยบริโภค
7. น่าจะมีการประดิษฐ์ชุดทดสอบเพื่อบ่งชี้ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในชา ในลำดับต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- Antolovich, M., Prenzler, P., Robards, K., and Ryan, D. 2000. Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. *Analyst*, 125:989–1009.
- Brune, M., Hallberg, L., and Skanberg, A.B. 1991. Determination of iron-binding phenolic groups in foods. *J. Food Sci.*, 56:128–131; 167.
- Deshpande, S.S., Cheryan, M., and Salunkhe, D.K. 1986. Tannin analysis of food products. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 24:401–449.
- Earp, C.F., Akingbala, J.O., Ring, S.H., and Rooney, L.W. 1981. Evaluation of several methods to determine tannins in sorghum with varying kernel characteristics. *Cereal Chem.*, 58:234–238.
- Hagerman, A.E., Zhao, Y., and Johnson, S. 1997. Methods for determination of condensed and hydrolyzable tannins, in *Antinutrients and Phytochemicals in Food*, Shahidi, F., Ed., ACS Symposium Series 662, American Chemical Society, Washington, D.C., 209–222.
- Ikawa M, Schaper TD, Dollard CA, Sasner JJ (2003). "Utilization of Folin-Ciocalteu phenol reagent for the detection of certain nitrogen compounds". *J. Agric. Food Chem.* **51** (7): 1811–5.
- Jackman, R.L., Yada, R.Y., and Tung, M.A. 1987. A review: separation and chemical properties of anthocyanins used for their qualitative and quantitative analysis. *J. Food Biochem.*, 11:279–308.
- Makkar, H.P.S. 1989. Protein precipitation methods for quantification of tannins: a review. *J. Agric. Food Chem.*, 37:1197–1202.
- Mole, S. and Waterman, P. 1987a. A critical analysis of techniques for measuring tannins in ecological studies. I. Techniques for chemically defining tannins. *Oecologia*, 72:137–147.
- Mole, S. and Waterman, P. 1987b. A critical analysis of techniques for measuring tannins in ecological studies. II. Techniques for biochemically defining tannins. *Oecologia*. 72:148–156.
- Naczki, M. and Shahidi, F. 1989. The effect of methanol–ammonia–water treatment on the content of phenolic acids of canola. *Food Chem.*, 31:159–164.
- Naczki, M., Wanasundara, P.K.J.P.D., and Shahidi, F. 1992b. A facile spectrophotometric quantification method of sinapic acid in hexane-extracted and methanol–ammonia–water treated mustard and rapeseed meals. *J. Agric. Food Chem.*, 40:444–448.
- Porter, L.J. 1989. Tannins, in *Methods in Plant Biochemistry*, vol. 1, Harborne, J.B., Ed., Academic Press, San Diego, CA, 389–420.
- Price, M.L. and Butler, L.G. 1977. Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain. *J. Agric. Food Chem.*, 25:1268–1273.
- Price, M.L., Van Scoyoc, S., and Butler, L.G. 1978. A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum. *J. Agric. Food Chem.*, 26:1214–1218.
- Scalbert, A., Monties, B., and Janin, G. 1989. Tannins in woods: comparison of different estimation methods. *J. Agric. Food Chem.*, 37:1324–1329.

- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Meth Enzymol* 1999; 299: 152-178.
- Swain, T. and Hillis, W.E. 1959. Phenolic constituents of *Prunus domestica*. I. Quantitative analysis of phenolic constituents. *J. Sci. Food Agric.*, 10:63–68.
- Tzagoloff, A. 1963. Metabolism of sinapine in mustard plants. I. Degradation of sinapine into sinapic acid and choline. *Plant Physiol.*, 38:202–206.

ภาคผนวก

1. ตารางเปรียบเทียบการดำเนินงานกิจกรรม

กิจกรรม	เดือนที่														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1. ศึกษาวิธีมาตรฐานของการวิเคราะห์หาปริมาณโพลีฟีนอลศึกษาการสกัดตัวอย่าง การเตรียมสาร วิธีการวิเคราะห์ ช่วงของการวิเคราะห์ การแปรผลการทดสอบ ดำเนินการทดสอบโดยใช้น้ำยาทดสอบจากต่างประเทศ	 														
2. ศึกษาวิธีการสกัดที่เหมาะสมที่จะใช้กับชุดทดสอบ ศึกษาวิธีการสกัดโพลีฟีนอลในใบชา เลือกวิธีสกัดที่ง่าย รวดเร็ว ประหยัด และให้ผลถูกต้อง		 													
3. สังเคราะห์Folin-Ciocalteu reagent จากสารตั้งต้นต่าง ๆ หารลักษณะของน้ำยาทดสอบที่สังเคราะห์ได้เปรียบเทียบกับน้ำยาทดสอบจากต่างประเทศ ศึกษาความคงตัวของน้ำยาทดสอบ			 												
4. ศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่ส่งผลต่อปฏิกิริยาศึกษาผลของพีเอช ความเข้มข้นของน้ำยาทดสอบ ความเข้มข้นของสารสกัด เวลาการเกิดในปฏิกิริยา			 												
5. ออกแบบชุดทดสอบ รวบรวมอุปกรณ์เพื่อประกอบเป็นชุดทดสอบ				 											
6. ทำสีมาตรฐานเพื่อป้องกันปริมาณโพลีฟีนอล วัดค่าสีของสารมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นในช่วงของการทดสอบ ผสมสีให้ได้ระดับความเข้มเดียวกับระดับความเข้มสีของสารมาตรฐาน					 										
7. การตรวจสอบความใช้ได้ชุดทดสอบที่ประดิษฐ์ขึ้น หารค่า LOD, LOQ และ LOL ตรวจสอบ Accuracy ของวิธีทดสอบตรวจสอบ Precision ของวิธีทดสอบ							 								
8. เปรียบเทียบผลการทดสอบของวิธีมาตรฐานและวิธีทดสอบที่ได้ประดิษฐ์ขึ้น วิเคราะห์ตัวอย่างเปรียบเทียบกันระหว่างวิธีมาตรฐานและวิธีทดสอบที่ได้ประดิษฐ์ขึ้น									 						
9. จัดทำเอกสารคู่มือการใช้งาน											 				
10. การจัดทำรายงานฉบับสมบูรณ์											 				



กิจกรรมที่ได้คาดการณ์ไว้



กิจกรรมที่เกิดขึ้นจริง

2. ผลที่คาดว่าจะได้รับ

เดือนที่	กิจกรรม	ผลที่คาดว่าจะได้รับ
6 เดือนที่ 1	1. ศึกษาวิธีมาตรฐานของการวิเคราะห์หาปริมาณโพลิฟีนอล 2. ศึกษาวิธีการสกัดที่เหมาะสมที่จะใช้กับชุดทดสอบ 3. สังเคราะห์ Folin-Ciocalteu reagent และเตรียมน้ำยาทดสอบ 4. ศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่ส่งผลต่อปฏิกิริยา	1. ได้เรียนรู้วิธีมาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบ 2. ได้วิธีการสกัดที่เหมาะสม 3. ได้น้ำยาทดสอบ 4. ได้ทราบว่าปฏิกิริยาการทดสอบควรเป็นสภาวะใดจึงจะเหมาะสมที่สุด
6 เดือนที่ 2	1. ออกแบบชุดทดสอบ 2. การทำสีมาตรฐานเพื่อบ่งชี้ปริมาณโพลิฟีนอล 3. การตรวจสอบความใช้ได้ชุดทดสอบที่ประดิษฐ์ขึ้น 4. เปรียบเทียบผลการทดสอบของวิธีมาตรฐานและวิธีทดสอบที่ได้ประดิษฐ์ขึ้น 5. จัดทำเอกสารคู่มือการใช้งาน	1. ได้ชุดทดสอบ 2. ได้มาตรฐานสีที่ใช้เทียบเพื่อหาปริมาณ 3. ได้ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี 4. ได้ผลการทดสอบที่เปรียบเทียบกันระหว่างวิธีมาตรฐานและวิธีที่ได้ประดิษฐ์ขึ้น 5. ได้เอกสารการใช้งานของชุดทดสอบ

3. ตาราง Output

Output		ในกรณีที่ผลสำเร็จไม่ถึง 100% ให้ท่านระบุสาเหตุการแก้ไขที่ท่านดำเนินการ
กิจกรรมในข้อเสนอโครงการ หรือจากการปรับแผน	ผลสำเร็จ	
1. ศึกษาวิธีมาตรฐาน ISO 14502-1:2005	100%	
2. ศึกษาวิธีการสังเคราะห์ Folin-Ciocalteu reagent และหาลักษณะเฉพาะเช่น สี ความเข้มข้นกรด ความหนาแน่น ความคงตัว เปรียบเทียบผลกับน้ำยาทดสอบที่ซื้อจากต่างประเทศ ทดสอบความเสถียรของน้ำยาทดสอบ วิเคราะห์ต้นทุนการสังเคราะห์	100%	
3. ศึกษาวิธีการสกัดสารจากใบชาแห้ง เช่นสกัดด้วยน้ำเดือด สกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ความเข้มข้นต่าง ๆ ผลของเวลาที่ใช้สกัด เปรียบเทียบปริมาณโพลีฟีนอลที่วิเคราะห์ได้ เลือกวิธีการสกัดที่ทำได้ง่าย สะดวก ประหยัด และให้ผลเป็นที่น่ายอมรับ	100%	
4. ศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่ส่งผลต่อการเกิดปฏิกิริยา เช่น ผลของพีเอช ความเข้มข้นของน้ำยาทดสอบ ความเข้มข้นของสารสกัด เวลาในการเกิดปฏิกิริยา และสัดส่วนที่เหมาะสมของสารต่อจุดยุติของปฏิกิริยา	100%	
5. ออกแบบชุดทดสอบ	100%	
6. การทำสีมาตรฐานเพื่อบ่งชี้ปริมาณโพลีฟีนอล	100%	
7. การตรวจสอบความใช้ได้ของชุดทดสอบที่ประดิษฐ์ขึ้น	100%	
8. เปรียบเทียบผลการทดสอบของวิธีมาตรฐานและวิธีทดสอบที่ได้ประดิษฐ์ขึ้น	100%	
9. จัดทำเอกสารคู่มือการใช้งาน	100%	

ลงนาม.....

(ธีรพงษ์ เทพกรณ์)

วันที่.....