บทที่ 3
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

3.1 วัสดุ

3.1.1 วัตถุดิบ

1. ตัวอย่างใบชาสด สายพันธุ์อู่หลงเบอร์ 12 เก็บจาก 3 ท้องที่ในจังหวัดเชียงราย คือ อำเภอแม่ฟ้าหลวงซึ่งเก็บในเดือนมีนาคม 2549 อำเภอเมืองเก็บในเดือนเมษายน 2549 และอำเภอแม่ลาวเก็บในเดือนกันยายน 2549

2. ตัวอย่างใบชาสดและแห้ง ในกระบวนการผลิตสายพันธุ์อู่หลงเบอร์ 12 ได้รับจากโรงงานใบชาในจังหวัดเชียงราย จำนวน 3 โรงงาน ได้แก่ โรงงานที่ 1 จากอำเภอแม่ฟ้าหลวง ซึ่งเก็บในเดือนเมษายน 2549 โรงงานที่ 2 จากอำเภอแม่ฟ้าหลวง เก็บในเดือนสิงหาคม 2549 และโรงงานที่ 3 จากอำเภอแม่จัน เก็บในเดือนมกราคม 2550

3. ตัวอย่างชาที่ผ่านขั้นตอนการผลิตตั้งแต่การผึ่งจนถึงการม้วนใบ ที่นำมาผลิตเพื่อใช้ในการทดสอบทางประสาทสัมผัส ใช้ชาสายพันธุ์อู่หลงเบอร์ 12 จากโรงงานที่ 1 อำเภอแม่ฟ้าหลวง ซึ่งเก็บในเดือนกรกฎาคม 2550 และโรงงานที่ 2 อำเภอแม่ฟ้าหลวง เก็บในเดือนกันยายน 2550

4. ตัวอย่างชาอู่หลงจากท้องตลาด สายพันธุ์อู่หลงเบอร์ 12 จากอำเภอแม่จัน จังหวัดเชียงราย

3.1.2 สารเคมี

ใช้สารเคมีเกรดวิเคราะห์ (analytical grade) ได้แก่ (-)-epigallocatechin gallate, (+)-catechin และ gallic acid (Sigma, Germany), sodium carbonate, sodium nitrite และ sodium hydroxide (Merck, Germany), trifluoroacetic acid (Fluka, Switzerland), acetronitrile (ACN) (J.T. Baker, USA), folin-ceocultue (CarloErba, Italy) และ aluminium chloride (BDH, England)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2 การเก็บตัวอย่าง

3.2.1 ตัวอย่างใบชาสด

ทำการเก็บชาสายพันธุ์อู่หลงเบอร์ 12 ในไร่ชา 3 ไร่ จากอำเภอเมือง อำเภอแม่ลาว และอำเภอแม่ฟ้าหลวง จังหวัดเชียงราย ตอนเช้าประมาณ 9.00 นาฬิกา โดยใช้มือเด็ด เก็บแยกเป็น

(1) **(2)** **(3)**

รูป 3.1 ส่วนยอดตูม (1) ส่วนใบอ่อนสองใบแรก (2) ส่วนยอดตูมกับใบอ่อนสองใบแรก (3)

3.2.2 ตัวอย่างใบชาในกระบวนการผลิต

ทำการสุ่มตัวอย่างในกระบวนการผลิต โดยสุ่มเก็บมาจากจุดต่าง ๆ 10 จุดภายในรุ่นนั้น ตัวอย่างใบชาในกระบวนการผลิตประกอบไปด้วยใบชาจากแต่ละขั้นตอน ดังนี้

1. ขั้นตอนการรับชาจะเก็บชาหลังจากคนงานเก็บตัวอย่างชาใส่กระสอบผ้า หรือตะกร้า (รูป ก.1 ในภาคผนวก) มาส่งถึงโรงงานชา

2. ขั้นตอนการพลิกกลับใบด้วยเครื่องหมุนไม้ไผ่ (รูป ก.2 ในภาคผนวก) โดยเก็บก่อนเข้าเครื่องหมุนไม้ไผ่และเมื่อออกจากเครื่องหมุนไม้ไผ่

3. ขั้นตอนการคั่วด้วยเครื่องคั่วทรงกระบอกแบบหมุน (rotary panner) (รูป ก.3 ในภาคผนวก) โดยเก็บก่อนเข้าเครื่องคั่ว และเมื่อออกจากเครื่องคั่วครั้งแรกและครั้งที่สอง

4. ขั้นตอนการนวด ด้วยเครื่องนวดชา (รูป ก.4 ในภาคผนวก) จะเก็บหลังจากชาออกมาจากเครื่องนวด

5. ขั้นตอนการอบด้วยเครื่องอบลมร้อน (tray drier) แบบสายพานลำเลียง (รูป ก.5 ในภาคผนวก) โดยเก็บใบชาก่อนเข้าเครื่องอบ และเมื่อออกมาจากเครื่องอบครั้งแรกและครั้งสุดท้าย

6. ขั้นตอนการผึ่งค้างคืน เก็บจากกระด้งที่ผึ่งชาไว้ค้างคืน (รูป ก.6 ในภาคผนวก) ก่อนที่จะเข้าสู่กระบวนการอื่นต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

7. ขั้นตอนการม้วนใบ ด้วยเครื่องม้วน (rolling mill) (รูป ก.7 ในภาคผนวก) จะเก็บใบชาหลังจากออกมาจากเครื่องม้วนรอบแรก

ใบชาที่ได้จากแต่ละขั้นตอนในกระบวนการผลิตของแต่ละโรงงาน ขั้นตอนละ 30 กรัม จะถูกนำมาให้ความร้อนด้วยเครื่องไมโครเวฟ (Sharp, model R-246, Japan) ที่ระดับความร้อน 600 วัตต์ เป็นระยะเวลา 90 วินาที จากนั้นจะนำมาบรรจุใส่กระปุกพลาสติกสีขาวขุ่นทรงกระบอกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.5×5.5 นิ้ว แล้วปิดฝาให้แน่นหุ้มด้วยฟิล์มหุ้มอาหาร ชนิด PVC บรรจุใส่กล่องโฟมซึ่งมีน้ำแข็งบรรจุอยู่ เพื่อขนส่งใบชาจากโรงงานชามายังห้องปฏิบัติการมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง จังหวัดเชียงราย แล้วนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์ต่อไป

3.2.3 ตัวอย่างชาเม็ดที่ผ่านขั้นตอนการผลิตตั้งแต่การผึ่งจนถึงการม้วนใบ ปริมาณ 500 กรัม เก็บใส่ถุงพลาสติกชนิด polypropylene (PP) แล้วรัดยางให้แน่น ขนส่งมายังห้องปฏิบัติการมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง จังหวัดเชียงราย แล้วนำมาทำการทดลองทันทีเมื่อมาถึงห้องปฏิบัติการหรือเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอทำการทดลองต่อไป

3.2.4 ตัวอย่างชาอู่หลงจากท้องตลาด บรรจุสุญญากาศในถุง aluminium foil laminate ขนาดบรรจุ 500 กรัม เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อรอการทดสอบทางประสาทสัมผัส

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การศึกษาปริมาณ total polyphenol, total catechins และ EGCG ในยอดและใบ และการศึกษาเวลาในการผึ่งต่อปริมาณ total polyphenol, total catechins และ EGCG

ใบชาสดแต่ละส่วนที่เก็บจากไร่ชา จากข้อ 3.2.1 จะถูกแบ่งเป็น 7 ส่วน ส่วนละประมาณ 20 กรัม นำมาใส่ตระกร้าพลาสติก จากนั้นนำไปผึ่งในที่ร่มในห้องปฏิบัติการ เป็นเวลา 0, 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจะนำแต่ละส่วนของชาออกมา 1 ส่วน แล้วนำมาให้ความร้อนด้วยเครื่องไมโครเวฟ (Sharp, model R-246, Japan) ที่ระดับความร้อน 600 วัตต์ เป็นระยะเวลา 90 วินาที แล้วบรรจุใส่ถุงซิปพลาสติก ขนาด 6×9 นิ้ว จากนั้นนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์ต่อไป

3.3.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิและเวลาในการอบใบชาเม็ดต่อปริมาณ total polyphenol, total catechins และ EGCG

นำตัวอย่างชาเม็ดที่ได้จากข้อ 3.2.3 แบ่งใส่ถาดอลูมิเนียมขนาด 8.5 × 12 นิ้ว ถาดละประมาณ 25 กรัม 12 ถาด นำมาอบที่อุณหภูมิ 90, 100, 110 และ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60, 90 และ 120 นาที โดยเริ่มอบทีละอุณหภูมิ เริ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ในตู้อบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สภาวะที่มีปริมาณ EGCG และ total catechins สูงสุดและมีปริมาณความชื้นไม่เกิน 7 เปอร์เซ็นต์ ตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมใบชา แสดงดังภาคผนวก ง จะถูกคัดเลือกเพื่อนำไปทดสอบทางประสาทสัมผัส

3.3.3 การทดสอบทางประสาทสัมผัส

ทดสอบลักษณะทั่วไปของน้ำชาในด้าน สี กลิ่นหอมของชา รสชาติของน้ำชา รสหวานหลังจากกลืน (sweet aftertaste) ความฝาด ความขม และความชอบโดยรวม จากใบชาที่ผ่านกระบวนการผลิตตั้งแต่ขั้นตอนการผึ่งจนม้วนเป็นเม็ด แล้วนำไปอบที่ห้องปฏิบัติการด้วยอุณหภูมิและเวลาตามข้อ 3.3.1 ที่มีปริมาณ total catechins และ สูงสุด จาก 2 โรงงาน โดยใช้ผู้ชิมที่ไม่ผ่านการฝึกฝน 50 คน ซึ่งเป็นนักศึกษาและพนักงานในมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง ใช้การทดสอบการยอมรับแบบ 9 point hedonic scale (9 = ชอบมากที่สุด 8 = ชอบมาก 7 = ชอบปานกลาง 6 = ชอบเล็กน้อย 5 = เฉยๆ 4 = ไม่ชอบเล็กน้อย 3 = ไม่ชอบปานกลาง 2 = ไม่ชอบมาก 1 = ไม่ชอบมากที่สุด) ตามแบบประเมินคุณภาพ ในภาคผนวก ค ทำการชงชาดัดแปลงจาก Wang *et al.* (2004) โดยนำชา 3 กรัม ใส่ลงในถ้วยชงชา แล้วรินน้ำเดือด ปริมาณ 150 มิลลิลิตร ใส่ลงในถ้วยชงชา จับเวลา 2 นาที แล้วกรองกากชาออก รินใส่ถ้วยชิมชนิดเมลามีนสีขาว ปริมาณ 20 มิลลิลิตร และจัดเรียงใส่ถาดโดยวิธีสุ่ม ตั้งชื่อตัวอย่างเป็นเลขสุ่ม 3 ตำแหน่ง เสริฟให้กับผู้ชิมครั้งละ 3 ตัวอย่าง ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) ผู้ชิมจะชิมในห้องชิมอย่างเป็นอิสระต่อกันแล้วให้คะแนนในแบบประเมินคุณภาพ ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ เปรียบเทียบกับตัวอย่างผลิตภัณฑ์ชาที่ได้จากท้องตลาด สายพันธุ์อู่หลงเบอร์ 12

3.4 วิธีการวิเคราะห์

3.4.1 การเตรียมตัวอย่าง

นำชาที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส มาทิ้งไว้ให้ละลายที่อุณหภูมิห้อง แล้วบดด้วยเครื่องบดตัวอย่าง (Philips, HR1721, China) ที่ความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 30 วินาที แล้วเก็บไว้ในถุงซิปที่แห้งขนาด 6×9 นิ้ว เพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป

3.4.2 การเตรียมสารสกัดจากชา

ชั่งตัวอย่างชาสดและชาแห้งที่บดละเอียด อย่างละ 1 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ลงไป 100 มิลลิลิตร แล้วกวนผสมบนเตาให้ความร้อนพร้อมแผ่นกวนแม่เหล็ก (IKA, RTCB, Malaysia) ที่ปรับระดับความร้อนให้คง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4.3 การวิเคราะห์ total polyphenol

นำสารสกัดจากชาทำปฏิกิริยากับ Folin-Ciocalteu reagent ซึ่งประกอบด้วย phosphomolybdic-tungstic acid reagents ซึ่งเป็นตัวออกซิไดซ์หมู่ฟีนอลิคไฮดรอกซิลของสารประกอบฟีนอลิคในสารสกัดจากชา เกิดเป็น tungsten และ molybdenum blue ซึ่งเป็นสารประกอบสีน้ำเงินและสามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุด 760 นาโนเมตร แล้วหาปริมาณรวมสารประกอบฟีนอลิคโดยเปรียบเทียบกับปริมาณของ gallic acid มีวิธีการ ดังนี้

เตรียม stock solution โดยชั่ง gallic acid 100 มิลลิกรัม ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นของ gallic acid 1000 ส่วนในล้านส่วน(ppm) แล้วเตรียม gallic acid working standard solution 7 ความเข้มข้น คือ 10, 25, 50, 100, 150, 200 และ 250 ppm

ปิเปตสารสกัดจากชา จากข้อ 3.4.1 น้ำกลั่น (blank) และ gallic acid working standard solution ความเข้มข้น 10, 25, 50, 100, 150, 200 และ 250 ppm ใส่หลอดทดลอง 0.125 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตร Folin-Ciocalteu reagent 0.125 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 6 นาที เติมโซเดียมคาร์บอเนต 7 เปอร์เซ็นต์ (w/v) 1.25 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 3 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น กวนผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม (vortex mixer) (Velp Scientifica, Italy) ตั้งทิ้งไว้ 90 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (PerkinElmer Lamda 35, USA) หาปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิค โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน gallic acid (รูป ข.1 ในภาคผนวก) และรายงานผลเป็น เปอร์เซนต์โดยน้ำหนักแห้งของชา (Sakanaka *et al.*, 2005)

3.4.4 การวิเคราะห์ total catechins

เตรียม stock solution โดยชั่ง (-)-catechin 50 มิลลิกรัม ปรับปริมาตรให้ครบ 50 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นของ (-)-catechin 1000 ppm แล้วเตรียม gallic acid working standard solution 8 ความเข้มข้น คือ 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 ppm

ปิเปตสารสกัดจากชา จากข้อ 3.4.1 น้ำกลั่น (blank) และ catechin working standard solution เข้มข้น 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 ppm ใส่หลอดทดลองปริมาณ 0.25 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 1.25 มิลลิลิตร โซเดียมไนไตรท์ 5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) 0.075 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(Sakanaka *et al.*, 2005)

3.4.5 การวิเคราะห์ EGCG

วิเคราะห์ปริมาณ EGCG ด้วยเครื่อง HPLC (Water, 2695 separation module, USA) ประกอบด้วย photodiode array detertor รุ่น 2996 และ autiosampler ใช้คอลัมน์ ซึ่งภายในเป็น reversed-phase material ชนิด Platinum EPS C18 100A Rocket (53 × 7 มิลลิเมตร, 3 ไมโครเมตร) (Alltech, USA) และ guard column Platinum EPS C18 100A (7.5 × 4.6 มิลลิเมตร, 5 ไมโครเมตร) (Alltech, USA)

เตรียม stock solution โดยชั่ง (-)-epigallocatechin gallate 1 มิลลิกรัม ปรับปริมาตรให้ครบ 10 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นของ (-)-epigallocatechin gallate 1000 ppm แล้วเตรียม (-)-epigallocatechin gallate working standard solution 8 ความเข้มข้นคือ 1, 5, 10, 20, 40, 60, 40, 80 และ 100 ppm

นำตัวอย่างสารสกัดจากชา จากข้อ 3.4.1 ไปกรองด้วย syringe filter membrane ชนิด cellulose acetate ขนาด 0.45 ไมโครเมตร (Whatman, England) ลงใน vial ขนาด 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC โดยใช้สภาวะดังนี้ (ศิริพัชร์, 2548)

Mobile phases	Eluent A: Eluent B (87:13) (Eluent A: 0.05 เปอร์เซ็นต์ (v/v) Trifluoro acetic acid (TFA) ที่มี EDTA (1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) อยู่ 2 มิลลิลิตร/ลิตร และ Eluent B: Acetonitrile)
Flow rate	2 มิลลิลิตร/ นาที
Column temperature	30 องศาเซลเซียส
Detection wavelength	210 นาโนเมตร
Injection volume	10 ไมโครลิตร
Run time	13 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

คำนวณค่าความเข้มข้นของ EGCG โดยใช้โปรแกรม Millinium[32] 4.00 (Waters corporation, 2001) เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (-)-epigallocatechin gallate (รูป ข.3 ในภาคผนวก) และรายงานผลเป็นเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้งของชา

3.4.6 การหาเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง

นำใบชาที่บดละเอียดจากข้อ 3.4.1 มาหาความชื้นดัดแปลงจากวิธีของ ISO (1975) โดยชั่งตัวอย่างชา 2 กรัม ในถ้วยอลูมิเนียมที่อบจนน้ำหนักคงที่และชั่งน้ำหนักแล้ว จดน้ำหนักที่แน่นอน จากนั้นนำไปอบที่ตู้อบลมร้อน (Contherm, Thermotech 2000, New Zealand) ที่อุณหภูมิ 103±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นใน dessiccator แล้วชั่งน้ำหนัก นำไปอบซ้ำอีกครั้งเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นใน dessiccator แล้วชั่งน้ำหนัก จนได้น้ำหนักคงที่ ต่างกันไม่เกิน 0.005 กรัม แล้วคำนวณเปอร์เซ็นต์ความชื้น นำข้อมูลที่ได้ไปหาเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง โดยนำผลการวิเคราะห์ปริมาณ total polyphenol, total catechins และ EGCG มารายงานเป็นเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง โดยคำนวณจาก สมการ 3.1

$$\text{เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง} = \frac{\text{เปอร์เซนต์น้ำหนักเปียก}}{(1 - (\text{เปอร์เซนต์ความชื้น}/100))} \quad \ldots\ldots\ldots (3.1)$$

3.5 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วิเคราะห์คุณภาพของใบชาทางเคมีทั้งหมด 3 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS 13.0 ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) แล้วรายงานผลเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน การวิเคราะห์ปริมาณ total polyphenol, total catechins และ EGCG ในใบชาที่ได้จากกระบวนการผลิต ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design, CRD) สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณ total polyphenol, total catechins และ EGCG ในยอดและใบชา ที่ได้จากไร่ชา 3 ไร่ และการวิเคราะห์คุณภาพทางประสาทสัมผัสใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ภายในบลอค (Randomized Complete Block Design, RCBD) และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของอุณหภูมิและเวลาในการอบแห้งที่มีต่อ polyphenol, total catechins และ EGCG ใช้การทดลองแบบ 3 ×4 แฟคทอเรียลที่ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Factorial Experiments in CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบเป็นคู่ (multiple comparisons) โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p \leq 0.05$) เพื่อวิเคราะห์ความแตกต่างแต่ละทรีตเมนต์สำหรับทุกการวิเคราะห์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved