b. 114444

สัญญาเลขที่ 004/ พ.ศ 2553

รหัสโครงการวิจัย 5310501004

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาชุดทดสอบโพลิฟีนอลทั้งหมดในชาเพื่อการค้า

Development of Test Kit for Total Polyphenols in Teas for Commercialization

โดย

ดร. ธีรพงษ์ เทพกรณ์ สำนักวิชาอุตสาหกรรมเกษตร

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

ประจำปี พ.ศ. 2553

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีด้วยความสนับสนุน ร่วมมือ และช่วยเหลือจากบุคคล และหน่วยงานต่าง ๆ หลายหน่วยงานดังนี้

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวงที่ได้ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยตลอดทั้งโครงการ ขอขอบคุณสถาบันชา มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง ที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์ทางวิทยาศาสตร์ต่าง ๆ

ขอขอบคุณเพื่อนพนักงานนักวิทยาศาสตร์ และผู้เกี่ยวข้องทุกท่านที่มิได้กล่าวนามในที่นี้ซึ่งมีส่วนช่วยให้งานวิจัยนี้สำเร็จและลุล่วงไปได้ด้วยดี

ธีรพงษ์ เทพกรณ์

กันยายน 2553

บทสรุปผู้บริหาร

โครงการวิจัย การพัฒนาชุดทดสอบโพลิฟีนอลทั้งหมดในชาเพื่อการค้า เป็นโครงการที่พัฒนาต่อยอดจากโครงการวิจัยชุดทดสอบโพลิฟีนอลทั้งหมดในชา โดยมีวัตถุประสงค์ในการพัฒนาแถบสีมาตรฐานพร้อมกับตรวจสอบความใช้ได้ของแถบสีมาตรฐาน ออกแบบบรรจุภัณฑ์ จัดทำชุดทดสอบต้นแบบ และวิเคราะห์ต้นทุนของชุดทดสอบ ผลที่ได้จากโครงการวิจัยนี้คือ ได้แถบสีมาตรฐานที่สามารถตรวจวัดปริมาณโพลิฟีนอลทั้งหมดในชาได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ และได้ชุดทดสอบโพลิฟีนอลทั้งหมดต้นแบบ ที่สามารถนำไปผลิตได้จริงในเชิงพาณิชย์

บทสรุปผู้บริหารของโครงการวิจัยเดิม

(โครงการวิจัย ชุดทดสอบโพลิฟีนอลทั้งหมดในชา)

งานวิจัยของนักวิทยาศาสตร์ทั่วโลกหลายชิ้นชี้ให้เห็นถึงคุณประโยชน์ของโพลิฟีนอลในชา ทำให้ผู้บริโภคในปัจจุบันหันมาใส่ใจสุขภาพโดยการบริโภคชามากยิ่งขึ้น เนื่องจากปริมาณโพลิฟีนอลในชาเป็นสิ่งที่บ่งชี้ถึงปริมาณสารสำคัญที่ผู้บริโภคจะได้รับจาการดื่มชา ดังนั้น โครงการวิจัยนี้จึงได้คิดค้นเพื่อประดิษฐ์ชุดทดสอบหาปริมาณโพลีฟีนอลในชา โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อประดิษฐ์ชุดทดสอบอย่างง่าย ประหยัด รวดเร็ว ถูกต้อง และใช้น้ำยาเคมีที่สังเคราะห์ขึ้นเองโดยไม่ต้องนำเข้าน้ำยาเคมีจากต่างประเทศ และไม่ต้องใช้เครื่องมือวิทยาศาสตร์ชั้นสูงในการวิเคราะห์

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

ขั้นตอนการทดสอบแบ่งเป็น 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนการสกัดชา และขั้นตอนการวิเคราะห์ วิธีการทดสอบทำได้ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 การสกัดชา

1.1 บดใบชาแห้งด้วยครกบดจนละเอียด ใช้ช้อนตักชาใส่ในขวดสกัด

1.2 เติมน้ำเดือดลงขวดสกัดจนถึงขีดปริมาตร 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 มิลลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เขย่าให้เข้ากัน

2.4 หยดน้ำยาเคมี MFU2 จนถึงขีดที่ 2 เขย่าให้เข้ากัน

2.5 ตั้งทิ้งไว้ ประมาณ 10 นาที เทียบสีกับแถบสีมาตรฐาน

บทคัดย่อ

โครงการวิจัยนี้เป็นการพัฒนาชุดทดสอบโพลิฟีนอลทั้งหมดในชาเพื่อการค้า โดยมีจุดประสงค์ในการพัฒนาแถบสีมาตรฐานเพื่อใช้ตรวจวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลในชา โครงการวิจัยนี้ได้พัฒนาแถบสีมาตรฐาน และตรวจสอบความใช้ได้ของแถบสีมาตรฐานในการวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลในช่วงการทดสอบร้อยละ 0-25 โดยน้ำหนัก ปริมาณสารประกอบฟีนอลในชาวัดได้จากการเปรียบเทียบความเข้มของสีกับแถบสีมาตรฐาน ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของแถบสีมาตรฐานพบว่าแถบสีมาตรฐานที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้เทียบสีเพื่อหาปริมาณสารประกอบพีนอลในชาได้อย่างมีความถูกต้องและแม่นยำ งานวิจัยนี้ได้ทำการออกแบบชุดทดสอบและประเมินราคาต้นทุนการผลิตชุดทดสอบ ผลที่ได้จากโครงการวิจัยนี้คือชุดทดสอบต้นแบบสำหรับตรวจวัดปริมาณโพลิฟีนอลทั้งหมดในชาที่สามารถผลิตได้จริงในเชิงพาณิชย์

คำสำคัญ : ชุดทดสอบ ชา โพลิฟีนอลทั้งหมด

ABSTRACT

The research project was the development of a total polyphenols test kit in teas for commercialization. The present study focused on the development of a color strip that can be used to quantitatively determine the concentration of phenolic compounds in teas. A developed color strip was produced and validated to measure phenolic compounds in a range from 0-25%w/w in teas. The test is performed as the procedure of the invented test kit for total polyphenols in teas. The amount of polyphenols in teas was quantitatively determined by comparing the color intensity to the developed standard color strip. The results obtained from validation studies indicate a fairly precision and accuracy. The developed color strip can be used to approximately determine the content of phenolic compounds. Next, a test kit package was designed and the cost analysis was then evaluated. In a final work, a prototype test kit was invented providing a model test kit for producing in a commercial scale.

Keywords : Test kit, Teas, Total polyphenols

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	II
บทสรุปผู้บริหาร	III
บทสรุปผู้บริหารของโครงการวิจัยเดิม	IV
บทคัดย่อ	V
Abstract	VI
สารบัญ	VII
สารบัญภาพ	IX
สารบัญตาราง	X
คำย่อและสัญลักษณ์	XI
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญ และที่มาของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	3
1.4 ขอบเขตการศึกษา	3
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
1.6 ระยะเวลาดำเนินการ	3
1.7 คณะนักวิจัย	3
บทที่ 2 แนวคิด ทฤษฎี และวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 สารประกอบฟีนอล	4
2.2 พันธุ์ชา	6
2.3 ประเภทของชา	6
2.4 กระบวนการหมักชา	7
2.5 การวิเคราะห์โพลิฟีนอล	9
2.6 วิธี Folin-Ciocatleu Assay	9

หน้า

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 12

3.1 สารเคมี วัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือ 12

3.2 การดำเนินงานวิจัย 12

3.2.1 การพัฒนาแถบสีมาตรฐาน 12

3.2.2 การพัฒนาบรรจุภัณฑ์ และชุดทดสอบต้นแบบ 14

3.2.3 การวิเคราะห์ต้นทุน 14

บทที่ 4 ผลการวิจัย 15

4.1 การทำแถบสีมาตรฐานเพื่อบ่งชี้ปริมาณโพลิฟีนอลทั้งหมด 15

4.2 การทดสอบความใช้ได้ของแถบสีมาตรฐาน 17

4.2.1 การทดสอบกับสามาตรฐาน 17

4.2.2 การทดสอบกับตัวอย่างชา 19

4.2.3 การทดสอบ Spiked samples 20

4.2.4 การทดสอบความแม่นยำ 22

4.3 การออกแบบและพัฒนาบรรจุภัณฑ์ 25

4.4 การจัดทำชุดทดสอบต้นแบบ 28

4.5 การวิเคราะห์ต้นทุนของชุดทดสอบ 29

บทที่ 5 สรุปผลและข้อเสนอแนะ 31

5.1 สรุปผลการวิจัย 31

5.2 ข้อเสนอแนะการวิจัย 31

บรรณานุกรม 32

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2-1	โครงสร้างของคาเทชินในชา	5
2-2	การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักชา	8
2-3	Theaflavins ที่พบในชา	8
4-1	แถบสีมาตรฐานที่ได้จากวิธีการต่างๆ	16
4-2	แถบสีมาตรฐานที่ได้พัฒนาขึ้น	16
4-3	ภาพการทดสอบกับผู้ทดสอบ	17
4-4	ผลการทดสอบกับสารมาตรฐาน	18
4-5	ผลการทดสอบกับตัวอย่างชา	20
4-6	ผลการทดสอบกับ Spiked sample	22
4-7	ผลการทดสอบความแม่นยำ	24
4-8	กล่องชุดทดสอบ	25
4-9	กล่องชุดน้ำยาเคมี	25
4-10	คู่มือการใช้งาน	26
4-11	สติ๊กเกอร์อุปกรณ์ในชุดทดสอบ	27
4-12	ชุดทดสอบต้นแบบ	28

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
4-1	ผลการทดสอบความแม่นยำและถูกต้องเมื่อทดสอบกับสารมาตรฐาน	18
4-2	ผลการทดสอบความแม่นยำและถูกต้องเมื่อทดสอบกับตัวอย่างชา	19
4-3	ผลการทดสอบ spiked samples ในการอ่านผลจากแถบสีมาตรฐาน	21
4-4	ผลการทดสอบความแม่นยำของแถบสีมาตรฐานเมื่อทดสอบกับตัวอย่างชา	23
4-5	ต้นทุนของชุดทดสอบ	29
4-6	ต้นทุนของชุดน้ำยาเคมี	30

คำย่อและสัญลักษณ์

Abbreviation	Word
%w/w	Percent weight by weight
µg	Microgram
C	(+)-Catechin
CF	Caffeine
CG	(-)-Catechin gallate
db	Dry basis
EC	(-)-Epicatechin
ECG	(-)-Epicatechin-3-gallate
EGC	(-)-Epigallocatechin
EGCG	(-)-Epigallocatechin-3-gallate
G	Gallic acid
GC	(-)-Gallocatechin
GCG	(-)-Gallocatechin gallate
ml	Milliliter

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญ และที่มาของปัญหา

ชา เป็นพืชเศรษฐกิจชนิดหนึ่งที่ปลูกกันมากบนพื้นที่สูงในจังหวัดทางภาคเหนือของไทย ชาที่ปลูกเป็นชาพันธุ์อัสสัม *(Camellia sinensis* var. *assamica)* และชาจีน *(Camellia sinensis* var. *sinesis)* สารออกฤทธิ์สำคัญที่อยู่ในชาเรียกว่าโพลิฟีนอล โพลิฟีนอลมีคุณค่าทางอาหารและเป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ช่วยลดความเสี่ยงของการเกิดโรคมะเร็ง และโรคหัวใจ

ผลิตภัณฑ์ชาใบที่ขายในท้องตลาดโดยส่วนใหญ่เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะปลูก และการแปรรูปที่อาศัยความเชี่ยวชาญและประสบการณ์ของผู้ผลิตโดยเฉพาะ ทำให้คุณภาพของผลิตภัณฑ์ใบชามีความแตกต่างกันทั้งทางด้านเคมี จุลชีววิทยา และประสาทสัมผัส สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมได้ระบุมาตรฐานชาใบไว้เป็นมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมชาใบ (ชาจีน) มอก.460-2526 และมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมชาผง (ชาฝรั่ง) มอก.461-2526 นอกจากนี้รัฐบาลยังได้ปรับปรุงประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 196 พ.ศ. 2543) ว่าด้วยเรื่องของชา โดยกำหนดให้ชาเป็นอาหารที่ต้องกำหนดคุณภาพให้เป็นไปตามมาตรฐาน อนึ่งมาตรฐานของชาที่ได้กำหนดนี้เป็นเพียงมาตรฐานทางเคมีเบื้องต้น มิได้กำหนดมาตรฐานปริมาณโพลิฟีนอลซึ่งเป็นสารสำคัญในชาที่ผู้บริโภคต้องการจากการดื่มชา ในความเป็นจริงปริมาณโพลิฟีนอลในผลิตภัณฑ์ชาจะแตกต่างกันไปตามพันธุ์ชา พื้นที่ปลูก การดูแลรักษา การเก็บเกี่ยว และลักษณะการผลิตของผู้ผลิตแต่ละราย ดังนั้นปริมาณโพลิฟีนอลในชาเป็นสิ่งหนึ่งที่สามารถบอกถึงปริมาณสารสำคัญที่ผู้บริโภคจะได้รับจากการดื่มชา

ดังนั้น การประดิษฐ์คิดค้นชุดทดสอบหาปริมาณโพลีฟีนอลในชาจึงได้เกิดขึ้น ภายใต้การสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ในปี พ.ศ. 2552 โดยมีวัตถุประสงค์ในการประดิษฐ์ชุดทดสอบอย่างง่าย ประหยัด รวดเร็ว และให้ผลถูกต้อง ใช้น้ำยาทดสอบที่สังเคราะห์ขึ้นเองโดยไม่ต้องนำเข้าน้ำยาทดสอบจากต่างประเทศ ไม่ต้องใช้เครื่องมือวิทยาศาสตร์ชั้นสูงในการวิเคราะห์

ในโครงการวิจัยชุดทดสอบหาปริมาณโพลีฟีนอลในชา ได้ทำการสังเคราะห์น้ำยาเคมี Folin-Ciocalteu reagent (FC) ซึ่งเป็นน้ำยาที่ใช้วิเคราะห์หาปริมาณโพลิฟีนอลทั้งหมดในชา น้ำยาเคมี Folin-Ciocalteu reagent (FC) ที่สังเคราะห์ขึ้นนี้เรียกว่า FC-MFU โดย FC-MFU มีสมบัติเบื้องต้น ได้แก่ pH สี ความหนาแน่น และความเข้มข้นของกรดใกล้เคียงกับ Folin-Ciocalteu reagent (FC) ที่ผลิตจากต่างประเทศ

ราคาต้นทุนสารเคมีในการสังเคราะห์ 873 บาทต่อ 500 ml เมื่อเปรียบเทียบความใช้ได้ของน้ำยาเคมี FC-MFU พบว่าสามารถใช้วิเคราะห์หาโพลิฟีนอลทั้งหมดได้ไม่แตกต่างไปจากน้ำยาเคมี FC ที่ซื้อจากต่างประเทศ น้ำยาเคมี FC-MFU มีความคงตัวอย่างน้อย 12 เดือนเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องปกติ

การศึกษาผลของวิธีการสกัดเพื่อหาวิธีการสกัดที่เหมาะสมสำหรับชุดทดสอบ พบว่า การสกัดส่งผลต่อปริมาณโพลิฟีนอลทั้งหมดในชา ในงานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายที่จะวิเคราะห์โพลิฟีนอลทั้งหมดในชาที่ได้จากการชงดื่มชาจริง และต้องการเลือกวิธีสกัดที่ง่าย สะดวก รวดเร็ว ตลอดจนไม่สิ้นเปลืองอุปกรณ์ในการสกัดมากจนเกินไป จากการทดสอบได้วิธีการสกัดที่เหมาะสมของชุดทดสอบคือ สกัดชาผง 0.2 กรัม (1 ช้อน) ด้วยน้ำเดือดปริมาตร 20 ml ทำการสกัดโดยเขย่าในขวดสกัด จากนั้นเจือจาง 50 เท่าโดยดูดสารละลาย 2 ml จากขวดสกัดใส่ลงในขวดเจือจาง ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 ml

วิธีการวิเคราะห์ที่เหมาะสมของชุดทดสอบที่ได้ประดิษฐ์ขึ้นในโครงการวิจัยนี้ เริ่มจากหยดน้ำยาเคมี FC-MFU จำนวน 3 หยดในหลอดทดลอง ตามด้วยน้ำยาเคมี MFU1 ปริมาตร 1 ml เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นเติมน้ำชาเจือจาง 0.5 ml เขย่าให้เข้ากัน เติมน้ำยาเคมี MFU2 ปริมาตร 1 ml เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที เปรียบเทียบความเข้มของสีกับแถบสีมาตรฐาน

จากการประดิษฐ์ชุดทดสอบอย่างง่ายเพื่อหาปริมาณโพลิฟีนอลทั้งหมดพบว่าได้ชุดทดสอบที่สะดวก รวดเร็ว ง่าย ไม่ต้องใช้อุปกรณ์ที่ซับซ้อน ช่วงของการทดสอบอยู่ที่ 2.5-25.0%โดยน้ำหนัก ระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ 2.5%โดยน้ำหนัก ชุดทดสอบมีอายุอย่างน้อย 12 เดือน เมื่อเก็บที่อุณหภูมิห้อง

ชุดทดสอบที่ได้ประดิษฐ์ขึ้น มีความจำเป็นที่ต้องพัฒนาต่อยอดจากชุดทดสอบที่ได้ออกแบบไว้ โดยมีประเด็นที่จำเป็นต้องพัฒนา 3 ประเด็น ดังนี้

1. การพัฒนาแถบสีมาตรฐาน
2. การพัฒนาบรรจุภัณฑ์ และจัดทำชุดทดสอบต้นแบบ
3. การวิเคราะห์ต้นทุน

1.2 วัตถุประสงค์

1. พัฒนาแถบสีให้สามารถบ่งชี้ปริมาณโพลิฟีนอลทั้งหมดให้แม่นยำยิ่งขึ้น
2. พัฒนาบรรจุภัณฑ์ให้สามารถผลิตได้จริงในเชิงพาณิชย์

1.3 กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

การเพิ่มคุณภาพและประสิทธิภาพของชุดทดสอบโพลิฟีนอลทั้งหมดในชาโดยการพัฒนาระดับความเข้มของแถบสีให้ใกล้เคียงกับสีที่เกิดจากปฏิกิริยาเคมี การออกแบบบรรจุภัณฑ์ และดำเนินการผลิตในเชิงพาณิชย์ จะทำให้ชุดทดสอบโพลิฟีนอลทั้งหมดในชามีคุณภาพและประสิทธิภาพมากขึ้น

1.4 ขอบเขตการศึกษา

1. พัฒนาแถบสีให้มีสีที่ใกล้เคียงกับสีของสามาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ
2. พัฒนาบรรจุภัณฑ์ทั้งภายในและภายนอกชุดทดสอบ
3. วิเคราะห์ต้นทุนการผลิตในเชิงการค้า

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้แถบสีมาตฐานที่มีคุณภาพและประสิทธิภาพที่ดียิ่งขึ้น
2. ได้บรรจุภัณฑ์ที่เหมาะสมกับชุดทดสอบ
3. ได้ชุดทดสอบโพลิฟีนอลทั้งหมดในชาต้นแบบ ที่สามารถผลิตขายได้ในเชิงพาณิชย์

1.6 ระยะเวลาดำเนินการ

1 ตุลาคม 2552 – 30 กันยายน 2553

1.7 คณะนักวิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

อ. ดร. ธีรพงษ์ เทพกรณ์

สังกัด สำนักวิชาอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

333 หมู่ 1 ต. ท่าสุด อ. เมือง จ. เชียงราย 57100

โทรศัพท์ 053-916750 โทรสาร 053-916739

บทที่ 2

แนวคิด ทฤษฎี และวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

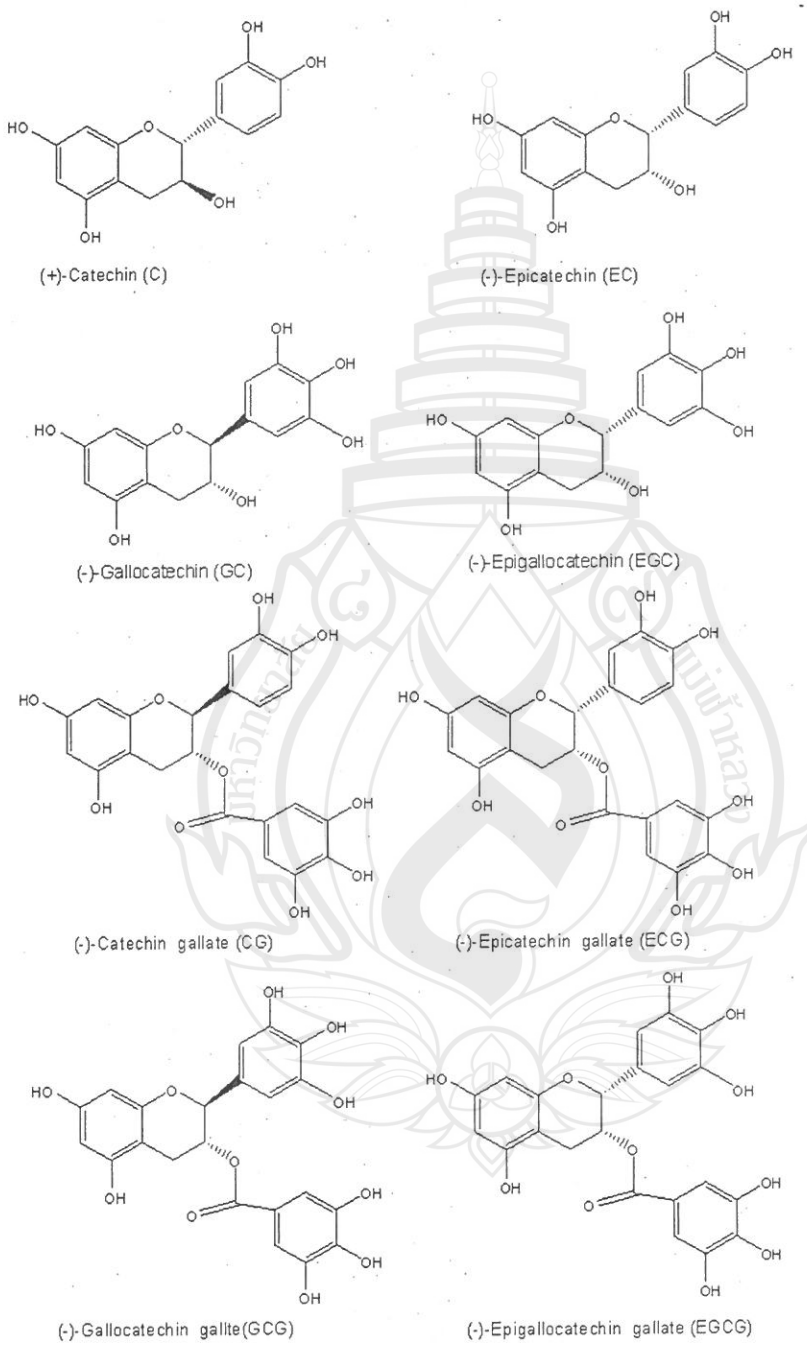
ชา เป็นผลิตภัณฑ์ที่นิยมบริโภคกันทั่วโลกซึ่งผลิตจากยอดอ่อนของต้นชา ชาแบ่งได้เป็น 3 ชนิดใหญ่ ๆ ตามกระบวนการผลิตได้แก่ ชาเขียว ชาอู่หลง และชาดำ ปัจจุบันผู้บริโภคให้ความสนใจและนิยมบริโภคชาเพิ่มขึ้น เนื่องจากมีรายงานหลายชิ้นที่แสดงถึงคุณประโยชน์ของการดื่มชา ในชามีสารสำคัญที่มีสมบัติที่ดีต่อสุขภาพได้แก่ สมบัติการต้านออกซิเดชัน ต้านอนุมูลอิสระ ป้องกันโรคมะเร็ง ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง ลดความเสี่ยงต่อกาเป็นโรคหัวใจ ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

2.1 สารประกอบฟีนอล

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

ในยอดใบชาจะพบประกอบสารประกอบฟีนอลเช่นเดียวกับที่พบในผักและผลไม้ ปริมาณโพลิฟีนอล (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% ของปริมาณโพลิฟีนอลทั้งหมดในชา 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 แสดงดังภาพที่ 2-1 คาเทชินที่มีอยู่ในชานี้มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นประโยชน์สำคัญของชา นอกจากนี้ยังมี

ประโยชน์ต่อสุขภาพอีกมากได้แก่ เป็นสารช่วยลดความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งในอวัยวะต่าง ๆ ยับยั้งการขยายตัวของเซลล์มะเร็ง และช่วยควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด



ภาพที่ 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 แผ่นใบโป่นเป็นคลื่น ขอบใบหยักแบบฟันเลื่อย ปลายใบแหลม ใบแผ่ การเรียงตัวของใบเป็นแบบสลับและเกลียว ต้นเจริญเติบโตเร็ว ทนแล้ง ปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี

2. กลุ่มชาพันธุ์จีน (Chinese Tea)

   กลุ่มนี้มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Camellia sinensis* var. *sinensis* ลักษณะลำต้นเป็นพุ่มเตี้ย สูงประมาณ 2-6 เมตร ใบมีสีเขียวเข้ม ขนาดเล็ก ยาวแคบ ตั้งตรง ขอบใบหยักแบบฟันเลื่อย ผิวใบเรียบ ใบค่อนข้างตั้งกว่าชาอัสสัม การเรียงตัวของใบเป็นแบบสลับและเกลียว ต้นเจริญเติบโตช้ากว่าชาอัสสัม ทนทานต่ออุณหภูมิต่ำและสภาพแวดล้อมที่แปรปรวนได้ดี

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) เพื่อทำให้เซลล์แตกและนวดเพื่อให้ใบชาม้วนตัว จากนั้นนำไปอบแห้ง สีของน้ำชาประเภทนี้จะมีสีเขียวถึงเขียวอมเหลือง

2. ชาอู่หลง (Oolong tea)

   เป็นชาที่ผ่านกระบวนการหมักเพียงบางส่วน (Semi-fermented tea) ก่อนหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ด้วยความร้อน กรรมวิธีการผลิตจะมีการผึ่งแดด (withering) ประมาณ 20-40 นาที ภายหลังผึ่งแดดใบชาจะถูกผึ่งในร่มอีกครั้งพร้อมเขย่ากระตุ้นให้ชาตื่นตัว การผึ่งนี้เป็นกระบวนการหมักซึ่งทำให้เอนไซม์ polyphenol oxidase เร่งปฏิกิริยา oxidation และ polymerization ของ polyphenols ทำให้

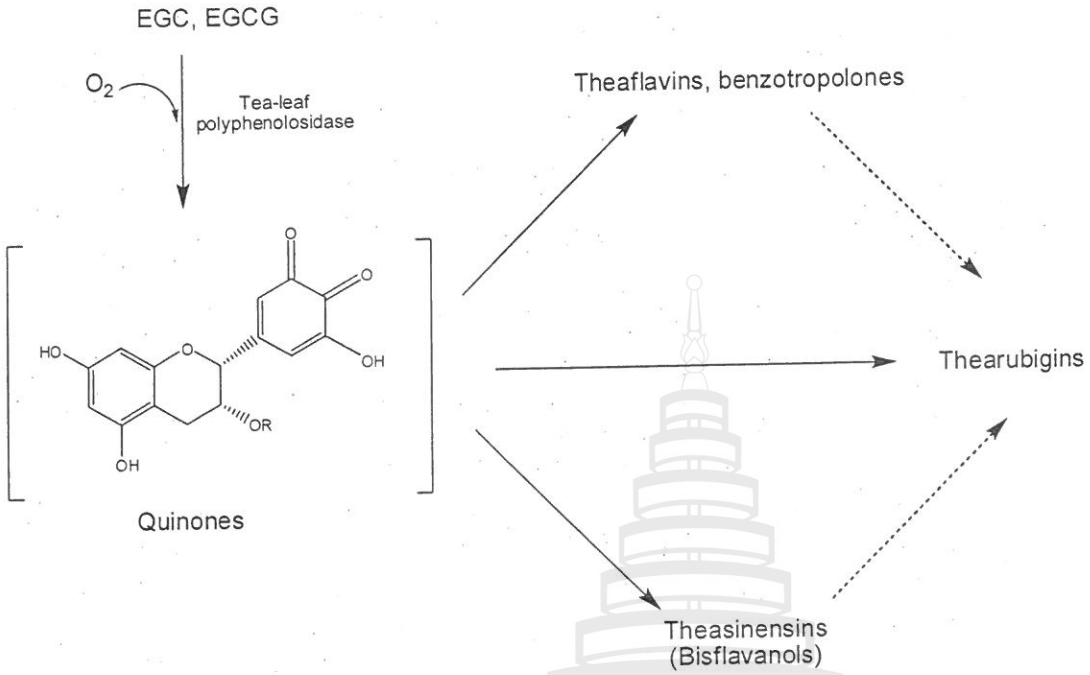
เกิด dimers และสารประกอบเชิงซ้อนของ polyphenols สารประกอบที่เกิดขึ้นนี้ทำให้ชาอู่หลงมีกลิ่นและสีที่แตกต่างไปจากชาเขียว น้ำชาอู่หลงจะมีสีเหลืองอมเขียว และสีน้ำตาลอมเขียว

3. ชาดำ (Black tea)

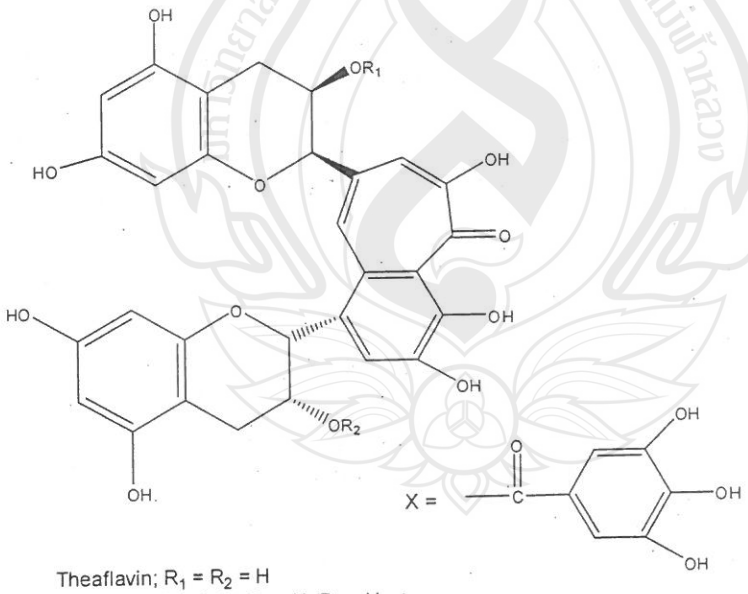
เป็นชาที่ผ่านกระบวนการหมักอย่างสมบรูณ์ (Completely-fermented tea) ใบชาจะถูกผึ่งให้เอนไซม์ polyphenol oxidase เร่งปฏิกิริยาอย่างเต็มที่ ซึ่ง polyphenols จะถูก oxidized อย่างสมบรูณ์ เกิดเป็นสารประกอบกลุ่ม Theaflavins และ Thearubigins ทำให้ชาดำมีสีน้ำตาลแดง

2.4 กระบวนการหมักชา

ในการผลิตชาอู่หลงและชาดำเอนไซม์ polyphenol oxidase (PPO) จะเร่งปฏิกิริยา oxidation และ polymerization ของ catechins ให้เปลี่ยนเป็นสารโพลิฟีนอลที่ใหญ่ขึ้น (ภาพที่ 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 กลุ่มของโพลิฟีนอลในชาหมักที่พบมากคือ Theaflavins และ Thearubigins โดยชาที่ผ่านการหมักอย่างสมบรูณ์ จะพบ Thearubigins มาก ปัจจุบันพบว่า Theaflavins ที่พบในชามี 4 ชนิด (ภาพที่ 2-3) ส่วน Thearubigins เป็นสารที่มีโครงสร้างซับซ้อน ยังไม่สามารถ identify ได้



ภาพที่ 2-2 การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักชา



Theaflavin; $R_1 = R_2 = H$
Theaflavin-3-gallate; $R_1 = X$, $R_2 = H$
Theaflavin-3′-gallate; $R_1 = H$, $R_2 = X$
Theaflavin-3,3′-digallate; $R_1 = R_2 = X$

ภาพที่ 2-3 Theaflavins ที่พบในชา

2.5 การวิเคราะห์โพลิฟีนอล

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีอลในพืชโดยส่วนใหญ่ใช้เทคนิคทางสเปกโตรโฟโตเมตรี ซึ่งสามารถทำได้หลายวิธี โดยแต่ละวิธีจะมีหลักการวิเคราะห์ที่แตกต่างกันไป ในปัจจุบันการวิเคราะห์สารประกอบฟีอลได้ถูกพัฒนาและปรับปรุงให้มีประสิทธิภาพมากขึ้นมาอย่างต่อเนื่อง (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 สามารถแบ่งเป็นการวิเคราะห์กลุ่มโพลิฟีนอลทั้งหมด (Total phenolic compounds) (Earp et al., 1981; Price and Butler, 1977; Swain and Hillis, 1959) และวิเคราะห์ฟีนอลจำเพาะ (Specific phenolic compound) (Tzagoloff, 1963; Naczk et al., 1992; Brune et al., 1991; Mole and Waterman, 1987a, b; Naczk and Shahidi, 1989; Price et al.,1978) วิธีวิเคราะห์ทั้งหลายนี้มีข้อดี ข้อเสีย และข้อจำกัดที่แตกต่างกันไป อย่างไรก็ตาม วิธีที่ง่าย ให้ผลค่อนข้างแม่นยำ และเป็นวิธีใช้กันมากในการวิเคราะห์คือ วิธี Folin-Ciocalteu method

2.6 วิธี Folin-Ciocatleu Assay

แรกเริ่มการวิเคราะห์โพลิฟีนอลได้ถูกเสนอโดย Folin และ Denis เรียกว่า Folin-Dennis assay ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้หาปริมาณโพลิฟีนอลทั้งหมดโดยใช้สาร 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 senstitivity และ reproducibility ที่สูงกว่า ดังนั้นวิธีที่นิยมใช้กันมากในปัจจุบันคือ Folin-Ciocalteu assay

2.6.1 การสังเคราะห์ Folin-Ciocalteu reagent (FC)

Folin-Ciocalteu reagent สามารถสังเคราะห์ได้โดยละลาย 100 กรัม sodium tungstate ($Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$) 25 กรัม sodium molybdate ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$) ในน้ำกลั่นประมาณ 700 ml เติมกรดไฮโดรคลอลิคเข้มข้น 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)

$3H_2O \cdot P_2O_5 \cdot 13WO_3 \cdot 5MoO_3 \cdot 10H_2O$

$3H_2O\ xP_2O_5 \cdot 14WO_3 \cdot 4MoO_3 \cdot 10H_2O$

2.6.2 เคมีของปฏิกิริยาการวิเคราะห์

สารประกอบฟีนอลเมื่อยู่ในสภาวะพีเอชประมาณ 10 จะเกิดเป็น phenolate ion เมื่ออิเล็กตรอนใน phenolate ion ถูกสูญเสีย หรือถูกดึงออกไป จะได้ semiquinone free radical หากมีการสูญเสียอิเล็กตรอนที่สองจาก ortho หรือ para-diphenol จะทำให้เกิดเป็น quinone ซึ่งสารผลมของ phenol และ quinone จะอยู่สมดุลกันโดยมี 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 เกิดการฟอร์มพันธะโควาเลนซ์ได้เป็นสารใหม่

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 ในปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในการวิเคราะห์โพลิฟีนอลทั้งหมด tungstate และ molybdate จะเป็นตัวรับอิเล็กตรอนจาก semiquinone free radical ในสภาวะด่าง โดย tungstate forms เป็นตัวรับอิเลกตรอนได้น้อยกว่า molybdate forms ซึ่ง tunstate forms จะมีความจำเพาะต่อการถ่ายโอนอิเล็กตอน1ตัว (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 จะได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารประกอบเชิงซ็อนสีน้ำเงิน โครงสร้างของสารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงินนี้ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด

ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการรับอิเล็กตรอนของ tungstate และ molybdate จะมีมีค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุดแตกต่างกัน โดย phosphotungstate product จะมีค่า λmax ที่ความยาวคลื่นสั้นกว่า และมี molar absorptivities ที่ต่ำกว่า phosphomolybdate blue product เนื่องจาก phosphomolybdate blue product ประกอบด้วยสารเชิงซ้อนหลายชนิดทำให้ค่าการดูดกลืนแสงของ phosphomolybdate blue product ค่อนข้างกว้างในช่วง 750-770 nm แม้ว่าสารเชิงซ้อนสีน้ำเงินจะดูดกลืนแสงในช่วงที่กว้าง แต่ใน

ธรรมชาติมักไม่พบสารประกอบที่ดูดกลืนแสงในช่วงนี้ ดังนั้นการวิเคราะห์สามารถทำได้โดยกาตรวจวัดที่ความยาวคลื่นในช่วง 750-770 nm

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 วัตถุดิบ สารเคมี และเครื่องมือ

3.1.1 ชา

ตัวอย่างชาที่ใช้เป็นตัวอย่างชาแห้งชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ชาเขียว ชาอู่หลง ชาดำ ชาแต่งกลิ่น และชาผงปรุงสำเร็จ

3.1.2 สารเคมี

ชื่อ	สูตรโมเลกุล	มวลโมเลกุล	เกรด	บริษัท
Bromine	Br_2	159.82	Analysis	Carlo Erba
Folin-Ciocatteu's phenol reagent	-	-	Analysis	Carlo Erba
Gallic acid	$C_7H_6O_5$	107.12	Analysis	Sigma
Hydrochloric acid 37%	HCl	36.46	Analysis	Carlo Erba
Lithium sulfate	$LiSO_4 \bullet 2H_2O$	127.95	Analysis	Carlo Erba
ortho-Phosphoric acid 85%	H_3PO_4	97.99	Analysis	Carlo Erba
Sodium carbonate	Na_2CO_3	105.99	Analysis	Merck
Sodium molybdate	$Na_2MoO_4 \bullet 2H_2O$	241.95	Analysis	Carlo Erba
Sodium tungstate	$Na_2WO_4 \bullet 2H_2O$	329.86	Analysis	Carlo Erba

3.1.3 เครื่องมือ

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

3.2 การดำเนินงานวิจัย

3.2.1 การพัฒนาแถบสีมาตรฐาน

1. การทำแถบสีมาตรฐานบ่งชี้ปริมาณโพลิฟีนอลทั้งหมด

เตรียมสารมาตรฐานกรดแกลลิคเข้มข้น 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 และ 50 µg/ml นำมาหาปริมาณโพลิฟีนอลทั้งหมดตามวิธีวิเคราะห์ของชุดทดสอบ ถ่ายรูปสีที่เกิดขึ้น นำเข้า

โปรแกรมคอมพิวเตอร์ หาค่าสีในระบบ CMYK ของแต่ระดับความเข้มข้น นำไปพิมพ์กับโรงพิมพ์ที่สามารถระบุค่าสีให้ตรงกับค่า CMYK ที่ได้จากโปรแกรมคอมพิวเตอร์จะได้แถบสีที่ใช้บ่งชี้ปริมาณโพลิฟีนอลทั้งหมดที่แสดงปริมาณในหน่วยร้อยละโดยน้ำหนักและมิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร

2. การทดสอบความใช้ได้ของแถบสีมาตรฐาน

ทดสอบความแม่นยำ (Precision) และความถูกต้อง (Accuracy) ของแถบสีมาตรฐาน โดยนำไปทดสอบกับสารมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน และทดสอบกับตัวอย่างชา ดังนี้

2.1 การทดสอบความแม่นยำ

1) เตรียมสารมาตรฐานกรดแกลลิคเข้มข้น 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 และ 50 µg/ml อย่างละ 7 ซ้ำ นำไปวิเคราะห์โดยวิธีของชุดทดสอบ อ่านค่าโดยเทียบกับแถบสีมาตรฐาน
2) เตรียมตัวอย่างชาจำนวน 5 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 7 ซ้ำ สกัด และนำไปวิเคราะห์โดยวิธีของชุดทดสอบ อ่านค่าโดยเทียบกับแถบสีมาตรฐาน

2.2 การทดสอบความถูกต้อง

1) เตรียมสารมาตรฐานกรดแกลลิคเข้มข้น 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 และ 50 µg/ml อย่างละ 7 ซ้ำ นำไปวิเคราะห์โดยวิธีของชุดทดสอบ อ่านค่าโดยเทียบกับแถบสีมาตรฐาน
2) เตรียมตัวอย่างชาจำนวน 5 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 7 ซ้ำ สกัดและนำไปวิเคราะห์โดยวิธีของชุดทดสอบ อ่านค่าโดยเทียบกับแถบสีมาตรฐาน
3) ทำการเติมสารมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนลงในตัวอย่างชาสกัด และนำไปวิเคราะห์โดยวิธีของชุดทดสอบ อ่านค่าโดยเทียบกับแถบสี

2.3 การทดสอบความคลาดเคลื่อนจากการอ่านผลโดยผู้ทดสอบ

เตรียมตัวอย่างชาสกัดและสารมาตรฐานกรดแกลลิคที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน นำไปวิเคราะห์โดยวิธีของชุดทดสอบ อ่านค่าปริมาณโพลิฟีนอลทั้งหมดโดยเทียบกับแถบสีมาตรฐานโดยใช้ผู้ทดสอบจำนวน 14 คน เปรียบเทียบผลที่ผู้ทดสอบอ่านได้

3.2.2 การพัฒนาบรรจุภัณฑ์ และชุดทดสอบต้นแบบ

ออกแบบบรรจุภัณฑ์ที่เหมาะสมสำหรับชุดทดสอบทั้งภายในกล่อง และภายนอกกล่อง จัดทำชุดทดสอบต้นแบบโดยโรงงานขึ้นรูปกล่อง

3.2.3 การวิเคราะห์ต้นทุน

ทำการวิเคราะห์ต้นทุนการผลิตชุดทดสอบ

บทที่ 4
ผลการวิจัย

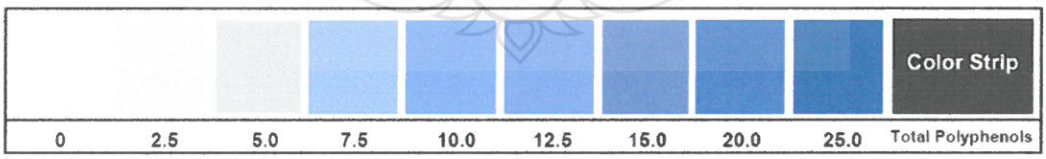
4.1 การทำแถบสีมาตรฐานเพื่อบ่งชี้ปริมาณโพลิฟีนอลทั้งหมด

จัดทำแถบสีมาตรฐานโดยวิธีการต่าง ๆ กัน 4 วิธี ดังนี้

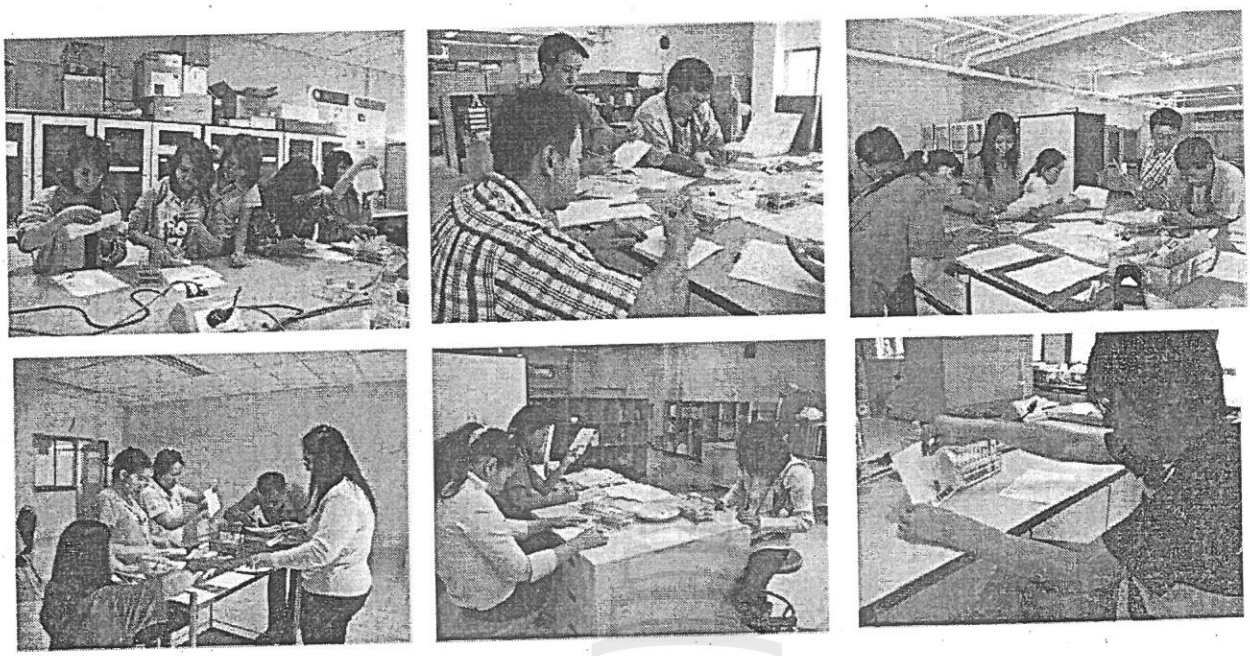
1) ถ่ายรูปสีที่เกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยา อ่านค่าสีในระบบ CMYK จากเครื่องคอมพิวเตอร์ นำไปพิมพ์กับโรงพิมพ์ในจังหวัดเชียงราย 3 โรงพิมพ์ นำมาเทียบกับสีที่เกิดขึ้นจริงจากการทำปฏิกิริยาเคมี
2) ใช้ Munsell color book เทียบสีโดยใช้สายตาผู้ทดสอบจำนวน 5 คน จากนั้นนำไปเทียบกับสีในระบบ CMYK อ่านค่าสีในระบบ CMYK นำไปพิมพ์กับโรงพิมพ์ในจังหวัดเชียงราย 3 โรงพิมพ์ นำมาเทียบกับสีที่เกิดขึ้นจริงจากการทำปฏิกิริยาเคมี
3) ใช้ Color book chart เทียบสีในระบบ CMYK โดยใช้สายตาผู้ทดสอบจำนวน 5 คน อ่านค่าสีในระบบ CMYK นำไปพิมพ์กับโรงพิมพ์ในจังหวัดเชียงราย 3 โรงพิมพ์ นำมาเทียบกับสีที่เกิดขึ้นจริงจากการทำปฏิกิริยาเคมี
4) ใช้ Color book chart เทียบสีในระบบ CMYK โดยใช้สายตาผู้ทดสอบจำนวน 5 คน อ่านค่าสีในระบบ CMYK นำไปพิมพ์ที่ร้านอัดรูปสีในระบบ RGB นำมาเทียบกับสีที่เกิดขึ้นจริงจากการทำปฏิกิริยาเคมี

จากการใช้วิธีการต่าง ๆ (ภาพที่ 4-1) พบว่าแถบสีที่ทำโดยวิธีที่ 4 ให้เฉดสีที่ใกล้เคียงกับสีที่เกิดขึ้นจริงจากปฏิกิริยามากที่สุด ดังนั้นจึงได้พัฒนาแถบสีจากวิธีที่ 4 ให้มีเฉดสีที่ใกล้เคียงมากยิ่งขึ้นโดยทำแถบสีมาตรฐานให้มีความเข้มในระดับต่าง ๆ และให้ผู้ทดสอบ 15 คนเลือกเฉดสีที่ใกล้เคียงกับสีจริงที่เกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยาเคมีมากที่สุด เมื่อได้ระดับสีที่มีความเข้มของสีใกล้เคียงกับสีจริงที่เกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยาเคมีแล้วจึงนำไปอัดที่ร้านถ่ายรูป ได้แถบสีมาตรฐานที่ได้พัฒนาขึ้น (ภาพที่ 4-2) และนำมาใช้เพื่อตรวจสอบความใช้ได้ของแถบสี

ภาพที่ 4-1 แถบสีมาตรฐานที่ได้จากวิธีการต่างๆ



ภาพที่ 4-2 แถบสีมาตรฐานที่ได้พัฒนาขึ้น



ภาพที่ 4-3 ภาพการทดสอบกับผู้ทดสอบ

4.2 การทดสอบความใช้ได้ของแถบสีมาตรฐาน

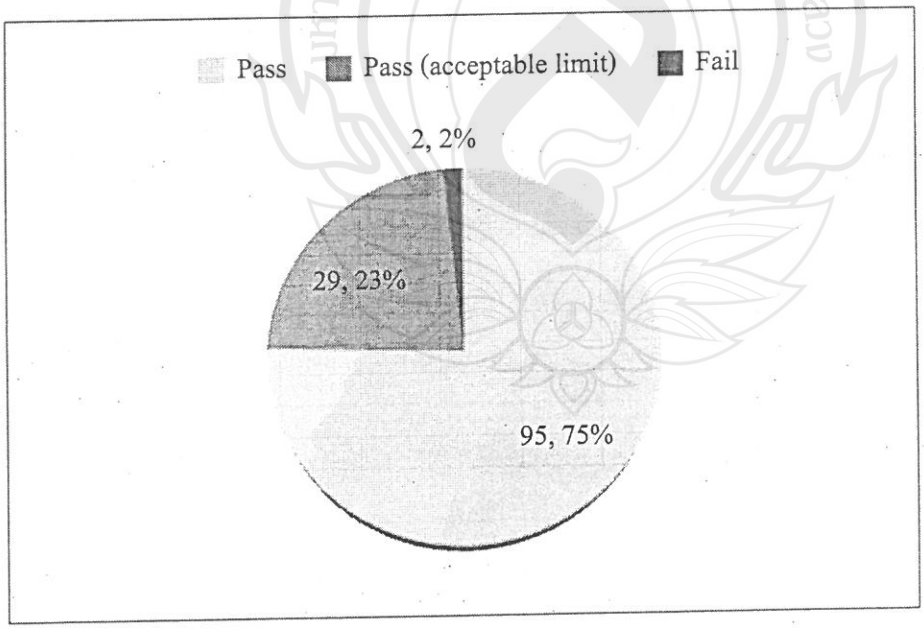
4.2.1 การทดสอบกับสารมาตรฐาน

เตรียมสารมาตรฐานกรดแกลลิคเข้มข้น 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 และ 50 µg/ml (เทียบเท่ากับค่าในแถบสีมาตรฐาน 0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5, 15.0, 20.0 และ 25.0%w/w ตามลำดับ) อย่างละ 7 ซ้ำ นำไปวิเคราะห์โดยวิธีของชุดทดสอบ อ่านค่าโดยเทียบกับแถบสีมาตรฐาน ใช้ผู้ทดสอบ 14 คน ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 4-1 และภาพที่ 4-4 พบว่าผลการทดสอบสารมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนจำนวน 7 ซ้ำกับผู้ทดสอบ 14 คน มีผู้อ่านผลทดสอบได้ถูกต้องตรง (Pass) กับระดับความเข้มข้นคิดเป็น 75.40% อ่านผลทดสอบได้ถูกต้องอยู่ในระดับที่ยอมรับได้ (Pass in acceptable limit, Pass-Acc) คิดเป็น 23.02% มีผู้อ่านผลผิดพลาด (Fail) คิดเป็น 1.59% เมื่อรวมผลทดสอบที่ผ่านทั้งหมด (Total pass) คิดเป็น 98.41% จากผลการทดสอบแสดงว่าแถบสีมาตรฐานที่ได้ทำขึ้นสามารถใช้อ่านผลการทดสอบได้เป็นอย่างดีในช่วงความเข้มข้น 0-25.0%

ตารางที่ 4-1 ผลการทดสอบความแม่นยำและถูกต้องของแถบสีมาตรฐานเมื่อทดสอบกับสารมาตรฐาน

%Total polyphenols		Number of Analysts													
		1		2		3		4		5		6		7	
Expected values	Acceptable limit	Read values	Pass/Fail	Read values	Pass/Fail	Read values	Pass/Fail	Read values	Pass/Fail	Read values	Pass/Fail	Read values	Pass/Fail	Read values	Pass/Fail
0	0-2.5	0	Pass	0	Pass	0	Pass	0	Pass	0	Pass	2.5	Pass-Acc	0	Pass
2.5	0-5	2.5	Pass	5	Pass-Acc	5	Pass-Acc	2.5	Pass	2.5	Pass	2.5	Pass	2.5	Pass
5	2.5-7.5	5	Pass	5	Pass	7.5	Pass-Acc	5	Pass	5	Pass	10	Fail	5	Pass
7.5	5-10	7.5	Pass	7.5	Pass	7.5	Pass	10	Pass-Acc	7.5	Pass	5	Pass-Acc	7.5	Pass
10	7.5-12.5	10	Pass	10	Pass	12.5	Pass-Acc	7.5	Pass-Acc	10	Pass	7.5	Pass-Acc	10	Pass
12.5	10-15	12.5	Pass	12.5	Pass	12.5	Pass	15	Pass-Acc	12.5	Pass	12.5	Pass	15	Pass-Acc
15	12.5-20	15	Pass	20	Pass-Acc	15	Pass	12.5	Pass-Acc	15	Pass	15	Pass	12.5	Pass-Acc
20	15-25	20	Pass	25	Pass-Acc	20	Pass	25	Pass-Acc	20	Pass	20	Pass	20	Pass
25	20-25	25	Pass	25	Pass	25	Pass	25	Pass	25	Pass	25	Pass	25	Pass

%Total polyphenols		Number of Analysts													
		8		9		10		11		12		13		14	
Expected values	Acceptable limit	Read values	Pass/Fail	Read values	Pass/Fail	Read values	Pass/Fail	Read values	Pass/Fail	Read values	Pass/Fail	Read values	Pass/Fail	Read values	Pass/Fail
0	0-2.5	0	Pass	0	Pass	0	Pass	0	Pass	2.5	Pass-Acc	0	Pass	0	Pass
2.5	0-5	2.5	Pass	2.5	Pass	2.5	Pass	5	Pass-Acc	5	Pass-Acc	2.5	Pass	2.5	Pass
5	2.5-7.5	5	Pass	5	Pass	5	Pass	5	Pass	7.5	Pass-Acc	5	Pass	5	Pass
7.5	5-10	7.5	Pass	7.5	Pass	7.5	Pass	10	Pass	5	Pass-Acc	7.5	Pass	7.5	Pass
10	7.5-12.5	7.5	Pass-Acc	10	Pass	10	Pass	12.5	Pass-Acc	10	Pass	10	Pass	10	Pass
12.5	10-15	10	Pass-Acc	12.5	Pass	12.5	Pass	15	Pass	12.5	Pass	12.5	Pass	12.5	Pass
15	12.5-20	12.5	Pass-Acc	15	Pass	15	Pass	20	Pass-Acc	10	Fail	15	Pass	15	Pass
20	15-25	20	Pass	20	Pass	20	Pass	25	Pass-Acc	15	Pass-Acc	20	Pass	20	Pass
25	20-25	25	Pass	25	Pass	25	Pass	25	Pass	20	Pass-Acc	25	Pass	25	Pass
Number of test		126	Number of Fail		2	Number of Pass-Acc		29	Number of Pass		95	Number of Total Pass		124	
			%Fall		1.59	%Pass-Acc		23.02	%Pass		75.40	%Total Pass		98.41	



ภาพที่ 4-4 ผลการทดสอบกับสารมาตรฐาน

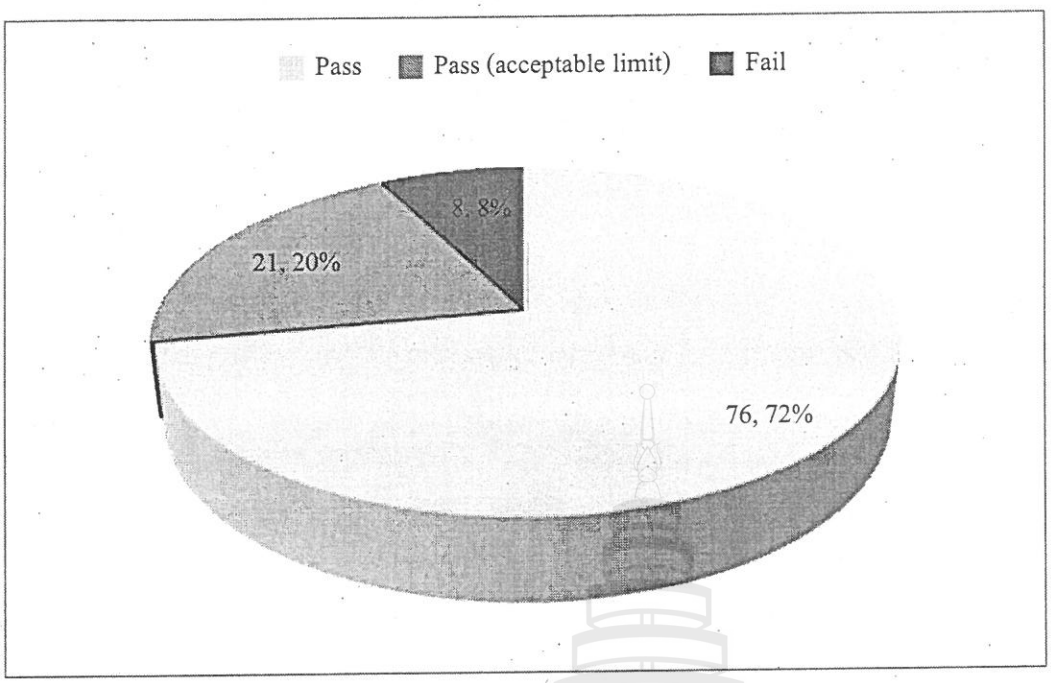
4.2.2 การทดสอบกับตัวอย่างชา

เตรียมตัวอย่างชาจำนวน 6 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 7 ซ้ำ นำไปวิเคราะห์โดยวิธีมาตรฐานเพื่อหาปริมาณโพลิฟีนอลทั้งหมด และนำไปวิเคราะห์โดยวิธีของชุดทดสอบ อ่านค่าโดยเทียบกับแถบสีมาตรฐาน ใช้ผู้ทดสอบในการอ่านผล 14 คน ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 4-2 และภาพที่ 4-5 พบว่ามีผู้ทดสอบผู้อ่านผลทดสอบได้ถูกต้องตรงกับระดับความเข้มข้น (Pass) คิดเป็น 65.48% อ่านผลทดสอบได้ถูกต้องอยู่ในระดับที่ยอมรับได้ (Pass in acceptable limit, Pass-Acc) คิดเป็น 25.00% มีผู้อ่านผลผิดพลาด (Fail) คิดเป็น 9.52% เมื่อรวมผลทดสอบที่ผ่านทั้งหมด (Total pass) คิดเป็น 90.48% จากผลการทดสอบแสดงว่าแถบสีมาตรฐานที่ได้ทำขึ้นสามารถใช้อ่านผลการทดสอบกับตัวอย่างชาได้ในระดับค่อนข้างดี (อ่านผลทดสอบได้ถูกต้อง 90%)

ตารางที่ 4-2 ผลการทดสอบความแม่นยำและถูกต้องของแถบสีมาตรฐานเมื่อทดสอบกับตัวอย่างชา

Sample code	%Total polyphenols		Number of Analysts													
			1		2		3		4		5		6		7	
	Expected values	Acceptable limit	Read values	Pass/Fail	Read values	Pass/Fail	Read values	Pass/Fail	Read values	Pass/Fail	Read values	Pass/Fail	Read values	Pass/Fail	Read values	Pass/Fail
T-001	5	2.5-7.5	0	Fail	5	Pass	5	Pass	5	Pass	5	Pass	5	Pass	5	Pass
T-002	2.5	0-5	2.5	Pass	0	Pass-Acc	2.5	Pass	2.5	Pass	2.5	Pass	2.5	Pass	2.5	Pass
T-006	15	12.5-20	15	Pass	15	Pass	20	Pass-Acc	15	Pass	15	Pass	12.5	Pass-Acc	12.5	Pass-Acc
T-007	20	15-25	15	Pass-Acc	20	Pass	20	Pass	20	Pass	25	Pass-Acc	20	Pass	20	Pass
T-009	15	12.5-20	12.5	Pass-Acc	15	Pass	15	Pass	10	Fail	15	Pass	12.5	Pass-Acc	15	Pass
T-014	12.5	10-15	12.5	Pass	12.5	Pass	10	Pass-Acc	20	Fail	10	Pass-Acc	10	Pass-Acc	15	Pass-Acc

Sample code	%Total polyphenols		Number of Analysts													
			8		9		10		11		12		13		14	
	Expected values	Acceptable limit	Read values	Pass/Fail	Read values	Pass/Fail	Read values	Pass/Fail	Read values	Pass/Fail	Read values	Pass/Fail	Read values	Pass/Fail	Read values	Pass/Fail
T-001	5	2.5-7.5	5	Pass	5	Pass	2.5	Pass-Acc	5	Pass	5	Pass	5	Pass	5	Pass
T-002	2.5	0-5	2.5	Pass	2.5	Pass	2.5	Pass	2.5	Pass	2.5	Pass	2.5	Pass	2.5	Pass
T-006	15	12.5-20	15	Pass	25	Fail	10	Fail	20	Pass-Acc	15	Pass	15	Pass	15	Pass
T-007	20	15-25	15	Pass-Acc	20	Pass	12.5	Fail	20	Pass	20	Pass	20	Pass	20	Pass
T-009	15	12.5-20	12.5	Pass-Acc	15	Pass	15	Pass	12.5	Pass-Acc	10	Fail	15	Pass	12.5	Pass-Acc
T-014	12.5	10-15	12.5	Pass	12.5	Pass	12.5	Pass	10	Pass-Acc	10	Pass-Acc	15	Pass-Acc	5	Fail
Number of test			84	Number of Fail		8	Number of Pass-Acc		21	Number of Pass		55	Number of Total Pass		76	
				%Fail		9.52	%Pass-Acc		25.00	%Pass		65.48	%Total Pass		90.48	



ภาพที่ 4-5 ผลการทดสอบกับตัวอย่างชา

4.2.3 การทดสอบ Spiked sample

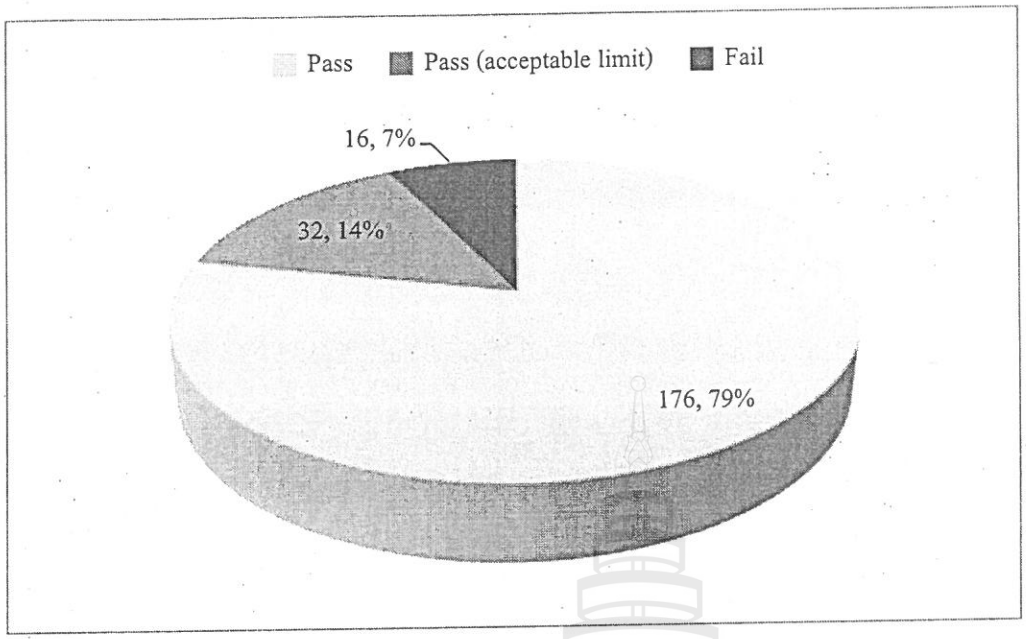
ตรวจสอบความถูกต้องของแถบสีมาตรฐานในการอ่านผลทดสอบโดยการเติมสารมาตรฐานกรดแกลลิคที่ทราบความเข้มข้นลงไปในตัวอย่างชา จากนั้นสกัดชา ทำการวิเคราะห์โดยวิธีชุดทดสอบอ่านค่าโดยเทียบกับแถบสีมาตรฐาน ใช้ผู้ทดสอบในการอ่านผล 14 คน ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 4-3 และภาพที่ 4-6 ผลการทดสอบ spiked samples จำนวน 16 ตัวอย่าง ๆ ละ 7 ซ้ำกับผู้ทดสอบ 14 คน พบว่ามีผู้อ่านผลทดสอบอ่านผลได้ถูกต้องตรงกับระดับความเข้มข้น (Pass) คิดเป็น 78.57% อ่านผลทดสอบได้ถูกต้องอยู่ในระดับที่ยอมรับได้ (Pass in acceptable limit, Pass-Acc) คิดเป็น 14.29% มีผู้อ่านผลผิดพลาด (Fail) คิดเป็น 7.14% เมื่อรวมผลทดสอบที่ผ่านทั้งหมด (Total pass) คิดเป็น 92.86% จากผลการทดสอบความถูกต้องแสดงว่าแถบสีมาตรฐานที่ได้ทำขึ้นสามารถใช้อ่านผลการทดสอบกับตัวอย่างชาได้ในระดับค่อนข้างดี มีความถูกต้องของผลทดสอบโดยอ่านผลทดสอบได้ถูกต้อง คิดเป็นประมาณ 93%

ตารางที่ 4-3 ผลการทดสอบ spiked samples ในการอ่านผลจากแถบสีมาตรฐาน

Sample code	%Total polyphenols		Number of Analysts													
			1		2		3		4		5		6		7	
	Expected values	Acceptable limit	Read values	Pass/Fail	Read values	Pass/Fail	Read values	Pass/Fail	Read values	Pass/Fail	Read values	Pass/Fail	Read values	Pass/Fail	Read values	Pass/Fail
T-001-A	10	7.5-12.5	10	Pass	10	Pass	10	Pass	15	Fail	10	Pass	10	Pass	10	Pass
T-001-B	12.5	10-15	12.5	Pass	12.5	Pass	12.5	Pass	15	Pass	12.5	Pass	12.5	Pass	12.5	Pass
T-001-C	15	12.5-20	15	Pass	15	Pass	20	Pass-Acc	20	Pass	15	Pass	20	Pass-Acc	15	Pass
T-001-D	25	20-25	25	Pass	25	Pass	25	Pass	25	Pass	25	Pass	25	Pass	20	Pass
T-002-A	5	2.5-7.5	10	Fail	5	Pass	5	Pass	7.5	Pass-Acc	5	Pass	5	Pass	5	Pass
T-002-B	10	7.5-12.5	15	Fail	10	Pass	10	Pass	10	Pass	7.5	Pass-Acc	10	Pass	10	Pass
T-002-C	15	12.5-20	20	Pass-Acc	15	Pass	15	Pass	15	Pass	15	Pass	20	Pass	15	Pass
T-002-D	20	15-25	20	Pass	20	Pass	20	Pass	15	Pass-Acc	20	Pass	25	Pass	20	Pass
T-003-A	7.5	5-10	10	Pass-Acc	10	Pass-Acc	10	Pass-Acc	7.5	Fail	15	Pass	10	Pass	5	Pass
T-003-B	12.5	10-15	12.5	Pass	12.5	Pass	12.5	Pass	15	Pass	12.5	Pass	12.5	Pass	12.5	Pass
T-003-C	15	12.5-20	15	Pass	15	Pass	15	Pass	20	Pass	15	Pass	15	Pass	15	Pass
T-003-D	20	15-25	25	Pass-Acc	20	Pass	20	Pass	20	Pass	20	Pass	20	Pass	20	Pass
T-009-A	20	15-25	20	Pass	25	Pass	20	Pass	20	Pass	20	Pass-Acc	12.5	Fail	15	Pass
T-009-B	25	20-25	25	Pass	25	Pass-Acc	25	Pass	25	Pass	25	Pass	15	Fail	25	Pass
T-009-C	25	20-26	25	Pass	25	Pass	25	Pass	25	Pass	25	Pass	20	Pass-Acc	25	Pass
T-009-D	25	20-27	25	Pass	25	Pass	25	Pass	25	Pass	25	Pass	25	Pass	25	Pass

Sample code	%Total polyphenols		Number of Analysts													
			8		9		10		11		12		13		14	
	Expected values	Acceptable limit	Read values	Pass/Fail	Read values	Pass/Fail	Read values	Pass/Fail	Read values	Pass/Fail	Read values	Pass/Fail	Read values	Pass/Fail	Read values	Pass/Fail
T-001-A	10	7.5-12.5	10	Pass	7.5	Pass-Acc	10	Pass	10	Pass	10	Pass	5	Fail	10	Pass
T-001-B	12.5	10-15	12.5	Pass	10	Pass-Acc	7.5	Fail	12.5	Pass	12.5	Pass	7.5	Fail	10	Pass-Acc
T-001-C	15	12.5-20	15	Pass	15	Pass	10	Fail	15	Pass	10	Fail	15	Pass	15	Pass
T-001-D	25	20-25	20	Pass-Acc	20	Pass-Acc	20	Pass-Acc	20	Pass-Acc	25	Pass	25	Pass	25	Pass
T-002-A	5	2.5-7.5	5	Pass	5	Pass	5	Pass	5	Pass	5	Pass	5	Pass	5	Pass
T-002-B	10	7.5-12.5	10	Pass	12.5	Pass	10	Pass	10	Pass	10	Pass	12.5	Pass	7.5	Pass-Acc
T-002-C	15	12.5-20	10	Fail	20	Pass	19	Fail	12.5	Pass-Acc	12.5	Pass	20	Pass	10	Fail
T-002-D	20	15-25	20	Pass	20	Pass	20	Pass	20	Pass	15	Pass	20	Pass	20	Pass
T-003-A	7.5	5-10	10	Pass-Acc	10	Pass-Acc	7.5	Pass	7.5	Pass	7.5	Pass	5	Pass-Acc	10	Pass
T-003-B	12.5	10-15	12.5	Pass	12.5	Pass	10	Pass	12.5	Pass	10	Pass	12.5	Pass	10	Pass
T-003-C	15	12.5-20	15	Pass	20	Pass-Acc	12.5	Pass	15	Pass	12.5	Pass	12.5	Pass-Acc	10	Fail
T-003-D	20	15-25	20	Pass	20	Pass	15	Pass	20	Pass	20	Pass	20	Pass	20	Pass
T-009-A	20	15-25	20	Pass	20	Pass	20	Pass	20	Pass	20	Pass	12.5	Fail	20	Pass
T-009-B	25	20-25	20	Pass-Acc	25	Pass	20	Pass	20	Pass-Acc	25	Pass	25	Pass	25	Pass
T-009-C	25	20-26	25	Pass	20	Pass-Acc	25	Pass	25	Pass	25	Pass	20	Pass-Acc	20	Pass-Acc
T-009-D	25	20-27	25	Pass	25	Pass	20	Pass	25	Pass	25	Pass	25	Pass	25	Pass

Number of test			224	Number of Fail		16	Number of Pass-Acc		32	Number of Pass		176	Number of Total Pass			208
				%Fail		7.14	%Pass-Acc		14.29	%Pass		78.57	%Total Pass			92.86



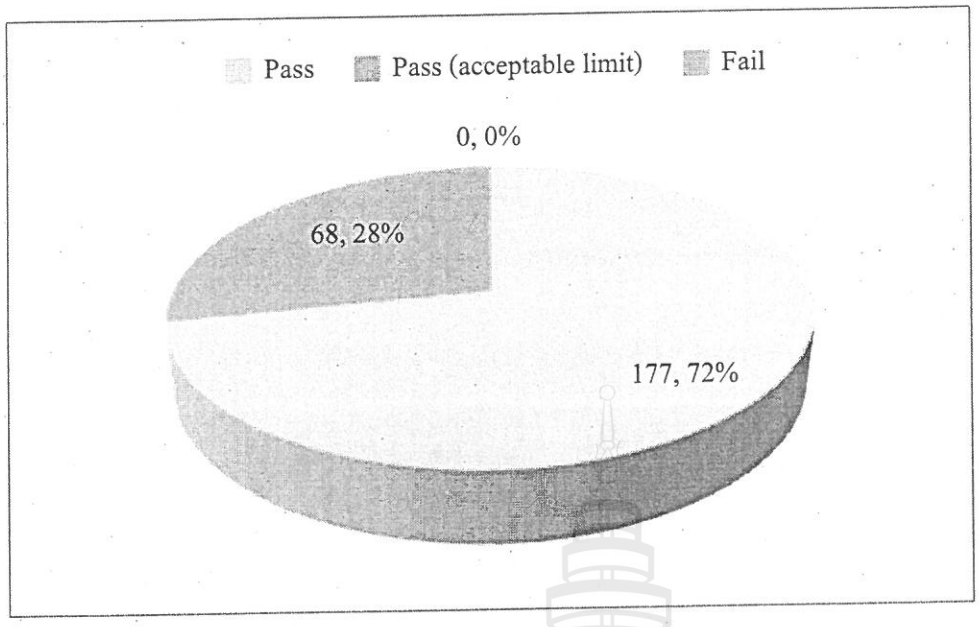
ภาพที่ 4-6 ผลการทดสอบกับ Spiked sample

4.2.4 การทดสอบความแม่นยำ

ตรวจสอบแม่นยำของแถบสีมาตรฐานในการอ่านผลทดสอบโดยการเตรียมตัวอย่างชา 7 ตัวอย่าง ๆ ละ 7 ซ้ำ ทำการวิเคราะห์โดยวิธีชุดทดสอบ อ่านค่าโดยเทียบกับแถบสีมาตรฐาน ใช้ผู้ทดสอบในการอ่านผล 7 คน ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 4-4 ภาพที่ 4-7 พบว่าผลการทดสอบความแม่นยำในการอ่านผลตัวอย่างชาจำนวน 7 ตัวอย่าง ๆ ละ 7 ซ้ำกับผู้ทดสอบ 7 คน มีผู้อ่านผลทดสอบได้ถูกต้องตรงกับระดับความเข้มข้น (Pass) คิดเป็น 72.24% อ่านผลทดสอบได้ถูกต้องอยู่ในระดับที่ยอมรับได้ (Pass in acceptable limit, Pass-Acc) คิดเป็น 27.76% ไม่มีผู้อ่านผลผิดพลาด (Fail) เมื่อรวมผลทดสอบที่ผ่านทั้งหมด (Total pass) คิดเป็น 100% จากผลการทดสอบแสดงว่าแถบสีมาตรฐานที่ได้ทำขึ้นสามารถใช้อ่านผลการทดสอบกับตัวอย่างชาได้ในดีเยี่ยม มีความแม่นยำของผลทดสอบโดยอ่านผลทดสอบได้ถูกต้อง คิดเป็นประมาณ 100%

ตารางที่ 4-4 ผลการทดสอบความแม่นยำของแถบสีมาตรฐานเมื่อทดสอบกับตัวอย่างชา

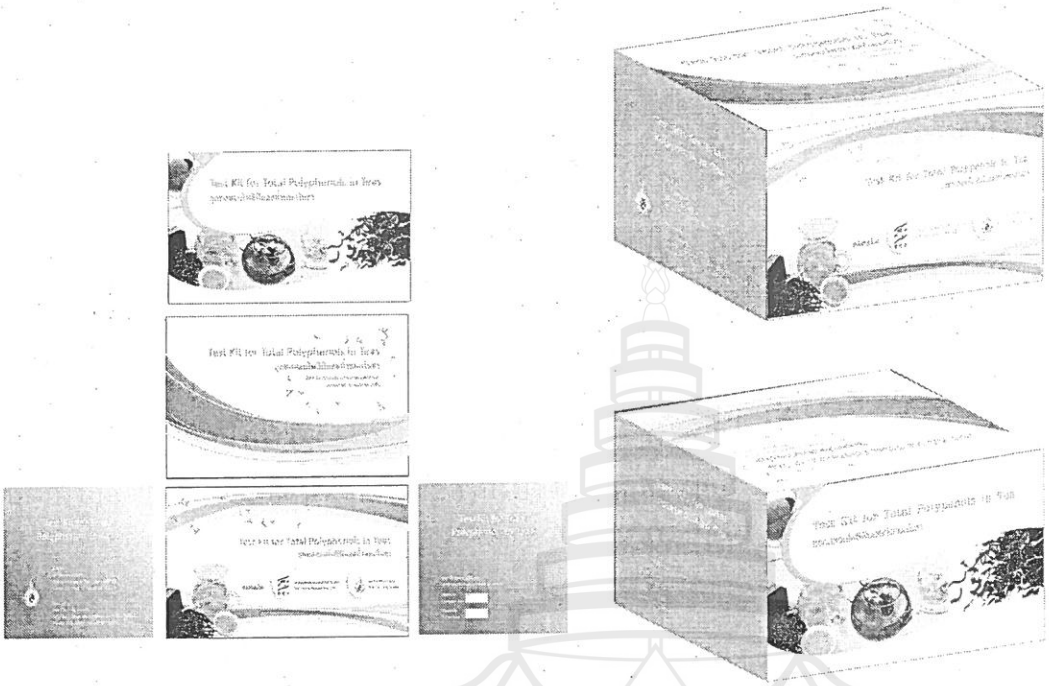
Sample code	%Total polyphenols		Repeat	Number of Analysts													
				1		2		3		4		5		6		7	
	Expected values	Acceptable limit		Read values	Pass/Fail	Read values	Pass/Fail	Read values	Pass/Fail	Read values	Pass/Fail	Read values	Pass/Fail	Read values	Pass/Fail	Read values	Pass/Fail
T-001	5	2.5-7.5	1	5	Pass	2.5	Pass-Acc	5	Pass	2.5	Pass-Acc	5	Pass	5	Pass	5	Pass
			2	5	Pass	2.5	Pass-Acc	5	Pass	2.5	Pass-Acc	5	Pass	5	Pass	2.5	Pass-Acc
			3	5	Pass	2.5	Pass-Acc	5	Pass	2.5	Pass-Acc	5	Pass	5	Pass	5	Pass
			4	5	Pass	2.5	Pass-Acc	5	Pass	2.5	Pass-Acc	5	Pass	5	Pass	5	Pass
			5	5	Pass	2.5	Pass-Acc	5	Pass	2.5	Pass-Acc	5	Pass	5	Pass	5	Pass
			6	5	Pass	2.5	Pass-Acc	2.5	Pass-Acc	2.5	Pass-Acc	5	Pass	5	Pass	2.5	Pass-Acc
			7	5	Pass	2.5	Pass-Acc	2.5	Pass-Acc	2.5	Pass-Acc	5	Pass	5	Pass	2.5	Pass-Acc
T-002	2.5	0-5	1	2.5	Pass	5	Pass-Acc	2.5	Pass	2.5	Pass	2.5	Pass	2.5	Pass	5	Pass-Acc
			2	2.5	Pass	5	Pass-Acc	2.5	Pass	2.5	Pass	2.5	Pass	2.5	Pass	5	Pass-Acc
			3	2.5	Pass	5	Pass-Acc	2.5	Pass	2.5	Pass	2.5	Pass	2.5	Pass	5	Pass-Acc
			4	2.5	Pass	5	Pass-Acc	2.5	Pass	2.5	Pass	2.5	Pass	2.5	Pass	5	Pass-Acc
			5	2.5	Pass	5	Pass-Acc	2.5	Pass	2.5	Pass	2.5	Pass	2.5	Pass	5	Pass-Acc
			6	2.5	Pass	5	Pass-Acc	2.5	Pass	2.5	Pass	2.5	Pass	2.5	Pass	5	Pass-Acc
			7	2.5	Pass	5	Pass-Acc	2.5	Pass	2.5	Pass	2.5	Pass	2.5	Pass	5	Pass-Acc
T-006	15	12.5-20	1	12.5	Pass-Acc	15	Pass	15	Pass	15	Pass	15	Pass	15	Pass	15	Pass
			2	12.5	Pass-Acc	15	Pass	15	Pass	15	Pass	15	Pass	15	Pass	15	Pas
			3	12.5	Pass-Acc	15	Pass	15	Pass	15	Pass	15	Pass	15	Pass	15	Pass
			4	12.5	Pass-Acc	15	Pass	15	Pass	15	Pass	15	Pass	15	Pass	15	Pass
			5	12.5	Pass-Acc	15	Pass	15	Pass	15	Pass	15	Pass	15	Pass	15	Pass
			6	12.5	Pass-Acc	15	Pass	15	Pass	15	Pass	15	Pass	15	Pass	15	Pass
			7	12.5	Pass-Acc	15	Pass	15	Pass	15	Pass	15	Pass	15	Pass	15	Pass
T-007	20	15-25	1	20	Pass	15	Pass-Acc	20	Pass	20	Pass	15	Pass-Acc	20	Pass	20	Pass
			2	20	Pass	15	Pass-Acc	20	Pass	20	Pass	15	Pass-Acc	20	Pass	20	Pass
			3	20	Pass	15	Pass-Acc	20	Pass	20	Pass	15	Pass-Acc	20	Pass	20	Pass
			4	20	Pass	15	Pass-Acc	20	Pass	20	Pass	15	Pass-Acc	20	Pass	20	Pass
			5	20	Pass	15	Pass-Acc	20	Pass	20	Pass	15	Pass-Acc	20	Pass	20	Pass
			6	20	Pass	15	Pass-Acc	20	Pass	20	Pass	15	Pass-Acc	20	Pass	20	Pass
			7	20	Pass	15	Pass-Acc	20	Pass	20	Pass	15	Pass-Acc	20	Pass	20	Pass
T-009	15	12.5-20	1	15	Pass	12.5	Pass-Acc	15	Pass	15	Pass	15	Pass-Acc	12.5	Pass	15	Pass
			2	15	Pass	12.5	Pass-Acc	15	Pass	15	Pass	15	Pass-Acc	12.5	Pass	15	Pass
			3	15	Pass	12.5	Pass-Acc	15	Pass	15	Pass	15	Pass-Acc	12.5	Pass	15	Pass
			4	15	Pass	12.5	Pass-Acc	15	Pass	15	Pass	15	Pass-Acc	12.5	Pass	15	Pass
			5	15	Pass	12.5	Pass-Acc	15	Pass	15	Pass	15	Pass-Acc	12.5	Pass	15	Pass
			6	15	Pass	12.5	Pass-Acc	15	Pass	15	Pass	15	Pass-Acc	12.5	Pass	15	Pass
			7	15	Pass	12.5	Pass-Acc	15	Pass	15	Pass	15	Pass-Acc	12.5	Pass	15	Pass
Number of test			245	Number of Fail			0	Number of Pass			177	Number of Pass-Acc (Pass in acceptable limit)					68
				%Fail			0	%Pass			72.24	%Pass (acceptable limit)					27.76
												%Total Pass					100.00



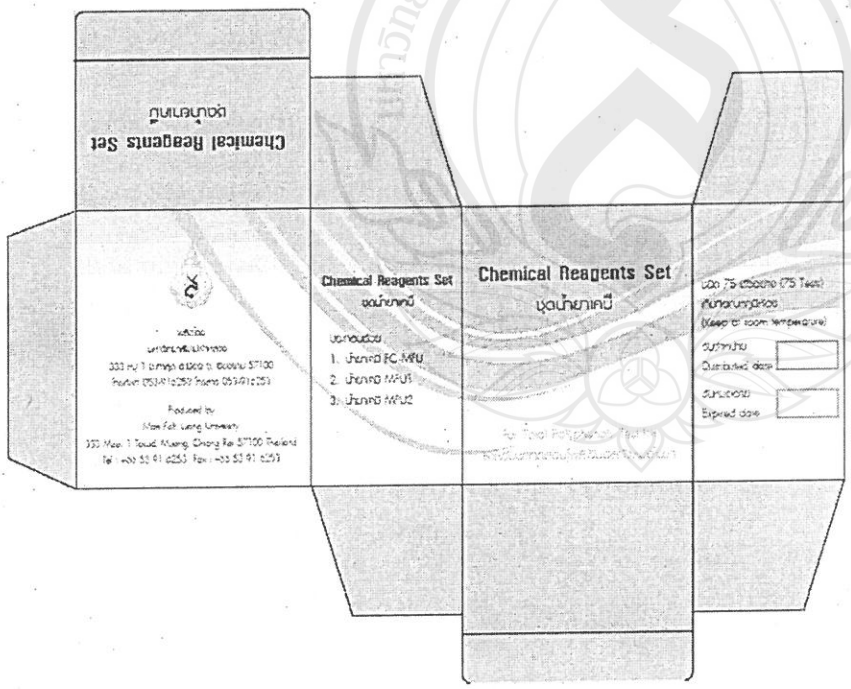
ภาพที่ 4-7 ผลการทดสอบความแม่นยำ

4.3 การออกแบบและพัฒนาบรรจุภัณฑ์

ได้ทำการออกแบบบรรจุภัณฑ์ที่เหมาะสมสำหรับชุดทดสอบ ดังแสดงในภาพ



ภาพที่ 4-8 กล่องชุดทดสอบ



ภาพที่ 4-9 กล่องชุดน้ำยาเคมี

ส่วนประกอบของชุดทดสอบ

1.	กรวยบด และก้านตำ	จำนวน	1 ชุด
2.	ช้อนพลาสติก	จำนวน	2 อัน
3.	ขวดสกัด	จำนวน	1 ขวด
4.	ขวดถือจาง	จำนวน	1 ขวด
5.	เข็มฉีดยา	จำนวน	2 อัน
6.	หลอดทดลอง	จำนวน	5 หลอด
7.	น้ำยาคลิ FC-MFU	จำนวน	1 ขวด
8.	น้ำยาคลิ MFU1	จำนวน	1 ขวด
9.	น้ำยาคลิ MFU2	จำนวน	1 ขวด
10.	เกณฑ์เทียบสีมาตรฐาน	จำนวน	1 ชุด
11.	คู่มือการใช้งาน	จำนวน	1 ชุด

วิธีการทดสอบ

วิธีการทดสอบแบ่งเป็น 2 ขั้นตอน คือ การสกัดชา และการวิเคราะห์

ขั้นตอนที่ 1 การสกัดชา

1.1 ชงใบชาแห้งด้วยครกบดจนละเอียด ใช้ช้อนตักชาใส่ขวดสกัด
1.2 เติมน้ำเดือดลงขวดสกัดจนถึงขีดปริมาตร ปิดฝา และเขย่าเป็นเวลา 5 นาที
1.3 ใช้เข็มฉีดยาดูดน้ำชา 2 มิลลิลิตร ใส่ในขวดถือจาง เติมน้ำจนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน

ขั้นตอนที่ 2 การวิเคราะห์

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

Test Kit for Total Polyphenols in Teas

ชุดทดสอบโพลีฟีนอลทั้งหมดในชา

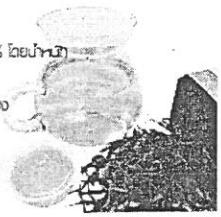
สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบในใบชาเรียกว่า "โพลีฟีนอล" โพลีฟีนอลเป็นสารที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ช่วยลดความเสี่ยงของการเกิดโรคมะเร็ง และโรคหัวใจ อย่างไรก็ตาม ปริมาณโพลีฟีนอลในพลังงานชา ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ชนิดพันธุ์ชา พื้นที่ปลูก การดูแลรักษา กรรมวิธีการผลิต และคุณภาพของชา การตรวจหาปริมาณโพลีฟีนอลที่สามารถบ่งชี้ปริมาณสารสำคัญที่ผู้บริโภคจะได้รับจากการดื่มชา ดังนั้น ชุดทดสอบโพลีฟีนอลทั้งหมดในชาจึงได้ถูกคิดค้นขึ้น โดยมีจุดมุ่งหมายเพื่อหาปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในชาด้วยวิธีการที่ง่าย สะดวก รวดเร็ว ถูกต้อง และประหยัด เพื่อเป็นเครื่องมือสำหรับผู้ประกอบการร้านค้าชา ผู้ผลิตชา ตลอดจนผู้บริโภคที่ไม่มีความรู้เรื่องการตรวจสอบทางห้องปฏิบัติการ ให้สามารถตรวจสอบได้ด้วยตนเอง เพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการปรับปรุงกระบวนการผลิตชา รวมทั้งใช้เป็นเครื่องมือในการตัดสินใจเลือกซื้อชาของผู้บริโภค

หลักการ

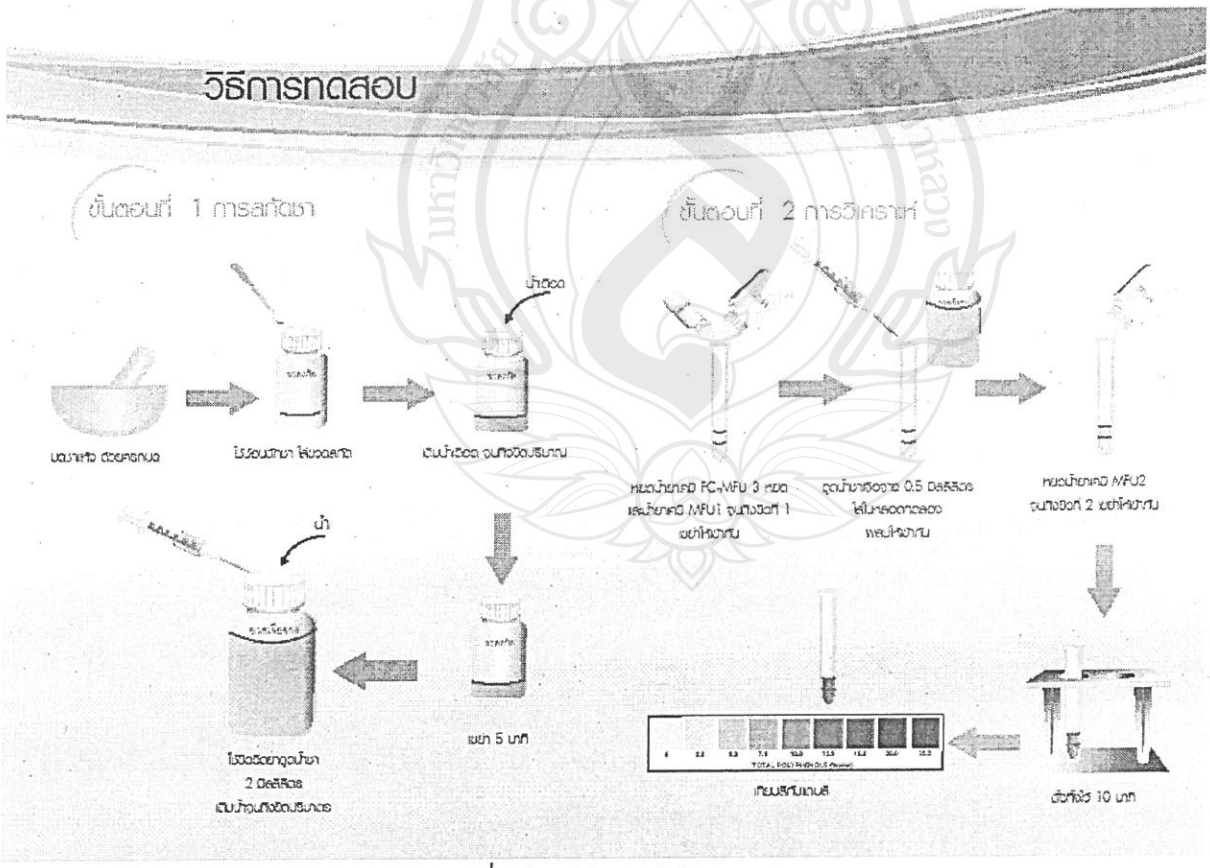
ชุดทดสอบโพลีฟีนอลทั้งหมดในชา เป็นชุดตรวจวัดปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดในชาแห้งด้วยวิธี Folin-Ciocalteu assay โดยการทำปฏิกิริยากระหว่าง Folin-Ciocalteu reagent และสารประกอบฟีนอลในชาได้ผลิตภัณฑ์สีน้ำเงินที่สามารถตรวจวัดปริมาณโดยเทียบความเข้มสีกับแถบสีมาตรฐาน

ข้อมูลชุดทดสอบ

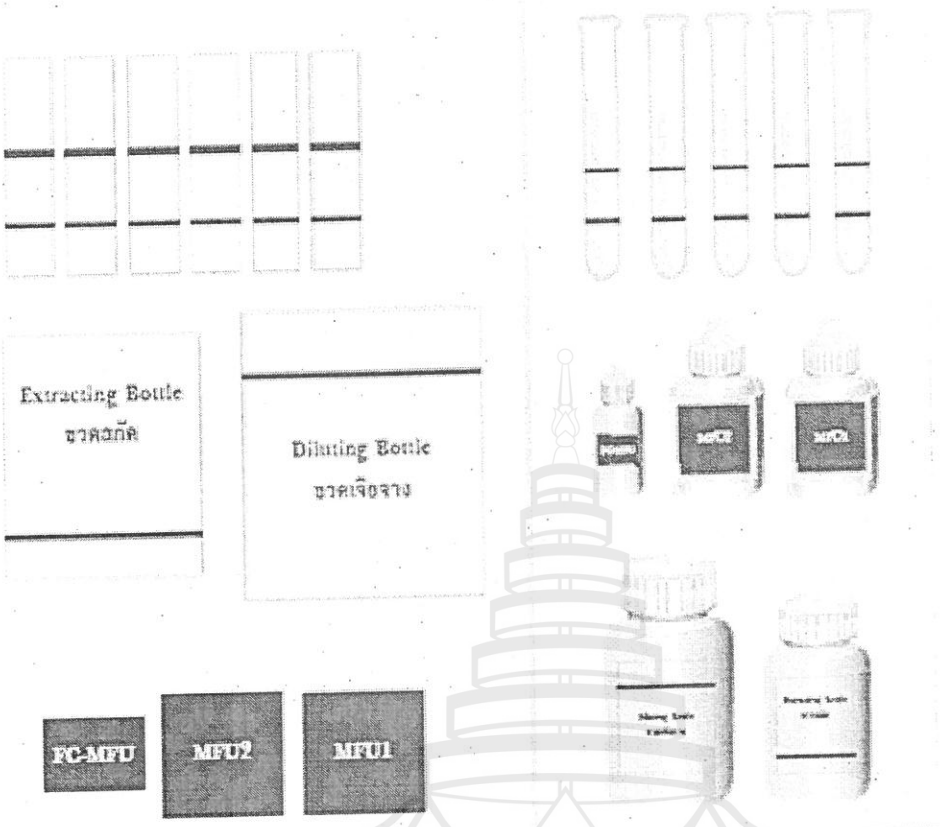
ตัวอย่าง	ชาแห้ง
ช่วงของการทดสอบ	2.5 - 25 % โดยน้ำหนัก
อายุของชุดทดสอบ	1 ปี
สภาวะการเก็บ	อุณหภูมิห้อง
จำนวนทดสอบ	75 ครั้ง



วิธีการทดสอบ



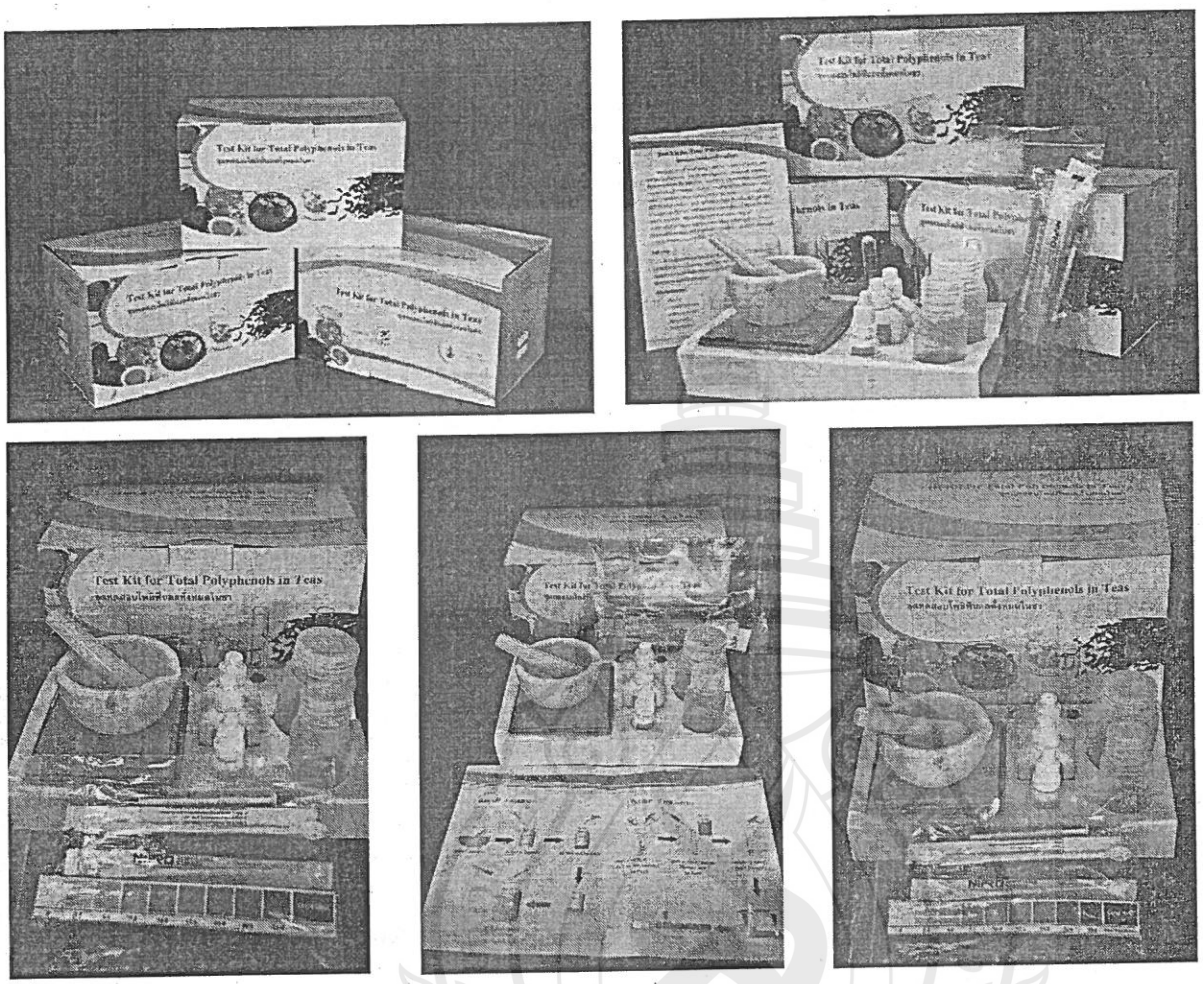
ภาพที่ 4-10 คู่มือการใช้งาน



ภาพที่ 4-11 สติ๊กเกอร์อุปกรณ์ในชุดทดสอบ

4.4 การจัดทำชุดทดสอบต้นแบบ

ได้จัดทำชุดทดสอบต้นแบบจำนวน 40 ชุด ดังแสดงในภาพที่ 4-12



ภาพที่ 4-12 ชุดทดสอบต้นแบบ

4.5 การวิเคราะห์ต้นทุนของชุดทดสอบ

เมื่อคำนวณต้นทุนของชุดทดสอบพบว่าต้นทุนในการผลิตชุดทดสอบเท่ากับ 284.20 บาทต่อชุด แบ่งเป็นต้นทุนน้ำยาเคมี 24.20 บาท ต้นทุนวัสดุและอุปกรณ์ 185 บาท และต้นทุนบรรจุภัณฑ์ 75 บาท

ตารางที่ 4-5 ต้นทุนของชุดทดสอบ

ต้นทุนน้ำยาเคมี			
ชนิดของน้ำยาเคมี	จำนวน	ราคาต่อหน่วย (บาท)	ราคา (บาท)
FC-MFU	1	17.20	17.20
MFU1	1	2.00	2.00
MFU2	1	5.00	5.00
รวมต้นทุนน้ำยาเคมี			24.20
ต้นทุนวัสดุและอุปกรณ์			
ชนิดของวัสดุและอุปกรณ์	จำนวน	ราคาต่อหน่วย (บาท)	ราคา (บาท)
ครกพร้อมที่บด	1	32.00	32.00
ช้อนพลาสติก	2	0.50	1.00
ขวดสกัด	1	25.00	25.00
ขวดเจือจาง	1	38.00	38.00
กระบอกฉีดยา	2	3.00	6.00
หลอดทดลอง	5	11.00	55.00
ขวดน้ำยาเคมี FC-MFU	1	2.50	2.50
ขวดน้ำยาเคมี MFU1	1	5.00	5.00
ขวดน้ำยาเคมี MFU2	1	5.00	5.00
แถบเทียบสีมาตรฐาน	1	5.00	5.00
คู่มือการใช้งาน	1	7.00	7.00
สติกเกอร์	1	3.50	3.5
รวมต้นทุนวัสดุและอุปกรณ์			185.00
ต้นทุนบรรจุภัณฑ์ชุดทดสอบ			
ชนิดกล่อง	จำนวน	ราคาต่อหน่วย (บาท)	ราคา (บาท)
กล่องชุดทดสอบ	1	75.00	75.00
รวมต้นทุนบรรจุภัณฑ์			75.00
รวมต้นทุนชุดทดสอบ			**284.20**

ชุดทดสอบที่ประดิษฐ์ขึ้นประกอบด้วยน้ำยาเคมีที่สามารถใช้ทดสอบได้ 75 ครั้ง หากน้ำยาเคมีที่ใช้ทดสอบหมดสามารถซื้อเฉพาะชุดน้ำยาเคมีไปใช้ได้ ชุดน้ำยาเคมีประกอบด้วยน้ำยาเคมี 3 ชนิดคือ น้ำยาเคมี FC-MFU น้ำยาเคมี MFU1 และน้ำยาเคมี MFU2 สามารถใช้ทดสอบได้ 75 ครั้ง ต้นทุนของชุดน้ำยาเคมีเท่ากับ 36.20 บาท ประกอบด้วย ต้นทุนน้ำยาเคมี 24.20 บาท และต้นทุนกล่องบรรจุภัณฑ์ 12 บาท

ตารางที่ 4-6 ต้นทุนของชุดน้ำยาเคมี

ต้นทุนน้ำยาเคมี			
ชนิดของน้ำยาเคมี	จำนวน	ราคาต่อหน่วย (บาท)	ราคา (บาท)
FC-MFU	1	17.20	17.20
MFU1	1	2.00	2.00
MFU2	1	5.00	5.00
รวมต้นทุนน้ำยาเคมี			24.20
ต้นทุนบรรจุภัณฑ์ชุดทดสอบ			
ชนิดกล่อง	จำนวน	ราคาต่อหน่วย (บาท)	ราคา (บาท)
กล่องชุดน้ำยาเคมี	1	12.00	12.00
รวมต้นทุนบรรจุภัณฑ์			12.00
รวมต้นทุนชุดน้ำยาเคมี			**36.20**

บทที่ 5

สรุปผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

แถบสีมาตรฐานที่ได้พัฒนาขึ้นโดยเทียบสีในระบบ CMYK ด้วย Color book chart ใช้สายตาผู้ทดสอบอ่านค่าสีในระบบ CMYK นำไปพิมพ์ที่ร้านอัดรูปสีในระบบ RGB จากนั้นนำมาเทียบกับสีที่เกิดขึ้นจริงจากการทำปฏิกิริยาเคมี พบว่าวิธีดังกล่าวนี้ให้แถบสีที่มีเฉดสีใกล้เคียงกับสีที่เกิดขึ้นจริงจากปฏิกิริยาเคมีมากที่สุด เมื่อตรวจสอบความใช้ได้ของแถบสีที่ได้พัฒนาขึ้นโดยทดสอบความแม่นยำ ทดสอบความถูกต้อง และทดสอบความคลาดเคลื่อนจากการอ่านผลโดยผู้ทดสอบ พบว่าแถบสีที่พัฒนาขึ้นมีความถูกต้องและแม่นยำสูง สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ปริมาณโพลิฟีนอลทั้งหมดในชาได้ โดยผู้ทดสอบส่วนใหญ่ (90%) อ่านผลจากแถบสีได้ถูกต้องและอยู่ในช่วงเกณฑ์การยอมรับ

5.2 ข้อเสนอแนะของการวิจัย

1. ควรมีการส่งเสริมจากมหาวิทยาลัย หรือหน่วยงานภายนอก เพื่อให้มีการผลิตในเชิงพาณิชย์
2. ชุดทดสอบโพลิฟีนอลทั้งหมดในชาที่ประดิษฐ์ขึ้นสามารถขยายขอบเขตเพื่อการทดสอบโพลิฟีนอลทั้งหมดในผัก ผลไม้ และสมุนไพรอื่น ๆ ได้อย่างกว้างขวาง ดังนั้นจึงควรมีการส่งเสริมให้มีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อขยายผลการทดสอบให้กว้างขึ้น

บรรณานุกรม

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.

Naczk, 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.

Naczk, 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.