

บทที่ 2

การทดลอง

2.1 อุปกรณ์ และสารเคมี

2.1.1 อุปกรณ์

- 1) เครื่องโครมาโทกราฟของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatographic system) ประกอบด้วย
 - ก) Degasser (รุ่น G1322A Agilent Technologies, USA)
 - ข) Autosampler (รุ่น G 1329A, Agilent Technologies, USA)
 - ค) Binary gradient pump (รุ่น G 1312 A, Agilent Technologies, USA)
 - ง) Diode array detector (รุ่น G1315A, Agilent Technologies, USA)
 - จ) Mass spectrometry detector (รุ่น G 1946 A, Agilent Technologies, USA)
- 2) เครื่องชั่งน้ำหนักชนิดละเอียด (Analytical balance, รุ่น BA 210S, Sartorius AG, Germany)
- 3) Ultrasonicator (รุ่น 8891, Cole Parmer, USA)
- 4) Filter apparatus (รุ่น 11250, Millipore, USA)
- 5) เครื่องกลั่นสุญญากาศแบบหมุน (Rotary evaporator, Buchi Rotavapor FF-124, Switzerland)
- 6) คอลัมน์ (VertiSep UPS C18 HPLC, 250×4.6 mm i.d., 5 μ m)
- 7) เครื่องปั่น (รุ่น HR 2067, Philips, Indonesia)

2.1.2 สารเคมี

- 1) เมทานอล (methanol, HPLC grade, Fisher, UK)
- 2) อะซิโตนไนด์ริล (acetonitrile, HPLC grade, Sigma-Aldrich, Germany)
- 3) เอทานอล (ethanol, analytical grade, Fisher, UK)
- 4) กรดแกลลิก (gallic acid, Sigma-Aldrich, USA)

- 5) แกลโลคาเทชิน (gallocatechin $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich, USA)
- 6) คาเทชินไฮเดรต (catechin hydrate $\geq 96\%$, Sigma-Aldrich, USA)
- 7) อีพิกัลโลคาเทชินแกลเลต (epigallocatechin gallate from green tea $\geq 95\%$, Sigma-Aldrich, USA)
- 8) แกลโลคาเทชินแกลเลต (gallocatechin gallate from green tea $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich, USA)

2.2 การเตรียมตัวอย่าง

2.2.1 วัตถุดิบ

ตัวอย่างใบชาสด สายพันธุ์ *Camellia sinensis* var. *assamica* และตัวอย่างเมี่ยงหมักที่ผ่านขั้นตอนการผลิตตั้งแต่การนึ่ง จนถึงการหมัก 120 วัน เก็บจากท้องที่ในหมู่บ้านเทพเสด็จ อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งเริ่มเก็บในเดือนมีนาคม 2552

มีวิธีการเตรียมตัวอย่างชาก่อนสกัดอยู่สองวิธีคือ

- 1) แบบอบ นำตัวอย่างที่ได้มาอบที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมงให้ความชื้นออกจนได้น้ำหนักแห้งจากนั้นนำมาปั่นเป็นผง เก็บไว้ในถุงซิปล็อคที่แห้งที่อุณหภูมิห้องโดยปราศจากแสงเพื่อนำไปสกัดต่อไป
- 2) แบบไม่อบ นำตัวอย่างที่ได้มาปั่น แล้วทำการสกัดเลย

2.2.2 การสกัดตัวอย่าง

ชั่งใบชาเมี่ยง 10 กรัม สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 50% v/v 100 มิลลิลิตร อุณหภูมิ 80 °C เป็นเวลา 120 นาที สกัดหาตัวอย่างโดยวิธีการสกัดแบบ Soxhlet จากนั้นกรองสารที่ได้ด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ระเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่องกลั่นสุญญากาศแบบหมุน แล้วละลายสารสกัดด้วยเมทานอล ปรับให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 10 มิลลิลิตรด้วยเมทานอล

2.3 การเตรียมสารละลาย

2.3.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

เตรียม stock สารละลายมาตรฐานของกรดแกลลิก (GA) แกลโลคาเทชิน (GC) คาเทชิน (C) อีพิกัลโลคาเทชินแกลเลต (EGCG) และแกลโลคาเทชินแกลเลต (GCG) ความเข้มข้น 107.8, 98.0, 146.4, 1440.0 และ 490.0 พีพีเอ็ม ตามลำดับ จากนั้นเจือจางสารมาตรฐานให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วยเมทานอลเพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์

2.3.2 การเตรียมเฟสเคลื่อนที่ในการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิก

กรองตัวทำละลายเมทานอล อะซิโตน ไตรคลอโรเอเทน และน้ำ ผ่านเมมเบรน 0.45 μm จำนวน 1 ลิตร แล้วนำไปไล่แก๊ส โดยการ sonicate เป็นเวลา 15 – 30 นาที จากนั้นบรรจุใส่ขวดบรรจุตัวทำละลาย และนำไปต่อเข้ากับเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง-แมสสเปกโตรมิเตอร์

2.4 การศึกษาโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

นำสารละลายมาตรฐานผสม GA, GC, C, EGCG และ GCG ที่เตรียมไว้แล้วในข้อ 2.3.1 เจือจางให้มีความเข้มข้น 2.15, 43.12, 29.28, 71.82 และ 61.25 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ ฉีดเข้าเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 230 นาโนเมตร ซึ่งพิจารณาจากชนิดของเฟสเคลื่อนที่ อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ ความยาวคลื่นที่ใช้ในการวิเคราะห์ และอัตราการไหลของตัวพาที่เหมาะสม ที่ทำให้สามารถแยกสารมาตรฐานทั้ง 5 ชนิดได้อย่างสมบูรณ์ (ค่าการแยก มากกว่าหรือเท่ากับ 1.5) โดยวิธีการทดลองมีดังนี้

2.4.1 การหาสถานะของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม

นำสารละลายมาตรฐานผสม GA, GC, C, EGCG และ GCG ฉีดเข้าเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 230 นาโนเมตร โดยให้มีอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 5 มิลลิตรต่อนาที เปลี่ยนอัตราส่วนผสมของเฟสเคลื่อนที่ระหว่างเมทานอลหรืออะซิโตน ไตรคลอโรเอเทน และน้ำ ดังนี้ อัตราส่วนของเมทานอล : น้ำ เท่ากับ 40 : 60, 50 : 50 และ 60 : 40 อัตราส่วนอะซิโตน ไตรคลอโรเอเทน : น้ำ เท่ากับ 15 : 85, 20 : 80 และ 30 : 70

2.4.2 อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม

ปรับอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เป็น 0.5, 0.7 และ 1.0 mL/min ศึกษาผลของการแยกของสารมาตรฐานผสมแล้วเลือกอัตราการไหลที่เหมาะสม

2.4.3 ความยาวคลื่นในการตรวจวัด

ทำการเปลี่ยนความยาวคลื่นเพื่อความไวในการตรวจวัดที่เหมาะสม โดยเปลี่ยนความยาวคลื่น 3 ค่า คือ 230, 270 และ 280 นาโนเมตร

2.5 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์

จากสถานะที่เหมาะสมที่ได้ในการวิเคราะห์ด้วยโครมาโทกราฟของเหลวสมรรถนะสูง ต้องนำมาทดสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ ก่อนที่จะนำไปใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในตัวอย่าง เพื่อให้ได้ผลการทดลองอย่างถูกต้องและแม่นยำ วิธีการทดสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์มีวิธีการทดลอง ดังนี้

2.5.1 ปริมาณต่ำสุดของการตรวจวัด และปริมาณต่ำสุดของการวิเคราะห์

สร้างกราฟมาตรฐานโดยฉีดสารละลายมาตรฐานผสมที่ระดับความเข้มข้นต่ำที่ทำให้สัญญาณฟลักของสารชัดเจน จากความเข้มข้นน้อยไปมากทั้งหมด 5 ระดับ สำหรับใช้หาค่า LOD และ LOQ โดยใช้หลักการของ Miller และ Miller[35]

2.5.2 ความแม่นยำของเครื่องมือ

การหาความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันและระหว่างวัน สามารถทำได้โดยการเตรียมสารละลายมาตรฐานผสมที่ระดับความเข้มข้นหนึ่งเท่า สองเท่า และสามเท่าของความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้จากวิธีการในหัวข้อ 2.5.1 โดยการฉีดซ้ำ 5 ครั้งในหนึ่งวัน และระยะเวลาวันเว้นวันจำนวน 3 วัน นำข้อมูลที่ได้ มาคำนวณทางสถิติ เพื่อหาความแม่นยำของเครื่อง ดังสมการ (2.1) – (2.3)

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n} \quad \text{----- (2.1)}$$

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}} \quad \text{----- (2.2)}$$

$$\%RSD = \left(\frac{SD}{\bar{X}} \right) \times 100 \quad \text{----- (2.3)}$$

โดย n คือจำนวนข้อมูลที่นำมาคำนวณทั้งหมด
 X_i คือข้อมูลที่นำมาคำนวณ
 $\bar{X}$ คือค่าเฉลี่ย
 SD คือส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานในกลุ่มตัวอย่าง
 $\%RSD$ คือร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์

2.5.3 ร้อยละการกลับคืน

- ก. เติมสารมาตรฐานในสารละลายตัวอย่าง โดยให้สารมาตรฐานมีความเข้มข้นที่ระดับห้าเท่า และสิบเท่าของค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้
- ข. ทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารมาตรฐานที่เติมลงไป โดยใช้กราฟมาตรฐาน
- ค. คำนวณร้อยละกลับคืนของสารมาตรฐานที่เติมลงไป ดังสมการ 2.4

$$\% \text{Recovery} = \left(\frac{C_{\text{sample} + \text{added}} - C_{\text{sample}}}{C_{\text{added}}} \right) 100 \quad (2.4)$$

โดย

C_{sample} คือความเข้มข้นของสารมาตรฐานในตัวอย่าง

$C_{\text{sample} + \text{added}}$ คือความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน

C_{added} คือความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติมลงไปในการวิเคราะห์ตัวอย่าง

$\% \text{Recovery}$ คือร้อยละกลับคืนของสารมาตรฐานที่เติมลงไป

2.6 การสร้างกราฟมาตรฐาน

ฉีดสารละลายมาตรฐานผสม GA, GC, C, EGCG และ GCG ความเข้มข้นสองเท่า สี่เท่า หกเท่า แปดเท่า และหนึ่งร้อยเท่าของระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ จากนั้นทำกราฟมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกับพื้นที่ใต้พีค

2.7 สารประกอบฟีนอลิกในตัวอย่างชาโดยการใช้อิเล็กโตรสเปรย์ไอออนในเซนซ์ แมสสเปกโตรเมตรี

2.7.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมของพารามิเตอร์อิเล็กโตรสเปรย์ ไอออนในเซนซ์ แมสสเปกโตรเมตรี

ฉีดสารละลายมาตรฐานผสม GA, GC, C, EGCG และ GCG ความเข้มข้น 5.39, 1.96, 2.93, 4.56 และ 12.25 พีพีเอ็ม ตามลำดับเข้าสู่เครื่องโครมาโทกราฟของเหลวสมรรถนะสูงโดยใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการวิเคราะห์ และหาสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิคแมสสเปกโตรมิเตอร์ โดยการปรับความต่างศักย์ในการแตกตัวเป็นไอออน ความต่างศักย์ของแคปิลลารี ความดันของแก๊สที่ใช้ในการผลักของเหลวให้แตกตัวเป็นละอองแก๊ส อุณหภูมิของแก๊สที่ใช้ในการระเหยแห้ง และ อัตราการไหลของแก๊สที่ใช้ในการระเหยแห้ง ภายใต้อิทธิพลของสนามไฟฟ้าที่เป็นลบ พิจารณาสัญญาณพีคของสารที่เด่นชัดและสูงสุดที่ปรากฏในสเปกตรัม ในการวิเคราะห์แต่ละ

พารามิเตอร์ที่สนใจจะปรับเป็นค่าต่าง ๆ โดยให้พารามิเตอร์อื่น ๆ มีค่าคงที่ โดยปรับตั้งสภาวะของเครื่องมือ ดังตาราง 2.1

ตาราง 2.1 สภาวะต่าง ๆ ของเครื่องมือแมสสเปกโตรมิเตอร์ที่ใช้

พารามิเตอร์	สภาวะ
Fragmentor	100, 120 และ 150 V
Capillary voltage	3500, 4000 และ 4500 V
Nebulizer pressure	35, 40 และ 45 psi
Drying gas temperature	300, 330 และ 350 °C
Drying gas flow	8, 9 และ 10 L/min

2.7.2 สารประกอบฟีนอลิกในตัวอย่างชาเมี่ยงโดยอิเล็กโตรสเปรย์ไอออนในเซชันแมสสเปกโตรเมทรี

จากสภาวะที่เหมาะสมของอิเล็กโตรสเปรย์ไอออนในเซชัน แมสสเปกโตรเมทรี นำสารสกัดใบชาเมี่ยง และเมี่ยงหมักที่ระยะเวลาในการหมักต่าง ๆ วิเคราะห์ยืนยันผลที่พบสารประกอบฟีนอลิกชนิดต่าง ๆ ในตัวอย่าง

2.8 การวิเคราะห์สารตัวอย่าง

เตรียมสารสกัดตัวอย่างเจือจางด้วยเมทานอล และนำไปกรองผ่าน syringe membrane filter ขนาด 0.45 μm วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง จากนั้นคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในแต่ละตัวอย่าง