

บทที่ 3

ผลการทดลองและวิจารณ์

การทดลองนี้ได้ทำการศึกษาหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในใบชาเมี่ยง โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ที่มีความเหมาะสมที่ให้ความถูกต้อง แม่นยำสูง ซึ่งวิธีการดังกล่าวประกอบไปด้วย การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกและการตรวจวัด และการหาความถูกต้อง (accuracy) ความแม่นยำ (precision) ปริมาณต่ำสุดของการตรวจวัด (LOD) ปริมาณต่ำสุดของการวิเคราะห์ (LOQ) ของสารประกอบฟีนอลิก 5 ชนิดที่พบในใบชาเมี่ยง ได้แก่ กรดแกลลิก (GA) แกลโลคาเทชิน (GC) คาเทชิน (C) อีพิกัลโลคาเทชินแกลเลต (EGCG) และแกลโลคาเทชินแกลเลต (GCG) หลังจากนั้นจึงนำวิธีการวิเคราะห์นี้มาทดสอบหาปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกนี้ในตัวอย่างชาเมี่ยง ได้ผลการทดลองดังนี้

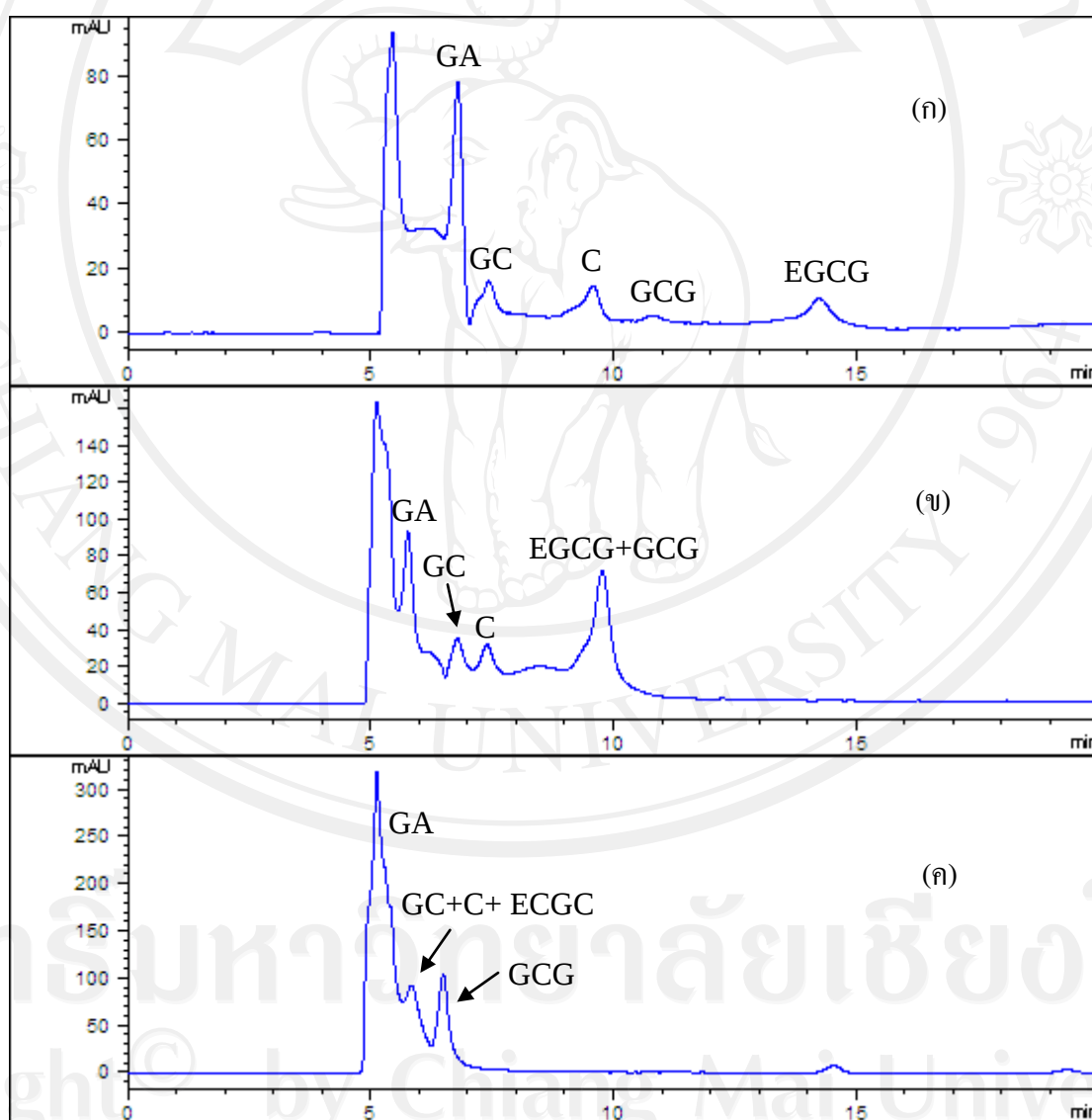
3.1 การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

ในการทดลองนี้ทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมที่ทำให้สามารถแยกวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิก 5 ชนิด ได้แก่ GA, GC, C, EGCG และ GCG ด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยพิจารณาจากชนิดของตัวทำละลายในการชะที่เหมาะสม อัตราส่วนผสมของตัวทำละลายสำหรับการชะที่เหมาะสม ความยาวคลื่นที่ใช้ในการวิเคราะห์ และอัตราการไหลของตัวทำละลายที่เหมาะสม โดยผลการทดลองมีดังนี้

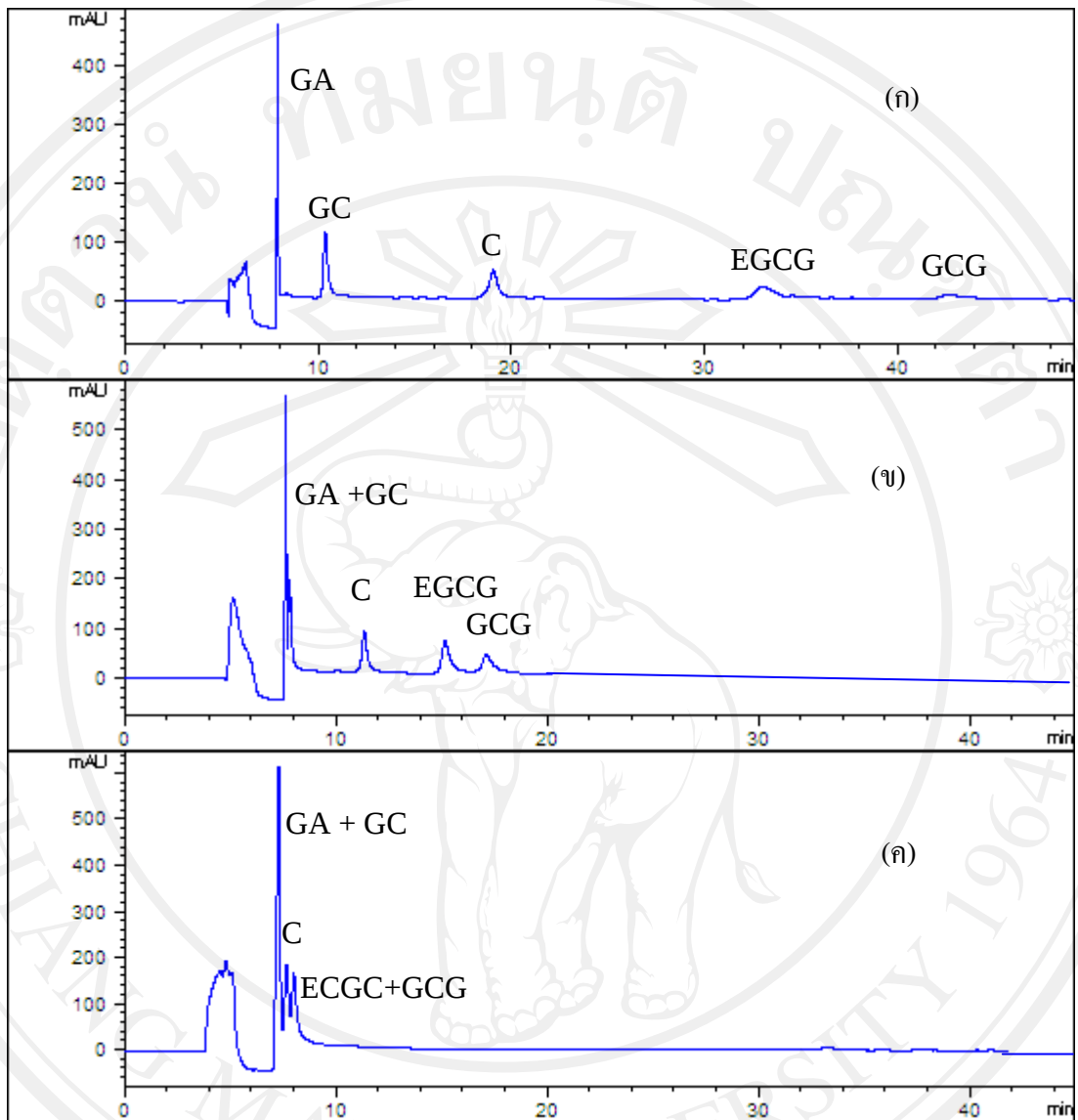
3.1.1 การหาชนิดของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม

เตรียมสารมาตรฐานผสมของ GA, GC, C, EGCG และ GCG ความเข้มข้น 2.15, 43.12, 29.28, 71.82, และ 61.25 ppm ตามลำดับ มาทำการศึกษาคัดส่วนเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม โดยฉีดสารมาตรฐานผสมเข้าเครื่อง HPLC ด้วยอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่เป็นแบบคงที่ (isocratic elution) โดยใช้คอลัมน์ VertiSep UPS C18, 5 μm (250 $\times$ 4.6 mm I.D.) เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วยสารละลายผสมของเมทานอลหรืออะซิโตนในไตรคลอโรเอทิลีน เนื่องจากสารมาตรฐานเป็นสารกลุ่มมีขั้วปานกลาง จึงต้องเติมเมทานอลหรืออะซิโตนในไตรคลอโรเอทิลีนด้วยเพื่อ

ปรับสภาพหัวของตัวหะ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร พบว่า พีคของสารมาตรฐานทั้ง 5 ชนิด แยกกันไม่ชัดเจนและบางพีครวมกัน เปรียบเทียบเฟสเคลื่อนที่ระหว่างเมทานอลกับอะซิโตนในไตรล์ เลือกเมทานอลเป็นเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม เนื่องจากระยะเวลาในการชะสารมาตรฐานออกมาแล้วแยกกันได้นั้นใช้ระยะเวลาในการชะน้อยกว่าเฟสเคลื่อนที่ของอะซิโตนในไตรล์ ดังรูป 3.1-3.2 จึงได้ทำการศึกษาอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่แบบโปรแกรมตัวทำละลาย (gradient elution) โดยกำหนดให้อัตราการไหลคงที่ 0.7 มิลลิลิตรต่อนาที แล้วทำการเปลี่ยนอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ ดังตาราง 3.1



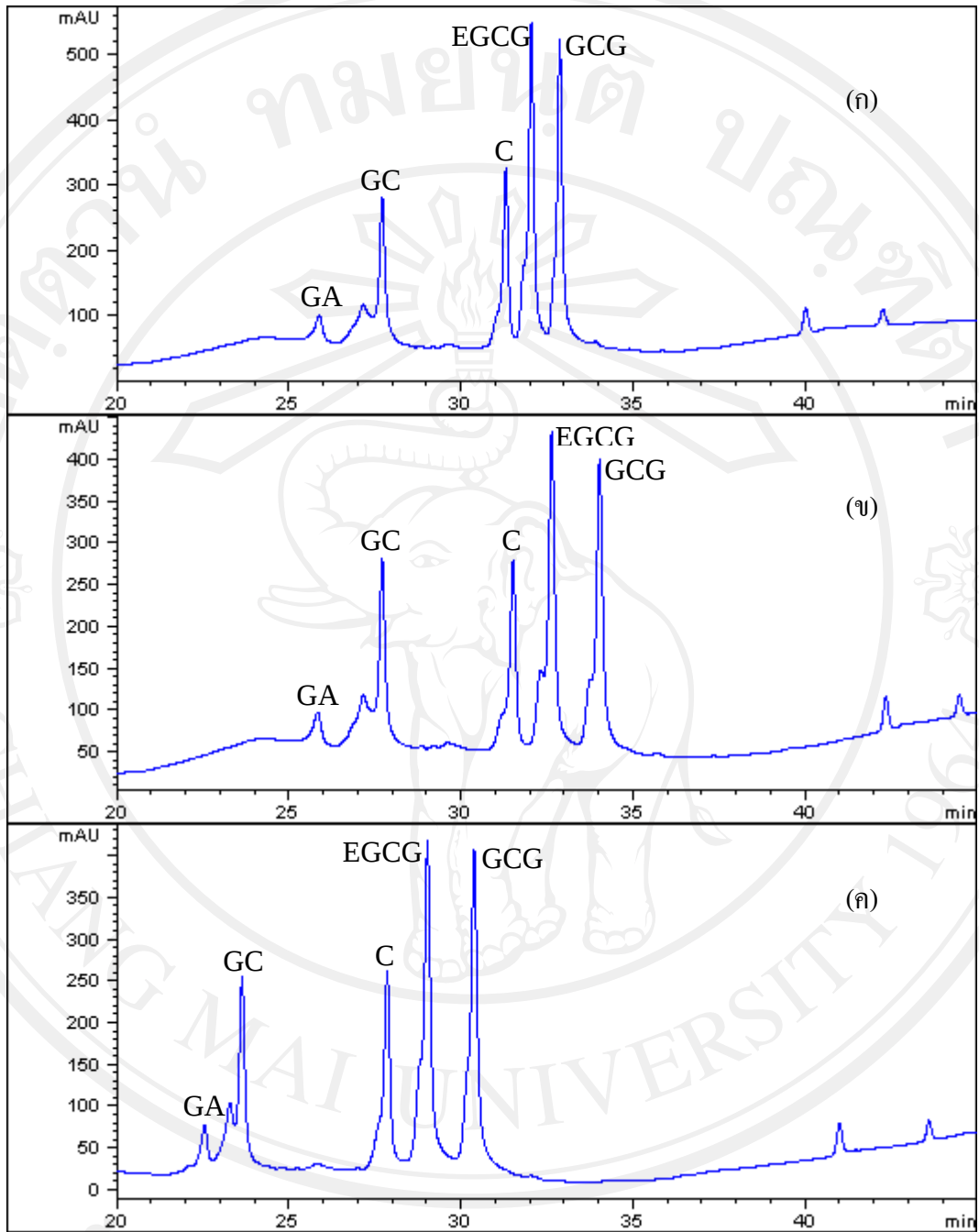
รูป 3.1 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานผสม GA, GC, C, EGCG และ GCG ที่เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วยเมทานอล:น้ำ ที่อัตราส่วน (ก) 40:60 (ข) 50:50 และ (ค) 60:40 (v/v)



รูป 3.2 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานผสม GA, GC, C, EGCG และ GCG ที่เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย อะซิโตนไนโตรล:น้ำ ที่อัตราส่วน (ก) 15:85 (ข) 20:80 และ (ค) 30:70 (v/v)

ตาราง 3.1 โปรแกรมตัวทำละลายในการหาสถานะของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม

สถานะที่	สัดส่วนเฟสเคลื่อนที่	
	เวลา (นาทีก)	% เมทานอล
1	0	10
	10	10
	20	40
	25	60
	40	95
2	0	10
	10	10
	20	40
	25	50
	40	95
3	0	3
	1	3
	21	50
	26	55
	40	95

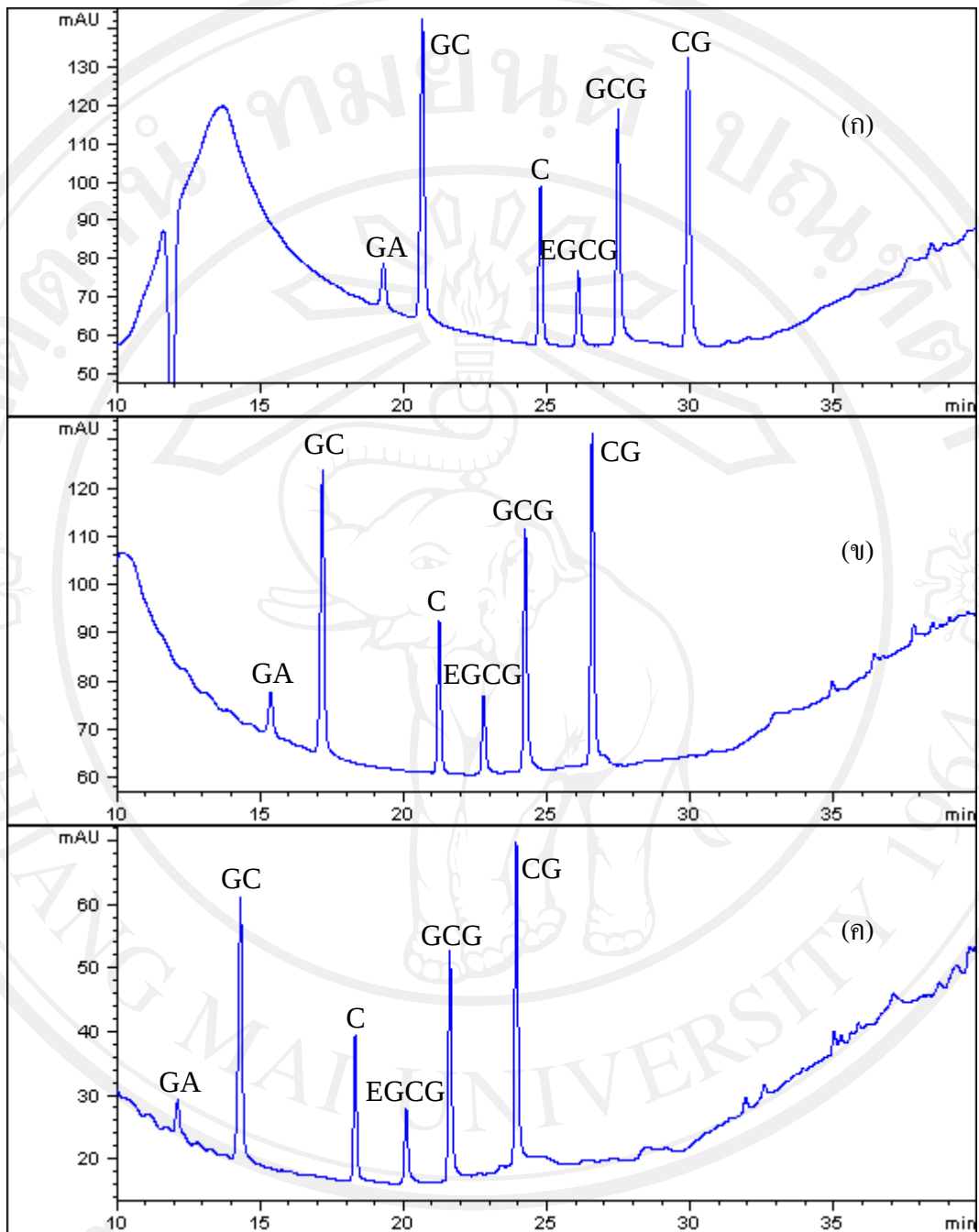


รูป 3.3 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานผสม GA, GC, C, EGCG และ GCG ที่ วิเคราะห์โดย
(ก) สภาวะที่ 1, (ข) สภาวะที่ 2 และ (ค) สภาวะที่ 3

จากการศึกษาโปรแกรมตัวทำละลายของเฟสเคลื่อนที่ ได้ผลการทดลองดังรูป 3.3 พบว่า ทั้ง 3 สภาวะมีค่าการแยกที่มากกว่า 1.5 โดยถือว่าการแยกได้ดี 100 % จึงพิจารณาเวลาที่ใช้การวิเคราะห์จะเห็นได้ว่าโปรแกรมตัวทำละลายที่สภาวะที่ 3 ใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อยที่สุด ดังนั้น สภาวะที่ 3 เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการทดลอง

3.1.2 การหาอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม

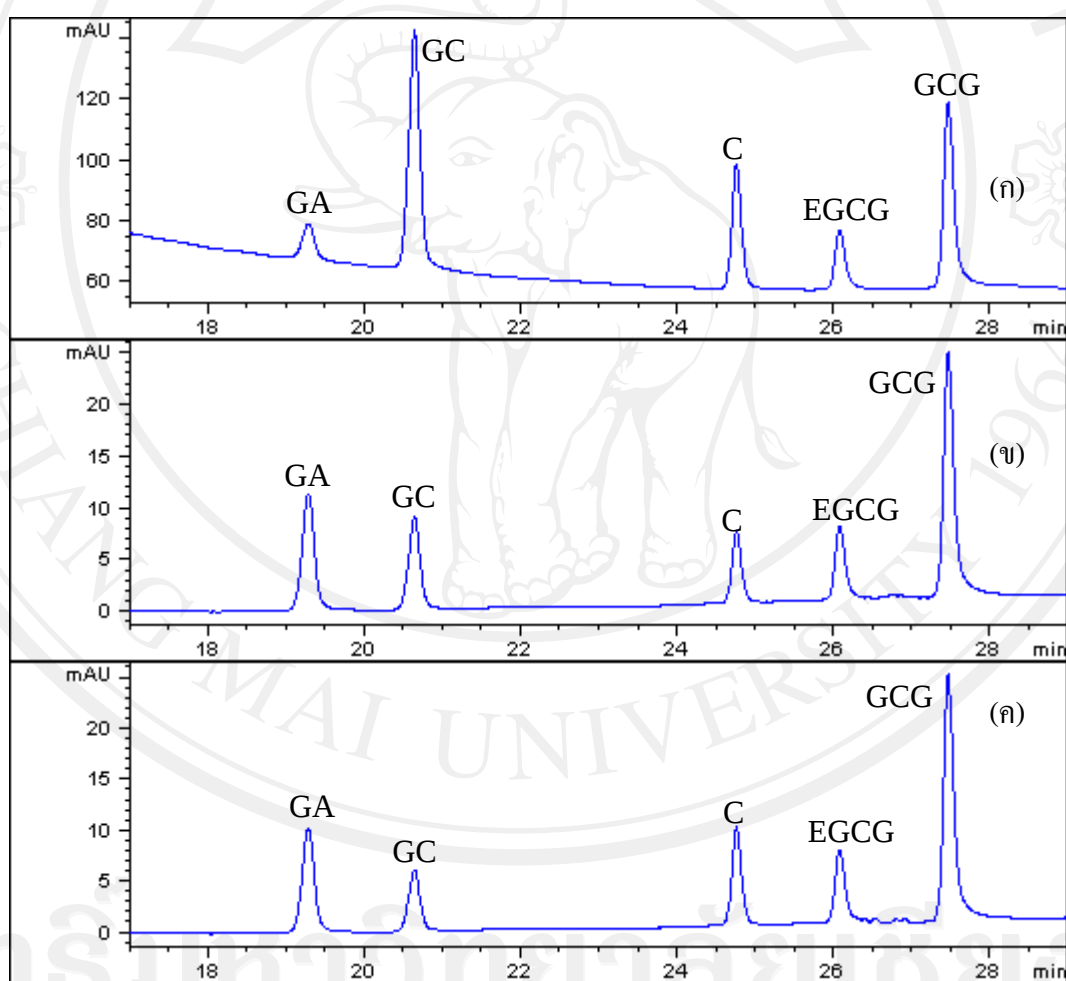
ทำการศึกษาผลของอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ต่อความสามารถในการแยกของสารที่ 0.5, 0.7 และ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที โดยทำการศึกษาว่าอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่มีผลต่อเวลาในการแยกสาร พบว่า อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที มีค่าการแยกมากกว่า 1 โดยที่ที่อัตราการไหล 0.7 และ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที พบว่าลักษณะเส้นฐาน (baseline) ช่วงสุดท้าย ยกขึ้น และอัตราการไหลที่ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที เหมาะสมกับการนำวิเคราะห์โดยเครื่อง แมสสเปกโตรมิเตอร์ ดังรูป 3.4



รูป 3.4 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานผสม GA, GC, C, EGCG, GCG และ CG ที่อัตราการไหล (ก) 0.5 mL/min, (ข) 0.7 mL/min และ (ค) 1.0 mL/min

3.1.3 การหาความยาวคลื่นในการตรวจวัด

ศึกษาความยาวคลื่นในการตรวจวัดต่อการตอบสนองต่อสัญญาณของสารมาตรฐาน ฟีนอลิก 3 ความยาวคลื่นคือ 230, 270 และ 280 นาโนเมตร จากการทดลองพบว่า การตอบสนองต่อสัญญาณของสารมาตรฐานฟีนอลิกที่ความยาวคลื่นทั้งสามซึ่งแสดงในค่าของพื้นที่ใต้พีค (ตาราง 3.2) พบว่าความยาวคลื่นในการตรวจวัดที่ 230 นาโนเมตร ให้พื้นที่ใต้พีคมากที่สุด ซึ่งบอกได้ว่าการตอบสนองต่อสัญญาณดีที่สุด ในการวิเคราะห์สารมาตรฐานทั้ง 5 ชนิด ดังนั้นจึงเลือกความยาวคลื่นที่ 230 นาโนเมตร ในการวิเคราะห์ แสดงดังรูป 3.5



รูป 3.5 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานผสม GA, GC, C, EGCG และ GCG ที่ความยาวคลื่น (ก) 230 นาโนเมตร, (ข) 270 นาโนเมตร และ (ค) 280 นาโนเมตร

ตาราง 3.2 พื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐาน 5 ชนิดเพื่อหาความยาวของคลื่นที่เหมาะสมในการวิเคราะห์

สารมาตรฐาน	พื้นที่ใต้พีค (mAU*s) ที่ความยาวคลื่น (nm)		
	230	270	280
กรดแกลลิก	122.3	121.9	110.0
แกลโลคาเทชิน	777.5	90.1	60.2
คาเทชิน	350.7	58.8	81.3
อีพิกัลโลคาเทชินแกลเลต	171.5	61.9	62.0
แกลโลคาเทชินแกลเลต	585.6	220.0	226.0

3.1.4 สรุปการหาสภาวะที่เหมาะสมในการหาปริมาณประกอบสารฟีนอลิกในสารสกัดจากใบชาเมี่ยงโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

การทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิก 5 ชนิด ได้แก่ GA, GC, C, EGCG และ GCG โดยศึกษาชนิดและอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ และความยาวคลื่นในการตรวจวัดต่อการตอบสนองต่อสัญญาณ ได้สภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการทดลองดังตาราง 3.3

3.2 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์

ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์สารประกอบประกอบฟีนอลิกบางชนิดในชาสดและชาหมักโดยใช้โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง-แมสสเปกโตรเมตรี จะศึกษาพารามิเตอร์ต่าง ๆ ได้แก่ ความถูกต้อง ความแม่นยำ ปริมาณต่ำสุดของการตรวจวัด ปริมาณต่ำสุดของการวิเคราะห์ และค่าร้อยละการกลับคืน

ตาราง 3.3 สรุปสภาวะที่เหมาะสมในการฉีดวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

พารามิเตอร์	สภาวะ
1. คอลัมน์	VertiSep UPS C18 HPLC ขนาด 4.0×250 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร
2. ประเภทของเครื่องตรวจวัด	Ultra-violet detector
3. ความยาวคลื่นที่ตรวจวัด	230 นาโนเมตร
3. ชนิดของเฟสเคลื่อนที่	เมทานอล : น้ำผสมกรดอะซิติก 0.05%
4. ปริมาตรของสารที่ฉีดเข้าเครื่อง	20 ไมโครลิตร
5. สัดส่วนเฟสเคลื่อนที่	เวลา (นาที) % เมทานอล
	0 3
	1 3
	21 50
	26 55
	40 95
6. อัตราการไหล	0.5 มิลลิตรต่อนาที

3.2.1 ปริมาณต่ำสุดของการตรวจวัด และปริมาณต่ำสุดของการวิเคราะห์

การหาขีดต่ำสุดของการวิเคราะห์และปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้คำนวณจากสมการการถดถอยเชิงเส้นของกราฟมาตรฐานโดยอ้างอิงจากวิธี Miller และ Miller[35] ทำได้โดยเจือจางสารละลายมาตรฐานผสม 5 ชนิด ได้แก่ GA, GC, C, EGCG และ GCG ให้อยู่ช่วงความเข้มข้น 0.1 ถึง 10 มิลลิกรัมต่อลิตรด้วยเมทานอล หลังจากนั้นนำสารละลายมาตรฐานที่เตรียมได้ไปฉีดวิเคราะห์ด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงภายใต้สภาวะที่เหมาะสม จากการทดลองเมื่อนำพื้นที่ใต้พีคแสดงดังตาราง 3.4 มาสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้พีค พบว่ากราฟมาตรฐานที่ได้มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r^2) มากกว่า 0.995 แสดงผลการหาขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดสารแต่ละชนิดได้ดังตารางที่ 3.5

ตาราง 3.4 พื้นที่ใต้พีคของสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในการหาปริมาณต่ำสุดของการตรวจวัด และความปริมาณต่ำสุดของการวิเคราะห์ (n=3)

GA		GC		C		EGCG		GCG	
ความเข้มข้น (ppm)	พื้นที่ใต้พีค เฉลี่ย (mAU*s)	ความเข้มข้น (ppm)	พื้นที่ใต้พีค เฉลี่ย (mAU*s)	ความเข้มข้น (ppm)	พื้นที่ใต้พีค เฉลี่ย (mAU*s)	ความเข้มข้น (ppm)	พื้นที่ใต้พีค เฉลี่ย (mAU*s)	ความเข้มข้น (ppm)	พื้นที่ใต้พีค เฉลี่ย (mAU*s)
2.10	48.5	0.88	63.6	0.79	61.8	1.54	50.8	2.94	116.0
3.15	95.0	1.32	113.5	1.19	106.0	2.31	97.6	4.41	233.0
4.20	135.8	1.63	150.4	1.58	145.8	3.08	143.0	5.88	334.6
5.26	167.6	2.21	202.7	1.98	184.9	3.85	184.1	7.35	455.4
6.31	204.5	2.65	256.0	2.37	214.5	4.62	222.9	8.82	543.4

ตาราง 3.5 สรุปค่าปริมาณต่ำสุดของการตรวจวัด และปริมาณต่ำสุดของการวิเคราะห์ของสารประกอบฟีนอลิก 5 ชนิด

สารมาตรฐาน	LOD (พีพีเอ็ม)	LOQ (พีพีเอ็ม)
GA	0.40	1.35
GC	0.11	0.37
C	0.15	0.49
EGCG	0.26	0.85
GCG	1.76	2.62

3.2.2 การศึกษาหาความแม่นยำของเครื่องมือ

การศึกษาหาความแม่นยำของเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์โดยการนำสารละลายมาตรฐานผสมที่มีสารมาตรฐาน GA, GC, C, EGCG และ GCG ที่มีระดับความเข้มข้นหนึ่งเท่า สองเท่า และสามเท่าของความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ฉีดเข้าเครื่อง โดยการฉีดซ้ำ 5 ครั้งใน 1 วัน ภายใต้สภาวะของเครื่อง HPLC-UV เดียวกัน เพื่อหาความสามารถในการวัดซ้ำ (repeatability) และหาความแม่นยำในการวัด เพื่อหาความสามารถในการประเมินซ้ำ (reproducibility) นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ตรวจสอบหาความแปรปรวนของวิธีการ จากการคำนวณพบว่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของพื้นที่ใต้พีคของสารมีค่าน้อยกว่าร้อยละ 5 แสดงว่าการวิเคราะห์มีความแม่นยำสูง (ดังตาราง 3.6 - 3.7)

ตาราง 3.6 การวิเคราะห์ซ้ำของพื้นที่ใต้พีคที่ใช้ในการวิเคราะห์ของเครื่องโครมาโทกราฟของเหลว
สมรรถนะสูงของสารมาตรฐาน

ครั้งที่	ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (ชุด 1)				
	พื้นที่ใต้พีค (mAU*s)				
	GA	GC	C	EGCG	GCG
1	25.3	5.0	32.4	25.0	95.4
2	23.9	5.6	34.6	24.6	95.6
3	24.7	5.6	32.0	23.2	95.4
4	24.8	5.3	31.6	23.2	95.3
5	24.4	5.4	32.9	24.5	95.3
ค่าเฉลี่ย	24.6	5.4	32.7	24.1	95.4
%RSD	2.04	4.63	3.62	3.64	0.14
ครั้งที่	ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (ชุด 2)				
	พื้นที่ใต้พีค (mAU*s)				
	GA	GC	C	EGCG	GCG
1	162.8	48.8	115.5	92.2	412.8
2	162.5	49.7	114.7	92.1	412.2
3	162.1	49.6	115.2	92.6	412.6
4	162.8	48.6	115.2	92.3	412.3
5	162.7	48.3	116.7	92.5	413.0
ค่าเฉลี่ย	162.6	49.0	115.5	92.3	412.6
%RSD	0.19	1.20	0.66	0.20	0.08
ครั้งที่	ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (ชุด 3)				
	พื้นที่ใต้พีค (mAU*s)				
	GA	GC	C	EGCG	GCG
1	311.6	67.4	190.4	148.9	813.7
2	311.1	67.4	190.7	148.8	813.7
3	313.0	67.7	190.1	148.9	813.4
4	310.3	67.9	190.7	148.3	813.9
5	310.6	67.5	190.4	148.2	813.0
ค่าเฉลี่ย	311.3	67.6	190.5	148.6	813.6
%RSD	0.34	0.30	0.12	0.21	0.04

ตาราง 3.7 การวิเคราะห์ซ้ำระหว่างวันของพื้นที่ได้ฟักที่ใช้ในการวิเคราะห์ของเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงของสารมาตรฐาน

ครั้งที่		ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (ชุด 1)				
		พื้นที่ใต้พีค (mAU*s)				
		GA	GC	C	EGCG	GCG
วันที่ 1	1	25.3	5.0	32.4	25.0	95.4
	2	23.9	5.6	34.6	24.6	95.6
	3	24.7	5.6	32.1	23.2	95.4
	4	24.8	5.3	31.6	23.2	95.3
	5	24.4	5.4	32.9	24.5	95.3
วันที่ 3	1	24.0	5.7	31.5	23.3	95.7
	2	24.4	5.7	36.6	23.7	95.0
	3	24.1	5.3	31.1	23.3	95.9
	4	24.8	5.7	32.9	22.5	95.9
	5	24.4	6.0	34.3	23.8	95.7
วันที่ 5	1	24.5	5.5	32.1	23.8	95.7
	2	24.4	5.3	32.9	23.3	95.6
	3	24.9	5.4	27.8	23.8	95.5
	4	24.4	5.2	27.5	23.4	95.6
	5	24.3	5.5	32.7	23.3	96.0
ค่าเฉลี่ย		24.5	5.5	32.2	23.7	95.6
%RSD		1.48	4.45	7.21	2.81	0.28

ตาราง 3.7 (ต่อ)

		ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (ชุด 2)				
ครั้งที่		พื้นที่ใต้พีค (mAU*s)				
		GA	GC	C	EGCG	GCG
วันที่ 1	1	162.8	48.8	115.5	92.2	412.8
	2	162.5	49.7	114.7	92.1	412.2
	3	162.1	49.6	115.2	92.6	412.6
	4	162.8	48.6	115.2	92.3	412.3
	5	162.7	48.3	116.7	92.5	413.0
วันที่ 3	1	162.5	48.6	115.4	92.8	412.9
	2	163.3	48.9	115.2	93.0	412.9
	3	162.3	47.1	116.7	92.8	413.1
	4	162.9	48.5	115.1	92.1	412.6
	5	162.2	48.8	114.2	92.9	412.8
วันที่ 5	1	162.2	49.2	115.3	93.0	421.2
	2	162.3	48.9	115.0	91.7	405.5
	3	162.2	48.6	115.2	92.2	448.2
	4	162.8	48.9	115.1	91.1	446.7
	5	162.1	48.1	115.5	94.0	475.8
ค่าเฉลี่ย		162.5	48.7	115.33	92.5	421.6
%RSD		0.22	1.26	0.57	0.71	4.62

ตาราง 3.7 (ต่อ)

		ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (ชุด 3)				
ครั้งที่		พื้นที่ใต้พีค (mAU*s)				
		GA	GC	C	EGCG	GCG
วันที่ 1	1	311.6	67.4	190.4	148.9	813.7
	2	311.1	67.4	190.67	148.8	813.7
	3	313.0	67.7	190.1	148.9	813.4
	4	310.3	67.9	190.7	148.3	813.9
	5	310.6	67.5	190.4	148.2	813.1
วันที่ 3	1	311.3	67.1	190.5	148.3	813.2
	2	311.5	68.7	190.3	148.2	813.5
	3	311.4	67.5	190.9	148.7	813.9
	4	311.1	67.7	190.2	148.1	813.1
	5	311.9	67.7	190.7	148.9	813.2
วันที่ 5	1	311.8	67.7	190.3	148.1	813.4
	2	311.4	67.0	190.4	148.5	813.4
	3	311.4	67.8	190.0	148.6	813.7
	4	312.0	67.2	190.7	148.7	813.7
	5	311.7	67.4	190.6	148.8	813.5
ค่าเฉลี่ย		311.5	67.6	190.5	148.5	813.5
%RSD		0.20	0.59	0.13	0.20	0.03

3.2.3 การศึกษาหรรยละการกลับคืน

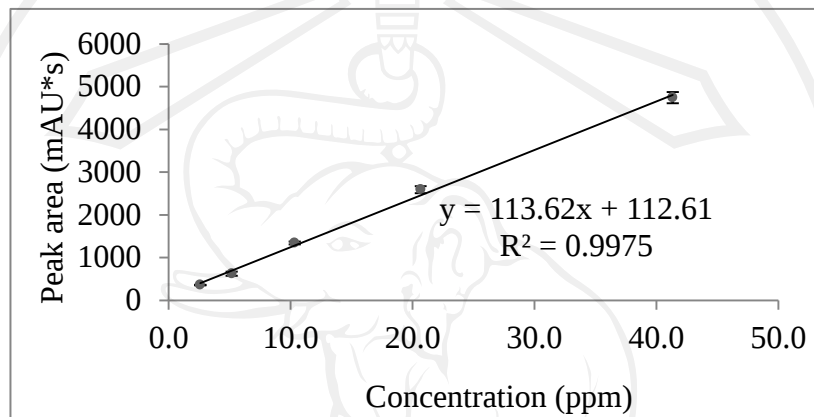
การหาหรรยละการกลับคืนเป็นการตรวจสอบความถูกต้องของการวิเคราะห์ โดยทำการเติมละลายสารมาตรฐานฟีนอลิกทั้ง 5 ชนิด ให้มีความเข้มข้นที่ 5LOQ และ 10LOQ ในสารสกัดตัวอย่าง จากนั้นนำไปฉีดเข้าเครื่องโครมาโทกราฟของเหลวสมรรถนะสูง โดยทำการฉีดซ้ำ 3 ครั้ง นำพื้นที่ใต้พีกที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานและหาค่าหรรยละการกลับคืนแสดงดังตาราง 3.8 จากผลการทดลองเพื่อบอกความแม่นยำ ของผลวิเคราะห์ที่ได้ ถ้าให้ค่าหรรยละการกลับคืนเข้าใกล้ 100 แสดงว่ามีความแม่นยำ ในการทดลองได้ค่าหรรยละการกลับคืนของ GA, GC, C, EGCG และ GCG อยู่ในช่วงหรรยละ 88, 90-96, 83-91, 102-103 และ 96-107 ตามลำดับ

ตาราง 3.8 หรรยละการกลับคืนของสารประกอบฟีนอลิก 5 ชนิด เมื่อทำการสกัดตัวอย่างใบชาสดที่เติมสารประกอบฟีนอลิกที่ระดับความเข้มข้น 5LOQ และ 10LOQ โดยการวิเคราะห์โดยเครื่องโครมาโทกราฟของเหลวสมรรถนะสูงในสภาวะการทดลองที่เหมาะสม

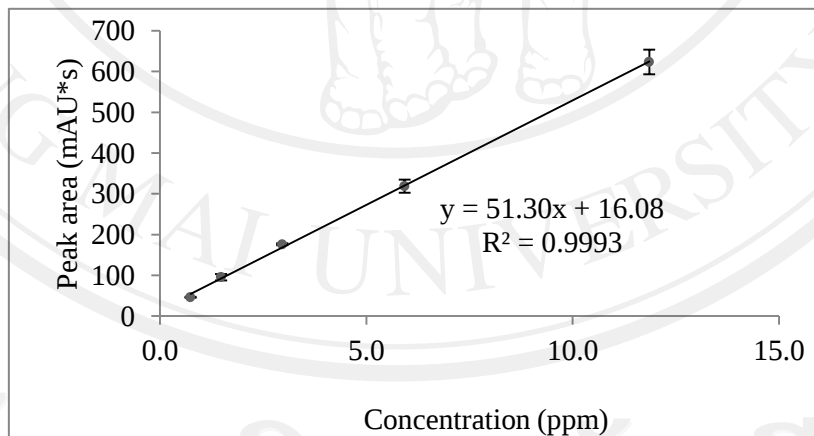
ชนิดของ ตัวอย่าง	หรรยละการกลับคืน				
	GA	GC	C	EGCG	GCG
TFAprilN (5LOQ)	88	96	91	103	107
TFAprilN (10LOQ)	88	90	83	102	96

3.3 การสร้างกราฟมาตรฐาน

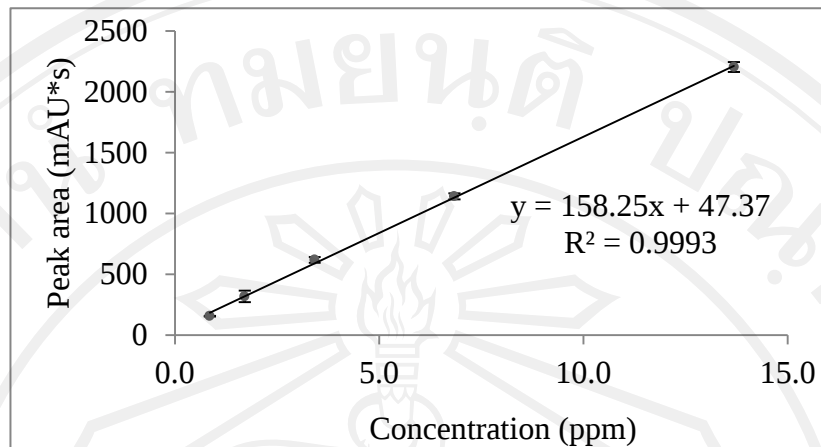
เตรียมสารละลายมาตรฐานผสม GA, GC, C, EGCG และ GCG ความเข้มข้น 5 ระดับจากน้อยไปมาก นำไปฉีดเข้าเครื่องโครมาโทกราฟของเหลวสมรรถนะสูงโดยทำซ้ำ 3 ครั้ง นำสัญญาณที่ได้โครมาโทแกรมสร้างกราฟมาตรฐาน ดังรูป 3.6-3.10 ค่าที่ได้จากกราฟมาตรฐาน ได้แก่ ช่วงความเป็นเส้นตรง และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) พบว่ากราฟมาตรฐานทุกสารที่ได้มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์มากกว่า 0.995



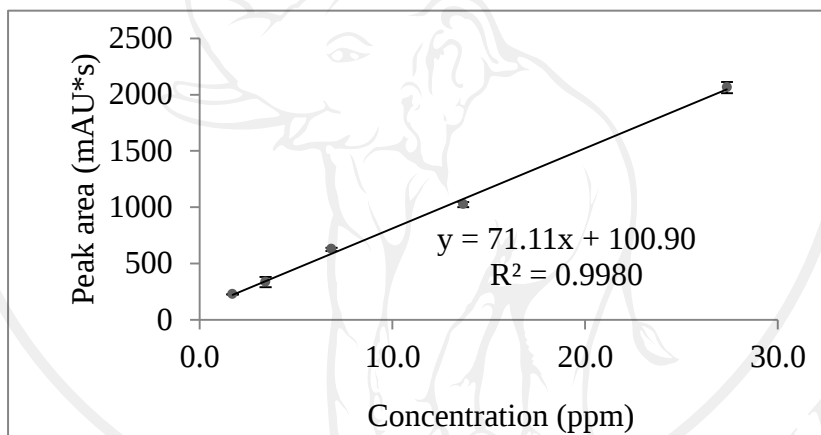
รูป 3.6 กราฟมาตรฐานของสารละลาย GA สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณ



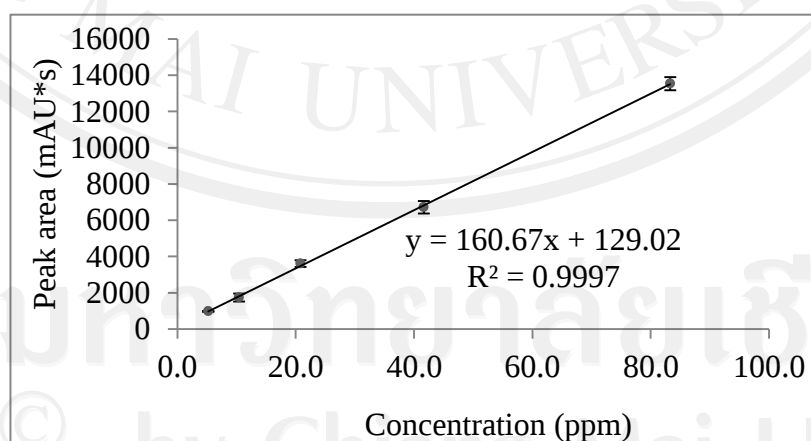
รูป 3.7 กราฟมาตรฐานของสารละลาย GC สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณ



รูป 3.8 กราฟมาตรฐานของสารละลาย C สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณ



รูป 3.9 กราฟมาตรฐานของสารละลาย EGCG สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณ



รูป 3.10 กราฟมาตรฐานของสารละลาย GCG สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณ

3.4 สารประกอบฟีนอลิกในตัวอย่างชาโดยการใช้อิเล็กโตรสเปรย์ไอออนในเซชันแมสสเปกโตรเมตรี

3.4.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมของพารามิเตอร์อิเล็กโตรสเปรย์ไอออนในเซชันแมสสเปกโตรเมตรี ในการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานฟีนอลิก

หาสภาวะที่เหมาะสมของพารามิเตอร์ ESI-MS ในการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานฟีนอลิกโดยการปรับค่าความต่างศักย์ในการแตกตัวเป็นไอออน (Fragmentor voltage) ความต่างศักย์ของแคปิลลารี (Capillary voltage) ความดันของแก๊สที่ใช้ในการพ่นของเหลวให้แตกตัวเป็นละอองแก๊ส (Nebulizer pressure) อุณหภูมิของแก๊สที่ใช้ในการระเหยแห้ง (Drying gas temperature) และ อัตราการไหลของแก๊สที่ใช้ในการระเหยแห้ง (Drying gas flow) โดยการฉีดสารละลายมาตรฐานฟีนอลิก 5 ชนิด ได้แก่ GA, GC, C, EGCG และ GCG ความเข้มข้น 5.39, 1.96, 2.93, 4.56 และ 12.25 พีพีเอ็ม ตามลำดับ และสังเกตสัญญาณฟีกของสารที่เด่นชัดและสูงสุดที่ปรากฏในสเปกตรัม ได้สภาวะต่าง ๆ ที่เหมาะสมดังนี้

ก) ความต่างศักย์ในการแตกตัวเป็นไอออน

Fragmentor voltage เป็นพารามิเตอร์ที่สำคัญชนิดแรกที่ต้องทำการหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อหารูปแบบการแตกตัวของไอออนโมเลกุล วิเคราะห์พารามิเตอร์ของ Fragmentor voltage ที่ 100, 120 และ 150 V โดยให้พารามิเตอร์อื่น ๆ มีค่าคงที่ โดยใช้สารมาตรฐานคาเทชินเป็นสารทดสอบได้ค่า ion counts ดังตาราง 3.9 พบว่า ที่ fragmentor voltage 100 V มีรูปแบบการแตกตัวที่บ่งชี้ได้ว่าเป็นสารมาตรฐานคาเทชินได้ดี และมีค่า ion count สูงที่สุด ดังนั้นที่ 100 V เป็นค่าที่เหมาะสมที่ใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

ตาราง 3.9 ค่า Ion count ของสารละลายมาตรฐานฟีนอลิก ณ Fragmentor voltage ต่าง ๆ ใน negative ionization mode

สารมาตรฐาน	Ion count ที่ fragmentor voltage (V)		
	100	120	150
GA	7200	5232	1884
GC	35152	41576	4449
C	43400	21608	7503
EGCG	8526	6015	3415
GCG	11804	9636	4353

ข) ความต่างศักย์ของแคปิลลารี

วิเคราะห์พารามิเตอร์ของความต่างศักย์ของแคปิลลารีที่ 3500, 4000 และ 4500 V โดยให้พารามิเตอร์อื่น ๆ มีค่าคงที่ ได้ผลการทดลองดังตาราง 3.10 จากการทดลองพบว่า ที่ capillary voltage 4500 V มีรูปแบบการแตกตัวที่บ่งชี้ได้ว่าเป็นสารมาตรฐานคาเทชินได้ดี และมีค่า ion count สูงที่สุด ดังนั้นที่ 4500 V เป็นค่าที่เหมาะสมที่ใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

ตาราง 3.10 ค่า Ion count ของสารละลายมาตรฐานฟีนอลิก ณ capillary voltage ต่าง ๆ ใน negative ionization mode

สารมาตรฐาน	Ion count ที่ capillary voltage (V)		
	3500	4000	4500
GA	4785	65335	5232
GC	24500	24472	41576
C	30368	30744	21508
EGCG	5990	8717	5015
GCG	13722	12579	9636

ค) ความดันของแก๊สที่ใช้ในการผลึกของเหลวให้แตกตัวเป็นละอองแก๊ส

nebulizer pressure ที่เหมาะสมทำให้ได้หยดละอองของไอออนในตัวทำละลายที่ละเอียด มีขนาดค่อนข้างสม่ำเสมอ nebulizer pressure จะควบคุมความดันของแก๊สในโครเจนซึ่งใช้เป็น nebulizer gas โดยจะขึ้นอยู่กับค่าอัตราการไหลของ HPLC องค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่

วิเคราะห์พารามิเตอร์ของ nebulizer pressure ที่ 35, 40 และ 45 psi โดยให้พารามิเตอร์อื่น ๆ มีค่าคงที่ได้ผลการทดลองดังตาราง 3.11 พบว่า nebulizer pressure ที่ 35 psi มีรูปแบบการแตกตัวที่บ่งชี้ได้ว่าเป็นสารมาตรฐานคาเทชินได้ดี และมีค่า ion count สูงที่สุด ดังนั้นที่ 35 psi เป็นค่าที่เหมาะสมที่ใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

ตาราง 3.11 ค่า Ion count ของสารละลายมาตรฐานฟีนอลิก ณ nebulizer pressure ต่าง ๆ ใน negative ionization mode

สารมาตรฐาน	Ion count ที่ nebulizer pressure (psi)		
	35	40	45
GA	5220	7553	5232
GC	20872	23944	41576
C	25440	29544	21608
EGCG	7301	7211	6015
GCG	10516	11528	9636

ง) อุณหภูมิของแก๊สที่ใช้ในการระเหยแห้ง

drying gas temperature ที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับองค์ประกอบและอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เมื่ออุณหภูมิและอัตราการไหลของแก๊สแห้งต่ำเกินไป อัตราการระเหยไปของตัวทำละลายต่ำด้วย ทำให้เกิด spikings บนโครมาโทแกรมที่ได้ แต่ถ้าอุณหภูมิสูงและอัตราการไหลของแก๊สแห้งพอเหมาะ อัตราการระเหยไปของตัวทำละลายจะพอดีจึงไม่เกิด spiking

วิเคราะห์พารามิเตอร์ของ drying gas temperature ที่ 300, 330 และ 350 °C โดยให้พารามิเตอร์อื่น ๆ มีค่าคงที่ได้ผลการทดลองตาราง 3.12 พบว่าอุณหภูมิของแก๊สที่ใช้ในการระเหยแห้ง ที่ 330°C มีรูปแบบการแตกตัวที่บ่งชี้ได้ว่าเป็นสารมาตรฐานคาเทชินได้ดี และมีค่า ion count สูงที่สุด ดังนั้นที่ 330°C เป็นค่าที่เหมาะสมที่ใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

ตาราง 3.12 ค่า Ion count ของสารละลายมาตรฐานฟีนอลิก ณ drying gas temperature ต่าง ๆ ใน negative ionization mode

สารมาตรฐาน	Ion count ที่ drying gas temperature (°C)		
	300	330	350
GA	4733	7553	6695
GC	17415	23944	19784
C	28488	29544	28586
EGCG	5117	7211	7514
GCG	7451	11528	9626

จ) อัตราการไหลของแก๊สที่ใช้ในการระเหยแห้ง

Drying gas flow rate เป็นพารามิเตอร์ที่ควบคุมอัตราการไหลของแก๊สในโตรเจนที่ทำหน้าที่เป็น drying gas ค่านี้ขึ้นอยู่กับอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ในการวิเคราะห์โดย HPLC โดยทั่วไปถ้าอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เร็ว ก็จำเป็นที่จะต้องให้อัตราการไหลของ drying gas สูงตาม

วิเคราะห์พารามิเตอร์ของ drying gas flow ที่ 8, 9 และ 10 L/min โดยให้พารามิเตอร์อื่น ๆ มีค่าคงที่ได้ผลการทดลองดังตาราง 3.13 พบว่า อัตราการไหลของแก๊สที่ใช้ในการระเหยแห้งที่ 10 L/min มีรูปแบบการแตกตัวที่บ่งชี้ได้ว่าเป็นสารมาตรฐานคาเทชินได้ดี และมีค่า ion count สูงที่สุด ดังนั้นที่ 10 L/min เป็นค่าที่เหมาะสมที่ใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

ตาราง 3.13 ค่า Ion count ของสารละลายมาตรฐานฟีนอลิก ณ drying gas flow ต่าง ๆ ใน negative ionization mode

สารมาตรฐาน	Ion count ที่ drying gas flow (L/min)		
	8	9	10
GA	50384	6788	7553
GC	54556	19120	23944
C	45735	30408	29544
EGCG	6255	5720	7211
GCG	9793	12739	11528

สรุปสภาวะที่เหมาะสมของ ESI-MS ในการวิเคราะห์สารมาตรฐานคาเทชินแสดงดัง

ตาราง 3.14

ตาราง 3.14 สรุปสภาวะที่เหมาะสมของการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานคาเทชินที่ได้จากวิเคราะห์โดย ESI-MS

พารามิเตอร์	สภาวะที่ใช้
Fragmentor	100 V
Capillary voltage	4500 V
Nebulizer pressure	35 psi
Drying gas temperature	330 °C
Drying gas flow	10 L/min

3.4.2 การวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกในตัวอย่างชาเมี่ยง โดยเทคนิค LC-ESI-MS

เก็บตัวอย่างชาเมี่ยงที่ปลูกและหมักเมี่ยงที่ตำบลเทพเสด็จ อ. ดอยสะเก็ด จ. เชียงใหม่ และแบ่งเป็นระยะเวลาในการหมักเมี่ยงทุก ๆ 15 วัน ตั้งแต่ 15-120 วัน นำตัวอย่างมากำหนดรหัสเพื่อเป็นการชี้บ่งรายละเอียดของตัวอย่างนั้น ๆ โดยรายละเอียดของตัวอย่างแสดงดังตาราง 3.15

ตาราง 3.15 รายละเอียดของตัวอย่างชาเมี่ยง

รหัสตัวอย่าง	รายละเอียดของชาเมี่ยง
TFAprilN/D	ชาเมี่ยงสดเก็บเมื่อวันที่ 24 พ.ค. 53
TS1hrN/D	ชาเมี่ยงหลังนึ่งเสร็จ 1 ชั่วโมง
TP15N/D	เมี่ยงหมัก 15 วัน
TP30N/D	เมี่ยงหมัก 30 วัน
TP45N/D	เมี่ยงหมัก 45 วัน
TP60N/D	เมี่ยงหมัก 60 วัน
TP75N/D	เมี่ยงหมัก 75 วัน
TP90N/D	เมี่ยงหมัก 90 วัน
TP105N/D	เมี่ยงหมัก 105 วัน
TP120N/D	เมี่ยงหมัก 120 วัน

หมายเหตุ : N = เมี่ยงที่ไม่ทำให้ชาเมี่ยงแห้งก่อนสกัด,

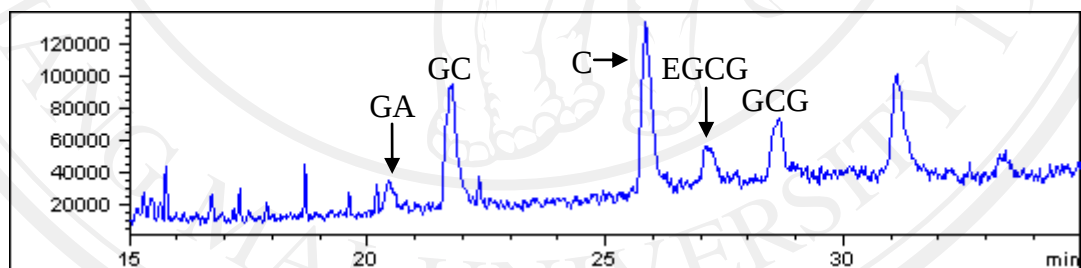
D = เมี่ยงที่ทำให้แห้งโดยวิธีการอบที่อุณหภูมิ 50°C ก่อน

นำมาสกัดการวิเคราะห์เชิงคุณภาพโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงได้อาศัยการเทียบเวลาที่สารเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์ระหว่างสารตัวอย่างกับสารมาตรฐานภายใต้สภาวะทดลองเดียวกันซึ่งมักจะเกิดข้อผิดพลาดได้ง่าย เพื่อแก้ไขปัญหานี้การทดลองนี้จึงได้นำเทคนิคอิเล็กโตรสเปรย์ไอออนเซชันแมสสเปกโตรเมทรี มาใช้ในการชี้บ่งโครงสร้างเคมีของสารที่วิเคราะห์โดยเทียบกับแมสสเปกตรัมของสารตัวอย่าง กับแมสสเปกตรัมของสารประกอบฟีนอลิกมาตรฐาน 5 ชนิด และได้ศึกษารูปแบบการแตกตัวของแมสสเปกตรัมของสารประกอบฟีนอลิกชนิดอื่น ๆ ที่พบในชาโดยอ้างอิงจากงานวิจัย [36, 37] หากรายละเอียดรูปแบบของแมสสเปกตรัมตรงกัน ก็เป็นไปได้ว่าสารนั้นเป็นสารเดียวกัน ทำให้เราสามารถยืนยันโครงสร้างทางเคมีของสารที่ต้องการวิเคราะห์ได้

สรุปข้อมูลแต่ละพีค และรายละเอียดแมสสเปกตรัมของสารประกอบฟีนอลิกมาตรฐานแต่ละชนิด ดังตาราง 3.16 แสดง total ion chromatogram (TIC) และแมสสเปกตรัมของสารประกอบฟีนอลิกมาตรฐานดังรูป 3.11-3.12 ตามลำดับ

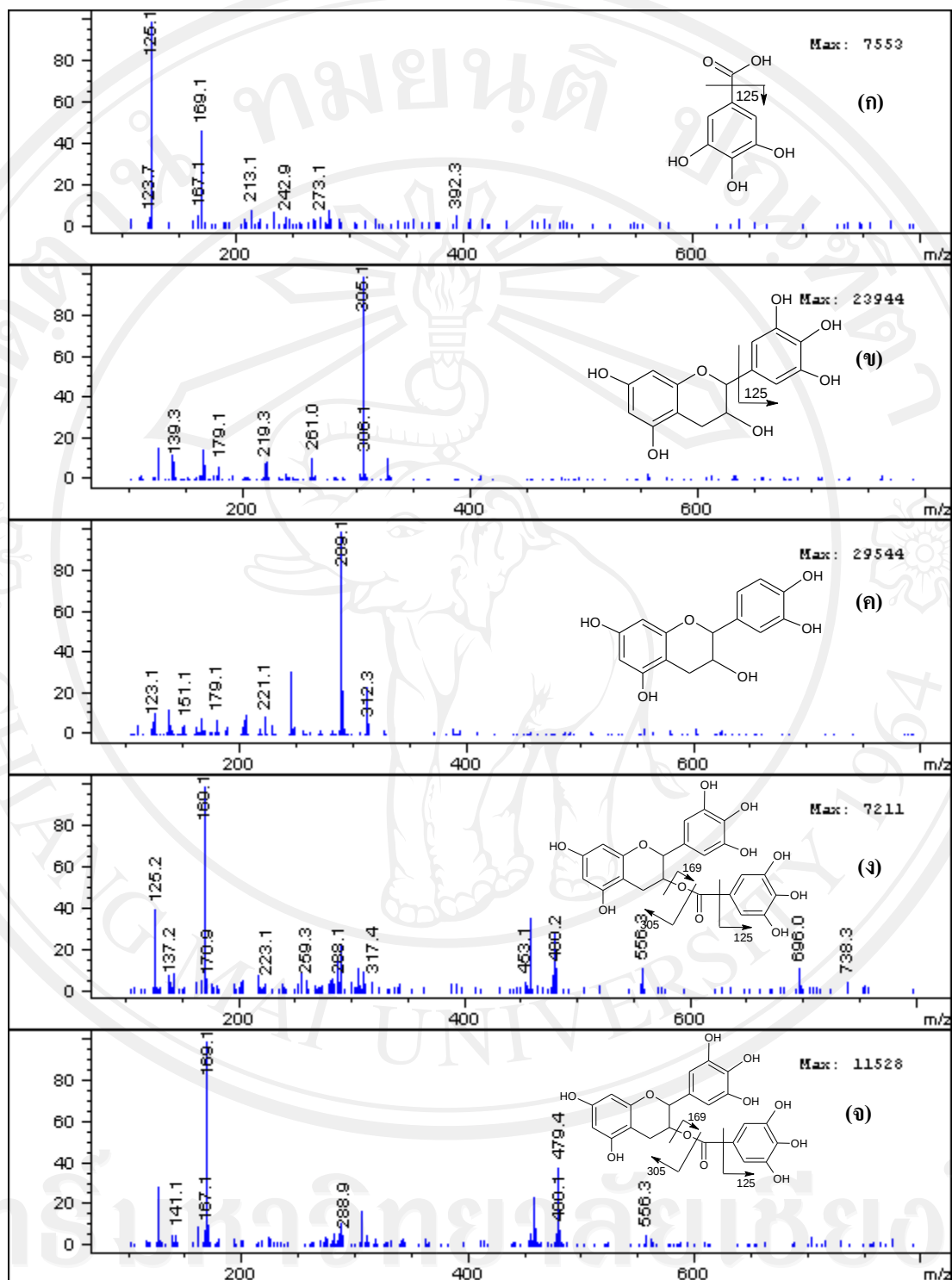
ตาราง 3.16 แมสสเปกตรัมที่ได้จากการแยกของสารประกอบฟีนอลิกมาตรฐานโดยเทคนิค LC-ESI-MS

Peak No.	t _R (min)	Mol.Wt.	Compound	m/z (%RA)
1	20.43	170	GA	125(100), 169(48)
2	21.76	306	GC	125(16), 305(100)
3	25.84	290	C	245(30), 289(100)
4	27.11	458	EGCG	125(40), 169(100), 305(12), 457(35)
5	28.65	458	GCG	125(29), 169(100), 305(17), 457(24)



รูป 3.11 Total ion chromatogram ของสารประกอบฟีนอลิกมาตรฐาน โดยใช้เทคนิค LC-ESI-MS

การวิเคราะห์หาสารประกอบฟีนอลิก 5 ชนิด ในตัวอย่างชาอัสสัมได้เลือกเอาตัวอย่างชาแบบไม่อบที่เป็นชาสด ชาหลังนึ่งเพื่อทำเมี่ยง และเมี่ยงหมักที่ระยะเวลา 15, 30, 60, 90 และ 120 วัน วิเคราะห์โดยเทคนิค LC-ESI-MS ที่สภาวะเหมาะสม การชี้บ่งพิก นอกจากจะพิจารณาจากเวลาการรีเทนชันของแต่ละพิกเทียบกับสารมาตรฐานแล้วยังพิจารณาแมสสเปกตรัมของแต่ละพิกของสารสกัดตัวอย่าง พบว่า ตัวอย่างชาสดมีกรดแกลลิกเป็นองค์ประกอบ แต่ไม่พบกรดแกลลิกในตัวอย่างชาหนึ่งก่อนการหมัก และชาเมี่ยงหมักที่ระยะเวลาต่าง ๆ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะในกระบวนการผลิตเมี่ยงการนึ่งชาเป็นเวลา 2 ชั่วโมงนี้ มีการใช้ความร้อนทำให้มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ polyphenol oxidase โดย polyphenol เกิดการสลายตัวด้วยความร้อนและจากการ oxidation ของเอนไซม์ ทำให้แกลลิกเปลี่ยนไปเป็นสารอื่น หรือมีปริมาณลดลง ส่วนสารประกอบฟีนอลิก 4 ชนิด ได้แก่ GC, C, EGCG และ GCG สามารถตรวจพบได้ในตัวอย่างทั้งชาสด ชาหนึ่งก่อนการหมัก และชาเมี่ยงหมักที่ระยะเวลาตั้งแต่ 15 – 120 วัน



รูป 3.12 Negative-ion ES mass spectra ของสารประกอบฟีนอลิกมาตรฐาน (ก) GA (ข) GC (ค) C

(ง) EGCG และ (จ) GCG

3.5 วิเคราะห์หาปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกบางชนิดในตัวอย่างชาเมี่ยง

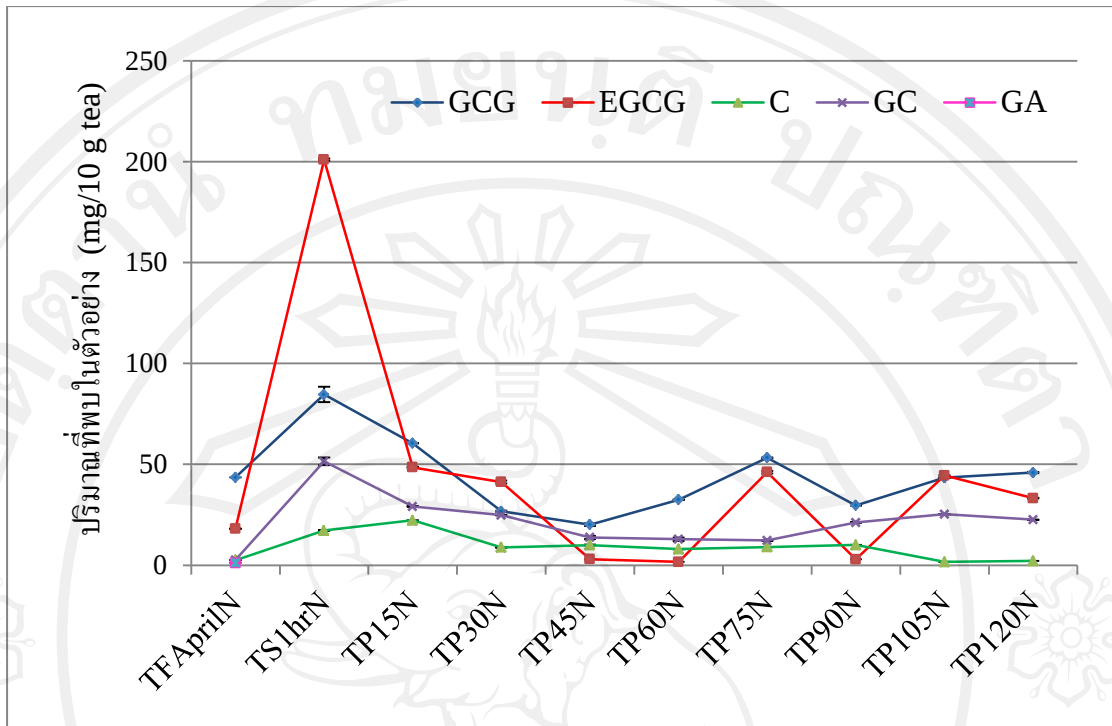
การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก 5 ชนิด ในสารสกัดตัวอย่าง โดยสกัดสารตัวอย่างที่บดละเอียดและทราบน้ำหนักที่แน่นอน 10 กรัม ด้วยตัวทำละลายเอทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร 100 มิลลิลิตร สกัดแบบ Soxhlet เป็นเวลา 120 นาที หลังจากนั้นระเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยระบบสุญญากาศแบบหมุน ได้สารสกัดที่มีลักษณะเหนียวหนืด สีน้ำตาลเข้ม มีกลิ่นของชา นำสารสกัดที่ได้ไปชั่งน้ำหนัก จากนั้นละลายแล้วปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตรด้วยเมทานอล วิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก โดยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยใช้สภาวะที่เหมาะสม ทำการฉีดวิเคราะห์ 3 ครั้งและบ่งชี้ โดยเทียบเวลาริเทนชันของแต่ละพีค หาปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้ง 5 ชนิดในสารสกัด ได้ผลดังตาราง 3.17 คือสารสกัดทั้ง 20 ตัวอย่าง วิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลิก 5 ชนิดด้วยเทคนิค HPLC พบ GA เฉพาะชาสดเท่านั้น ทั้งแบบไม่อบ และอบมีปริมาณ 1.14 ± 0.01 และ 2.62 ± 0.02 mg/10 g tea ตามลำดับ พบ GC มีปริมาณ 1.35 ± 0.01 ถึง 111.47 ± 0.22 mg/10 g tea, C 1.62 ± 0.01 ถึง 65.86 ± 0.32 mg/10 g tea, EGCG 2.92 ± 0.05 ถึง 225.98 ± 0.50 mg/10 g tea และ GCG 5.20 ± 0.04 ถึง 182.81 ± 0.39 mg/10 g tea

ในสารสกัดชาเมี่ยงแบบไม่อบ สารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิด มีปริมาณแตกต่างกันตามกรรมวิธีการผลิตเมี่ยง ตั้งแต่ชาสด ชาหลังนึ่ง และชาเมี่ยงหมักที่ระยะเวลา 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 และ 120 วัน แสดงผลการทดลองดังรูป 3.13 ซึ่งเป็นการเตรียมตัวอย่างชาในการสกัดโดยไม่อบ ใบก่อนจะเห็นว่า GC, EGCG และ GCG มีปริมาณมากที่สุด ในเมี่ยงหลังนึ่ง เมื่อทำเป็นเมี่ยงหมักที่ระยะเวลาต่าง ๆ ก็ทำให้มีปริมาณลดลง และสูงขึ้นไม่คงที่ กล่าวได้ว่า สภาวะการนึ่งชาในกรรมวิธีการผลิตเมี่ยงเป็นเวลา 2 ชั่วโมงนั้นทำให้ได้ปริมาณ GC, EGCG และ GCG เพิ่มขึ้น เนื่องจากอิทธิพลร่วมระหว่างอุณหภูมิและเวลาในกระบวนการนึ่งด้วยไอน้ำ ที่อาศัยความร้อนสูงไปทำให้เอนไซม์ polyphenol oxidase และ peroxidase ที่มีอยู่ในใบชาเสียหายทำให้ ไม่สามารถไปเปลี่ยนแปลงสารในกลุ่ม polyphenol ให้กลายเป็นสารเคมีชนิดอื่น ทำให้ใบชามีการคงอยู่ของปริมาณ GC, EGCG และ GCG อยู่สูง แต่หลังจากนำเมี่ยงที่นึ่งเสร็จแล้วเข้าสู่ขั้นตอนการหมักมียัง โดยการเก็บเมี่ยงหมักไว้ในน้ำเก็บไว้ในภาชนะที่ปิดสนิทเมื่อถึงระยะเวลาในการหมักไปเรื่อย ๆ จะทำให้สารประกอบฟีนอลิกที่มีในชาเสื่อมสภาพมีปริมาณลดลงหรือสารฟีนอลิกในใบชาถูกเปลี่ยนรูปไปเป็นสารพวก theaflavins และ thearubigins [38] ทำให้ได้เมี่ยงที่มีกลิ่นฉุน และใบชาแปรสภาพเป็นสีเหลืองเข้ม และจากผลการทดลอง C มีปริมาณมากที่สุดในชาเมี่ยงหมัก 15 วัน โดยจะเห็นว่าปริมาณที่ไม่แตกต่างกันมากนักในแต่ละตัวอย่าง

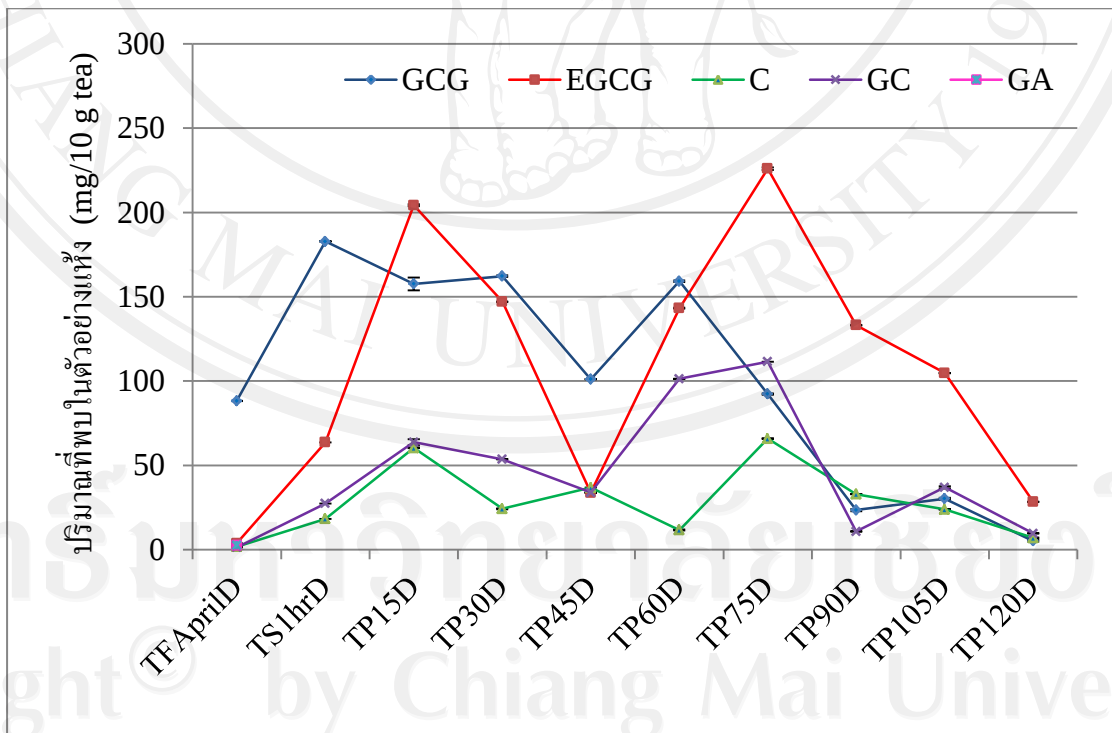
ตาราง 3.17 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก 5 ชนิด ที่พบในสารสกัดจากใบชาเมี่ยง (n=3)

ตัวอย่าง	ปริมาณที่พบในใบชาเมี่ยง (mg/10.00 g tea), mean±SD				
	กรดแกลลิก	แกลโลคาเทชิน	คาเทชิน	อีพิกัลโลคาเทชินแกลเลต	แกลโลคาเทชินแกลเลต
TFAprilN	1.14±0.01	2.61±0.06	2.51±0.01	18.10±0.01	43.55±0.04
TFAprilD	2.62±0.02	1.35±0.01	1.72±0.01	3.76±0.02	88.22±0.24
TS1hrN	nd	51.48±1.85	17.19±0.17	201.05±0.56	84.63±3.81
TS1hrD	nd	27.35±0.07	18.24±0.28	63.67±0.11	182.81±0.39
TP15N	nd	29.11±0.10	22.26±0.02	48.56±0.25	60.46±0.02
TP15D	nd	63.74±0.11	60.33±0.33	204.27±0.26	157.61±0.45
TP30N	nd	24.77±0.09	8.87±0.16	41.24±0.73	26.74±0.39
TP30D	nd	53.60±0.19	24.26±0.06	147.12±0.13	162.25±0.69
TP45N	nd	13.74±0.76	9.97±0.21	2.96±0.02	20.12±0.61
TP45D	nd	33.94±0.12	36.78±0.35	33.77±0.13	101.11±0.44
TP60N	nd	12.92±0.88	7.94±0.01	1.64±0.03	32.46±0.22
TP60D	nd	101.32±0.03	11.66±0.11	143.26±0.29	159.23±0.36
TP75N	nd	12.26±0.21	9.00±0.02	46.12±0.64	53.29±0.13
TP75D	nd	111.47±0.22	65.86±0.32	225.98±0.50	92.31±0.13
TP90N	nd	21.15±0.17	10.06±0.01	2.92±0.05	29.67±0.13
TP90D	nd	10.79±0.04	32.94±0.02	133.13±0.01	23.47±0.07
TP105N	nd	25.25±0.05	1.62±0.01	44.49±0.04	43.35±0.03
TP105D	nd	36.94±0.33	23.92±0.05	104.72±0.27	30.23±0.20
TP120N	nd	22.56±0.04	2.12±0.03	33.20±0.15	45.91±0.35
TP120D	nd	9.67±0.11	6.96±0.01	28.43±0.01	5.20±0.04

nd = not detected



รูป 3.13 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก 5 ชนิด ที่พบในสารสกัดจากใบชาเมืองที่ไม่อบ



รูป 3.14 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก 5 ชนิด ที่พบในสารสกัดจากใบชาเมืองที่อบ

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก 5 ชนิด ที่พบในสารสกัดจากใบชาเมี่ยงที่อบ แสดงดังรูป 3.14 จะเห็นได้ว่ามีความแตกต่างกับเมี่ยงที่มีการเตรียมตัวอย่างแบบไม่อบ คือ ได้เตรียมตัวอย่างชา ก่อนนำมาสกัด โดยการนำตัวอย่างชามาให้ความร้อนในตู้อบที่อุณหภูมิ 50°C ให้ความชื้นของ ตัวอย่างใบชาออกให้หมดได้ใบชาแห้ง จากการอบนั้นได้ค่าร้อยละความชื้นของใบชาสดและใบ เมี่ยงหลังนี้มีค่าเท่ากับร้อยละ 9-11 ขณะที่เมี่ยงหมักซึ่งมีน้ำไว้ในใบมากกว่าใบชาสดทำให้มี ความชื้นร้อยละ 18-20 แล้วนำใบชาแห้งที่ผ่านการอบแล้วมาสกัดหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ต่อไป ผลการทดลองที่ได้พบว่า การเพิ่มขึ้นและลดลงของปริมาณ GC, C, EGCG และ GCG นั้น ไม่คงที่ กล่าวคือ GC มีปริมาณเพิ่มขึ้นตั้งแต่ใบสด ใบชาหลังนี้ ถึงเมี่ยงหมัก 15 วัน จากนั้นลดลงที่ เมี่ยงหมัก 30 และ 45 วันตามลำดับ แล้วเพิ่มขึ้นที่เมี่ยงหมักเวลา 60 วัน และมากที่สุดที่ 75 วัน จากนั้นก็ลดต่ำลงที่เวลาในการหมัก 90, 105 และ 120 วัน ตามลำดับ เช่นเดียวกับ C ที่มีแนวโน้ม สูงขึ้นที่เมี่ยงหมัก 15 วัน จากนั้นลดลงเพิ่มขึ้นไม่คงที่ ที่เห็นได้ชัดคือ EGCG ที่มีปริมาณเริ่มต้นจาก ปริมาณต่ำ แล้วสูงขึ้นเรื่อย ๆ จนถึงเมี่ยงหมัก 15 วัน แล้วลดลงที่ระยะเวลาในการหมัก 30 และ 45 วัน แล้วเพิ่มขึ้นอีกที่ 60 วัน และมีปริมาณสูงสุดที่ระยะเวลาการหมัก 75 วัน จากนั้นก็ปริมาณก็ ลดลง ส่วน GCG นั้น เริ่มต้นจากใบสดที่มีปริมาณสูงกว่าสารประกอบฟีนอลิกชนิดอื่น ๆ แล้วมีการ ปริมาณเพิ่มขึ้นที่ใบชาหลังนี้ จากนั้นก็มีการลดลงที่เวลาในการหมัก 15 วัน เพิ่มขึ้นที่ระยะเวลาการ หมัก 30 วัน ลดลงที่ 45 วัน เพิ่มขึ้นที่ 60 วัน จากนั้นปริมาณก็ลดลงไปเรื่อย ๆ ตามระยะเวลาในการ หมัก

แนวโน้มของปริมาณสารประกอบฟีนอลิก 4 ชนิดที่ไม่คงที่อาจมีผลจากการที่อบใบชา ก่อนนำมาสกัด เนื่องจากขณะอบนั้นมีการสูญเสียความชื้น และอุณหภูมิของใบชาก่อนนำมาสกัด เนื่องจากการสูญเสียความชื้น และอุณหภูมิของใบชาระหว่างการอบ ซึ่งสัมพันธ์กับความชื้นที่ผิวใบ ชา อุณหภูมิสัมพัทธ์ของอากาศ การไหลเวียนอากาศ ความหนาแน่นของใบที่อบ และความร้อนที่ เกิดขึ้นระหว่างการอบทำให้แนวโน้มของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้ง 5 ชนิดไม่คงที่ ดังนั้นจึง ต้องมีการควบคุมอุณหภูมิของใบชาระหว่างการอบ ความหนาแน่นของใบที่อบ เพื่อจะคงคุณค่า ของสารประกอบฟีนอลิกได้ดี