บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัตถุดิบ

ตัวอย่างกาแฟปรุงสำเร็จสำหรับลดน้ำหนักที่จำหน่ายในเขตอำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก โดยสุ่มเก็บตัวอย่างจากร้านค้าในเขตอำเภอเมือง จำนวน 28 ตัวอย่าง

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องโครมาโตกราฟชนิดของเหลวประสิทธิภาพสูง (High Performance Liquid Chromatograph)(Agilent: 200 series, USA.) ประกอบด้วย Degasser, Quaternary pump, Auto sampler, DAD Detector คอลัมน์ : Prevail C_{18} (4.6 x 250 มิลลิเมตรอนุภาค 5 ไมโครเมตร) (Alltech, USA.)
2. เครื่องโครมาโตกราฟชนิดของเหลวประสิทธิภาพสูง (High Performance Liquid Chromatograph), (Agilent : 1100 series, USA.) ต่อคู่กับเครื่องวิเคราะห์ชนิดมวลโมเลกุลของสาร (PE SCIEX API 4000 triple quadrupole tandem mass Spectrometer, Applied Biosystem, CA)
3. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Perkin Elmer : Lamda 2 ความยาวคลื่น 517 nm
4. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter), (Multiseven Mettler Toledo, China)
5. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (analytical balance), (sartorius, USA.)
6. เครื่องเขย่ากลับไป-กลับมา (shaker) (Yamoto : S31, USA.)
7. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) (Memmert)
8. เครื่องผสมของเหลวแบบหมุนวน (Vortex mixer) (vortex genie 2, USA.)
9. Micro pipette ขนาด 10 - 100 และ100 - 1,000 ไมโครลิตร (RAININ, USA.)
10. ชุดกรอง mobile phase พร้อมกระดาษกรอง 0.45 ไมโครเมตร ชนิดไนลอน
11. Cellophane tubing Spectra/Pro membranes MWCO 12,000 -14,000 Spectrum Medical Inc., USA.
12. syringe พลาสติกขนาด 1 มิลลิลิตร
13. syringe filter 0.45 ไมโครเมตร ชนิดไนลอน
14. vial ขนาดปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร

15. ขวดวัดปริมาตร ขนาด 25, 50, 100, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร
16. กรวยกรอง
17. กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1
18. บีกเกอร์ขนาด 50, 100 และ1,000 มิลลิลิตร

3.3 สารเคมี

1. Methanol HPLC grade, (LAB-SCAN, Bangkok, Thailand),
2. Potassium dihydrogen phosphate KH_2PO (MERCK, Germany)
3. Caffeine (Fluka, Germany)
4. Zinc acetrate (BDH, England)
5. Potassium hexacyanoferate (II) trihydrate (MERCK, Germany)
6. 2-2 diphenyl-1-picylhydrazyl (DPPH) (Fluka, Germany)
7. Chlorogenic acid (SIGMA ALDRICH, USA)
8. Folin Ciocateu reagent (MERCK, Germany)
9. Sodium carbonate (Na_2CO_3) (Riedel – de Haen)
10. Standard gallic acid (SIGMA ALDRICH, USA)
11. Ortho-phosphoric acid (MERCK, Germany)
12. น้ำ DI (Deionized water)
13. Formic acid (MERCK, Germany)

3.4 วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษาปริมาณคาเฟอีนในตัวอย่างกาแฟปรุงสำเร็จสำหรับลดน้ำหนักที่จำหน่ายในเขตอำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก มีขั้นตอนดังนี้

3.4.1 ศึกษาวิธีที่เหมาะสมในการสกัดคาเฟอีน

นำตัวอย่างกาแฟปรุงสำเร็จสำหรับลดน้ำหนักที่สุ่มเก็บตัวอย่างจากร้านค้าในเขตอำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก จำนวน 1 ตัวอย่าง (ตัวอย่างได้มาจากการสุ่มตัวอย่างจาก 28 ตัวอย่าง) มาทำการเปรียบเทียบวิธีสกัด โดยศึกษาวิธีการสกัด 2 วิธี ดังนี้

3.4.1.1 การสกัดด้วยวิธี Dialysis

ตัดถุงเซลลูโลสเมมเบรนให้มีความยาว 15-20 เซนติเมตร นำไปแช่ในน้ำ deionized (DI) ประมาณ 1 นาที จากนั้นมัดปลายถุงด้านหนึ่งให้แน่นด้วยเชือก ใส่ตัวอย่างประมาณ 5 กรัม (ละลายด้วยน้ำ 20 มิลลิลิตร) รัดปากถุงด้วยเชือกให้แน่น เขย่าให้เข้ากัน ใส่ลงใน cylinder ขนาด 250 มิลลิลิตร เติม outer solution (DI) ประมาณ 120 มิลลิลิตร

ปิดปาก cylinder ด้วย parafilm ตั้งทิ้งไว้ค้างคืน แล้วจึงปรับปริมาตรด้วย outer solution (DI) จนครบ 200 มิลลิลิตรเขย่า จากนั้นนำเมมเบรนที่ใส่ตัวอย่างทิ้ง เขย่าอีกครั้งหนึ่ง กรองผ่าน membrane filter ขนาด0.45 ไมครอน เส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 13 มิลลิเมตร ด้วย clarification kit ลงในขวด vial นำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC (ประยุกต์ตามวิธี Nuengchamnong, N, (1998), ยุพา ฉันทปัญญารัตน์ และวีรพร แจ่มศรี, (2541)

3.4.1.2 การสกัดด้วยวิธีตกตะกอนโดย Carrez solution

ชั่งตัวอย่าง 5 กรัม ในบีกเกอร์ ขนาด 50 มิลลิลิตร ละลายด้วยน้ำร้อนจำนวน 20 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งให้เย็น ถ่ายตัวอย่างใส่ใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำ DI ประมาณ 40 มิลลิลิตร เติม Carrez I solution และ Carrez II solution อย่างละ 2 มิลลิลิตร (เพื่อตกตะกอนโปรตีนและสาร interfere substance อื่นๆ) ปรับปริมาตรสุดท้ายของตัวอย่างให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำ DI ตั้งทิ้งไว้ กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman N0.1 หลังจากนั้นนำสารสะลายที่ได้มากรองผ่าน membrane filter ขนาด 0.45 ไมครอน ชนิดไนลอนอีกครั้งลงในขวด vial นำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC (ประยุกต์ตามวิธี สุวรรณี ธีรภาพธรรมกุล และวีระพร แจ่มศรี, 2541)

3.4.1.3 การทดสอบความถูกต้องของวิธีการ

(1) การทดสอบความแม่น (Accuracy)

นำตัวอย่างกาแฟปรุงสำเร็จสำหรับลดน้ำหนักตามข้อ 3.4.1 มาทดสอบความแม่นยำโดยเติมสารละลายมาตรฐานคาเฟอีนลงในตัวอย่างให้มีความเข้มข้น 60 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผ่านขั้นตอนวิธีการเตรียมตัวอย่างตามข้อ 3.4.1.1 และ 3.3.1.2 แล้วนำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ทำการวิเคราะห์ 7 ซ้ำ คำนวณหาค่าร้อยละการกลับคืน (Recovery) ซึ่งควรอยู่ในช่วงร้อยละ 80 –110 (ทิพวรรณ นิ่งน้อย, 2549)

(2) การทดสอบความเที่ยง (Precision)

นำตัวอย่างกาแฟปรุงสำเร็จสำหรับลดน้ำหนักตามข้อ 3.4.1 มาทดสอบความเที่ยงโดยเติมสารละลายมาตรฐานคาเฟอีนลงในตัวอย่างให้มีความเข้มข้น 20 และ 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผ่านขั้นตอนวิธีการเตรียมตัวอย่างตามข้อ 3.4.1.1 และ 3.4.1.2 แล้วนำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ทำการวิเคราะห์ 7 ซ้ำภายในหนึ่งวัน (within day precision) และทำการวิเคราะห์ทุกวันเป็นเวลา 5 วัน (between day precision) รายงานผลในรูปของเปอร์เซ็นต์ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative Standard Deviation, %RSD) (ทิพวรรณ นิ่งน้อย, 2549)

(3) การวางแผนการทดลองทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวน โดยวิธี Student's t – test

3.4.2 การวิเคราะห์หาปริมาณคาเฟอีน

นำตัวอย่างกาแฟปรุงสำเร็จสำหรับลดน้ำหนักที่สุ่มเก็บตัวอย่างจากร้านค้าในเขตอำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก มาทำการสกัดคาเฟอีนด้วยวิธีที่เหมาะสมที่เลือกได้จากการทดลองข้อ 3.4.1 จากนั้นได้นำไปวิเคราะห์หาปริมาณคาเฟอีน โดยใช้เครื่อง HPLC

3.4.2.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานคาเฟอีน

เตรียม stock standard solution ของสารละลายมาตรฐานคาเฟอีน ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ชั่งสารมาตรฐานคาเฟอีน (MW 194.2) 100 มิลลิกรัม ในบีกเกอร์ ขนาด 50 มิลลิลิตร ละลายด้วยน้ำ DI ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร (น้ำหนักสารมาตรฐานคาเฟอีน คิดตามความบริสุทธิ์ เช่น สารมาตรฐานคาเฟอีน มีความบริสุทธิ์ 99.99 เปอร์เซ็นต์ ต้องชั่งน้ำหนัก 100 มิลลิกรัม) เก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส

การเตรียม working standard solution ของสารละลายมาตรฐานคาเฟอีน โดยปิเปต stock standard solution จำนวน 20, 40, 60, 80 และ100 ไมโครลิตร ลงใน vial ขนาด 1.5 มล. แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI จนครบ 1000 ไมโครลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานคาเฟอีนความ เข้มข้น 20, 40, 60, 80 และ100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

3.4.2.2 วิธีเตรียมสารละลายตัวพา (Mobile phase)

(1) เตรียมสารละลายตัวพา คือสารละลาย methanol โดยนำมากรองด้วยเครื่องกรองสารละลายผ่าน membrane filter ชนิด Nylon ขนาด 0.45 ไมโครเมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 47 มิลลิเมตร

(2) เตรียมสารละลายตัวพา phosphate buffer 0.025 M KH_2PO_4 ค่าความเป็นกรด-ด่าง 3.5 โดยชั่ง KH_2PO_4 3.4023 กรัม ในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร ละลายด้วยน้ำ DI ปริมาตร 900 มิลลิลิตร ปรับความเป็นกรด-ด่างด้วยสารละลายกรด phosphoric acid ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์จนได้ค่าความเป็นกรด-ด่าง 3.5 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI จนได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1000 มิลลิลิตร กรองด้วยเครื่องกรองสารละลายผ่าน membrane filter ชนิด Nylon ขนาด 0.45 ไมโครเมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 47 มิลลิเมตร

3.4.2.3 สภาวะของเครื่อง HPLC

คอลัมน์ : $\text{Prevail}C_{18}$ ความกว้างขนาด 4.6 ความยาว 150 มิลลิเมตร เส้นผ่าศูนย์ กลาง ขนาด 5 ไมโครเมตร

ปริมาตรการฉีด/ครั้ง: 20 ไมโครลิตร

สารละลายตัวพา : อัตราการไหล (flow rate) 1 มิลลิลิตรต่อนาที

เครื่องแปลผลยูวีที่ความยาวคลื่น 220 นาโนเมตร

เฟสเคลื่อนที่ Isocratic; methanol : phosphate buffer pH 3.5 อัตราส่วน 40:60

3.4.2.4 การวางแผนการทดลองทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) (Montgomery, 2001)

3.4.2.5 การคำนวณปริมาณคาเฟอีน

$$\text{ปริมาณคาเฟอีน (มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร)} = \frac{C \times V \times 1000}{W \times 10^{3}}$$

เมื่อ C = ปริมาณคาเฟอีน ที่ได้จากกราฟมาตรฐาน (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

V = dilution volume (มิลลิลิตร)

W = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

3.4.3 การวิเคราะห์ทางเคมี

3.4.3.1 การวิเคราะห์หาปริมาณกรดคลอโรจินิก โดยใช้ High Performanace Liquid Chomatograph (Agilent : 1100, USA.)เข้าเครื่อง Mass Spectrometer API 4000 Triple Quadrupole LC/MS/MS Mass Spectrometer

(1) วิธีเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดคลอโรจินิก

เตรียม stock standard solution ของสารละลายมาตรฐานกรดคลอโรจินิก ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ละลายกรดคลอโรจินิก 100 มิลลิกรัมในบีกเกอร์ด้วยน้ำ DI ปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร

การเตรียม working standard solution ของสารละลายมาตรฐานกรดคลอโรจินิก โดยปิเปต stock standard solution จำนวน 20, 40, 60, 80 และ100 ไมโครลิตร ลงใน vial ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI จนครบ 1000 ไมโครลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานกรดคลอโรจินิกที่มีความเข้มข้น 20, 40, 60, 80 และ100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

(2) สภาวะของเครื่อง LC-MS/MS

การกำหนดสภาวะของเครื่อง LC-MS/MS ดัดแปลงมาจากวิธีวิเคราะห์ของ Nuengchamnong, N *et al.* (2009)

คอลัมน์ : phenomenex Germini column ความกว้างขนาด 4.6 ความยาว 250 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 5 ไมโครเมตร

ปริมาตรการฉีด : 5 ไมโครลิตร

เฟสเคลื่อนที่ สาร A : กรดฟอร์มิค 1 มิลลิลิตร ในน้ำ DI 1,000 มิลลิลิตร สารละลาย B : methanol

เครื่องแปรผล Gradient, The MS parameters were operated in negative multiple reaction monitoring (MRM) สัดส่วนของสารละลายเฟสเคลื่อนที่ตามตาราง 2

ตาราง 2 สัดส่วนของสารละลายเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ในการแยกกรดคลอโรจินิก

เวลา (นาที)	อัตราการไหล (มิลลิลิตร/นาที)	% A (0.1% กรดฟอร์มิก)	% B (เมธานอล)
0	0.6	90.0	10.0
10	0.6	10.0	90.0
15	0.6	10.0	90.0
17	0.6	90.0	10.0
20	0.6	90.0	10.0

(3) การคำนวณปริมาณกรดคลอโรจิน

$$\text{ปริมาณกรดคลอโรจินิก (มิลลิกรัม/กิโลกรัม)} = \frac{C \times V}{W}$$

เมื่อ C = ปริมาณคาเฟอีน ที่ได้จากกราฟมาตรฐาน (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

V = dilution volume (มิลลิลิตร)

W = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

(4) การวางแผนการทดลองทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) (Montgomery, 2001).

3.4.3.2. การวิเคราะห์หาปริมาณกรดฟีนอลิก โดยวิธี Folin Ciocalteu

โดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Lambda 20 Perkin Elmer)

(1) การเตรียมตัวอย่าง

ชั่งตัวอย่างกาแฟปรุงสำเร็จรูปสำหรับลดน้ำหนักที่สุ่มเก็บตัวอย่างจากร้านค้าในเขตอำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลกจำนวน 3 กรัม (น้ำหนักแน่นอน) สกัดด้วยสารละลายเมทธานอลร้อยละ 70 จำนวน 10 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่านาน 20 นาที กรอง สกัดซ้ำอีกครั้งด้วยวิธีเดิม แล้วนำสารสกัดที่ได้มาปรับให้ได้ปริมาตร 25 มิลลิลิตรทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

(2) การทำ calibration curve ของ gallic acid

เตรียม stock standard solution ของสารละลายมาตรฐาน gallic acid ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ชั่ง gallic acid 100 มิลลิกรัมลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตรละลายด้วยเมทธานอล 70 เปอร์เซ็นต์และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร

1. การเตรียม working standard solution ของสารละลายมาตรฐาน gallic acid โดยปิเปต stock standard solution ให้ได้ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน gallic acid 0, 5, 10, 15, 20 และ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเตรียมดังตาราง 3 ดังนี้

ตาราง 3 แสดงการเตรียม calibration curve ของ gallic acid

ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	**ปริมาตรที่ปิเปต (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)**	**ปริมาตรสุดท้าย (มิลลิลิตร)**
0	0	25
5	125	25
10	250	25
15	375	25
20	500	25
30	750	25

2. เติมสารละลาย Folin Ciocateu Reagent (ที่เจือจาง 10 เท่าด้วยน้ำ DI) จำนวน 2.5 มิลลิลิตร

3. เติมสารละลาย Na_2CO_3 (75 กรัมต่อลิตร ในน้ำ DI) จำนวน 2.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมของเหลวแบบหมุนวน

4. นำสารละลายตัวอย่างแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

5. นำสารละลายตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสง (absorbance) ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 760 nm

(3) วิธีการวิเคราะห์ปริมาณกรดฟีนอลิกในตัวอย่าง

1. นำสารละลายตัวอย่างกาแฟปรุงสำเร็จรูปสำหรับลดน้ำหนักที่ได้จากข้อ (1) การเตรียมตัวอย่างจำนวน 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง

2. เติมสารละลาย Folin Ciocateu Reagent (ที่เจือจาง 10 เท่าด้วยน้ำ DI) จำนวน 2.5 มิลลิลิตร

3. เติมสารละลาย Na_2CO_3 (75 กรัมต่อลิตร ในน้ำ DI) จำนวน 2.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมของเหลวแบบหมุนวน

4. นำสารละลายตัวอย่างแช่ในอ่างน้ำควบคมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

5. นำสารละลายตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสง (absorbance) ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 760 nm ผลการตรวจวิเคราะห์ที่ได้แสดงเป็นค่า Total polyphenol เปรียบเทียบกับ gallic acid 1 กรัมใน 1 กิโลกรัมตัวอย่าง (gGA/kg) โดยคำนวณจาก calibration curve

ชั่งตัวอย่างกาแฟปรุงสำเร็จสำหรับควบคุมน้ำหนักจำนวน 3 กรัม

1. เติมสารละลายเมทธานอลร้อยละ 70 สกัด ปริมาณ 10 มิลลิลิตร
2. เขย่าด้วยเครื่องเขย่า 20 นาที
3. กรอง สกัดซ้ำอีกครั้ง

↓

สารละลายสกัด ปรับปริมาตร 25 มิลลิลิตร

1. ปิเปต 0.5 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลอง
2. เติมสารละลาย Folin Ciocateu Reagent จำนวน 2.5 มิลลิลิตร
3. เติมสารละลาย Na_2CO_3 จำนวน 2.0 มิลลิลิตร
4. ผสมให้เข้ากัน
5. นำสารละลายตัวอย่างแช่ในอ่างน้ำ 50 องศา 5 นาที

↓

วัดค่าด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 760 nm

ภาพ 6 ขั้นตอนการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

(4) การคำนวณปริมาณกรดฟีนอลิก

ผลการวิเคราะห์ที่ได้แสดงเป็นค่า Total polyphenol เปรียบเทียบกับ gallic acid 1 กรัมใน 1 กิโลกรัมตัวอย่าง (gGA/kg) โดยคำนวณจาก calibration curve ตามสมการ

$$\text{Total polyphenol eq. Gallic acid (gGA/kg)} = \frac{y - 0.0212 \times 1000}{10.934 \times a}$$

เมื่อ y = A-B

โดย A = ค่าดูดกลืนคลื่นแสง(absorbance) ที่วัดได้

B = ค่าดูดกลืนคลื่นแสง(absorbance) ของตัวควบคุม (control)

a = ความเข้มข้นของสารสกัด (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

** หมายเหตุ สารละลายควบคุม (control) ประกอบด้วยสารละลายเมทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 จำนวน 0.5 มิลลิลิตร สารละลาย Folin reagent จำนวน 2.5 มิลลิลิตร และสารละลาย Na_2CO_3 จำนวน 2.0 มิลลิลิตร

(5) การวางแผนการทดลองทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) (Montgomery, 2001)

3.4.3.3. การประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH assay

(1) การเตรียมตัวอย่าง

ชั่งตัวอย่างกาแฟสำเร็จรูปปรุงสำเร็จสำหรับลดน้ำหนักที่สุ่มเก็บตัวอย่างจากร้านค้าในเขตอำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลกจำนวน 5 กรัม ในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร ละลายในน้ำร้อนอุณหภูมิประมาณ 80 องศาเซลเซียส ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

(2) การประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

นำตัวอย่างไปวิเคราะห์การประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ตามวิธีที่ดัดแปลงจาก นิทรา เนื่องจำนงค์ และกรกนก อิงคนินันท์ (2548); นิทรา เนื่องจำนงค์ (2549) โดยปิเปตสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ จำนวน 2.9 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดสอบและนำสารละลายตัวอย่างที่ได้จากข้อ 3.4.3.3.1 จำนวน 0.1 มิลลิลิตร ให้ผสมกัน เขย่าและตั้งทิ้งไว้ในที่มืด ณ อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ นำสารละลายตัวอย่างที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์และวัดค่าตัวควบคุมโดยใช้สารละลายเมทานอลจำนวน 0.1 มิลลิลิตร แทนตัวอย่าง ทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ ประเมินฤทธิ์ของสารต้านอนุมูลอิสระเป็นร้อยละ โดยคำนวณได้จากสูตร

$$\text{ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (ร้อยละ)} = \frac{\text{(ค่าดูดกลืนแสงตัวควบคุม-ค่าดูดกลืนแสงตัวอย่าง)} \times 100}{\text{ค่าดูดกลืนแสงตัวควบคุม}}$$

(3) การวางแผนการทดลองทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (Completely Randomized Design,CRD) เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) (Montgomery, 2001)