

บทที่ 3

วิธีการวิจัย

กิจกรรมที่ 1 ศึกษาวิธีการแปรรูปและพัฒนาผลิตภัณฑ์กาแฟที่มีอัตลักษณ์ของพื้นที่สูง

1) ศึกษาวิธีแปรรูปและพัฒนาผลิตภัณฑ์กาแฟที่มีอัตลักษณ์เฉพาะบนพื้นที่สูง และมีศักยภาพทางการตลาด โดยเปรียบเทียบวิธีการแปรรูปแบบต่างๆ

กรรมวิธีที่ 1 แปรรูปแบบเปียก (ชุดควบคุม)

กรรมวิธีที่ 2 แปรรูปแบบกึ่งเปียก (ฮันนี่ ไม่ขัดเมือก)

กรรมวิธีที่ 3 แปรรูปแบบแห้ง (Dry process)

กรรมวิธีที่ 4 หมักด้วยยีสต์

2) วิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ และการชิม (Cup Testing) ตามมาตรฐาน Specialty Coffee Association (SCA)

3) ออกแบบและพัฒนาเป็นต้นแบบผลิตภัณฑ์การแปรรูปแบบต่างๆ

4) สรุปและวิเคราะห์ผลการศึกษา

กิจกรรมที่ 2 สำนวจศึกษาการผลิตและการแปรรูปชาอัสสัมที่มีอัตลักษณ์เฉพาะถิ่นบนพื้นที่สูง

1) สำนวจแหล่งปลูกและศึกษาลักษณะพันธุ์ชาอัสสัม ใน 4 พื้นที่ ได้แก่

(1) โครงการพัฒนาพื้นที่สูงแบบโครงการหลวงป่าแป๋

(2) พื้นที่โครงการพัฒนาพื้นที่สูงแบบโครงการหลวงปางมะโอ

(3) พื้นที่โครงการพัฒนาพื้นที่สูงแบบโครงการหลวงโหล่งขอด

(4) พื้นที่โครงการพัฒนาพื้นที่สูงแบบโครงการหลวงวาวี

2) ศึกษาวิธีการแปรรูปชาอัสสัมในพื้นที่ที่ทำการศึกษา

3) ศึกษาวิธีการจัดการสวนชาอัสสัมที่มีผลต่อการผลิตชาอัสสัมคุณภาพ

4) สรุปและวิเคราะห์ผลการศึกษา

กิจกรรมที่ 3 ศึกษาแนวทางการพัฒนาต่อยอดสำหรับสร้างมูลค่าเพิ่มทางเศรษฐกิจชาอัสสัมบนพื้นที่สูง พื้นที่เก็บตัวอย่าง:

1) บ้านปางมะกล้วย อ. แม่แตง จ. เชียงใหม่

2) บ้านปางมะโอ อ. เชียงดาว จ. เชียงใหม่

3) บ้านวาวี อ. แม่สรวย จ. เชียงราย

4) บ้านแม่สายป่าเมี่ยง อ. พร้าวก จ. เชียงใหม่

5) บ้านปางบง ต. เทพเสด็จ อ. ดอยสะเก็ด จ. เชียงใหม่

วิธีการดำเนินงาน:

1. ลงพื้นที่เพื่อเก็บใบชา โดยเลือกส่วนที่ผลิตเพื่อการบริโภคจริง โดยแยกศึกษาในต้นชาที่มีอายุมาก (อายุ > 50 ปี) และต้นชาที่มีอายุน้อย (อายุ < 50 ปี)

2. เก็บใบชาโดยแยกเป็น 2 ส่วน

1) ส่งตัวอย่างใบชาและก้านใบที่สมบูรณ์เพื่อใบจัดทำข้อมูลพืชสมุนไพร โดยเจ้าหน้าที่พฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยเก็บทั้งส่วนใบชา และส่วนก้านใบที่ยังสมบูรณ์

2) เก็บใบชาเพื่อการสกัดและวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ เคมี และชีวภาพ โดยเก็บที่ตำแหน่งยอด จำนวน 1 ยอด และใบ จำนวน 2 ใบ

3. ศึกษาลักษณะทางกายภาพของตัวอย่างใบชา เช่น สี-ความเข้มใบ โดยวัดขนาดของใบชาโดยเฉลี่ย

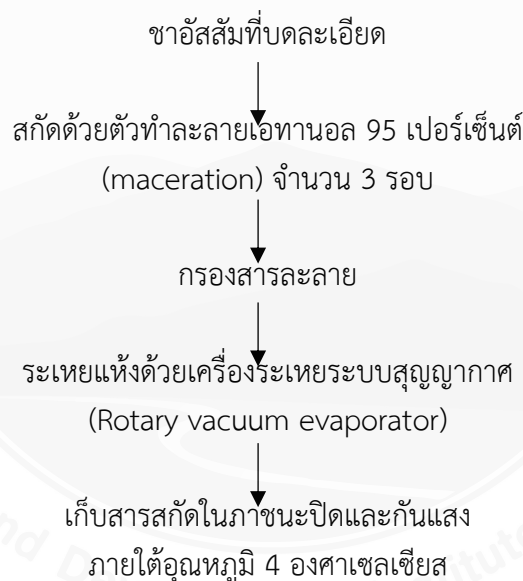
4. การสกัดใบชาและหาค่าร้อยละของสารสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์

1) การเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างใบชาอัสสัมมาล้างทำความสะอาด ผึ่งลมให้แห้ง แสดงลักษณะใบชาที่เก็บรวบรวมและล้างทำความสะอาด และนำไปอบที่อุณหภูมิ 45 °C นาน 6 ชั่วโมง หรือสุ่มมาชั่งน้ำหนักจนได้น้ำหนักแห้งคงที่ จากนั้นนำมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น ก่อนเข้าสู่กระบวนการสกัดในขั้นถัดไป

2) การเตรียมสารสกัด

นำตัวอย่างใบชาอัสสัมที่บดละเอียด มาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธีการหมัก (maceration) จำนวน 3 รอบ กรองสารละลาย จากนั้นนำไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยระบบสุญญากาศ (Rotary vacuum evaporator) เก็บสารสกัดในภาชนะปิดและกันแสง ภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำสารสกัดหยาบที่ได้ไปทำการวิเคราะห์ต่อไป



5. ศึกษาสมบัติทางเคมีและวิเคราะห์คุณภาพเบื้องต้นของสารสกัดชาอัสสัม ได้แก่

1) วิเคราะห์ปริมาณสารพอลิฟีนอลรวม (Total polyphenol) โดยทำปฏิกิริยากับสาร Folin-Ciocalteu และวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer

2) วิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญหลัก (major component) หรือสารออกฤทธิ์ (active component) โดยวิธี HPLC โดยศึกษาปริมาณสารสำคัญหลัก คือ

ศึกษาปริมาณสาร Catechin Epicatechin และ EGCG ในสารสกัดของชาเมี่ยงหมักด้วยวิธี Reverse phase HPLC

6. ศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาสำหรับใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ เช่น

1) ฤทธิ์ต้านจุลชีพที่เป็นตัวแทนของจุลินทรีย์ก่อโรคต่างๆ โดยทดสอบด้วยวิธี broth dilution เพื่อศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของสารในการยับยั้งการเจริญ (Minimum Inhibitory concentrations, MICs)

2) ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันหรืออนุมูลอิสระ (Antioxidant activity) โดยใช้วิธีการที่ศึกษาที่เหมาะสม เช่น ABTS assay, FRAP หรือ Lipid peroxidation assay

3) ศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยวิธีการ ABTS assay (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzo thiazoline-6-sulfonic acid)) free radical decolorization assay (Saenjum et al., 2010)

4) ศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยวิธีการ FRAP (Ferric reducing/antioxidant power) (Benzie and Strain, 1996)

5) ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งการเกิด Lipid peroxidation เทียบกับ ฤทธิ์ของสารมาตรฐาน โดยดัดแปลงตามวิธีของ Iwueke และคณะ (Iwueke et al., 2010)

6) ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนส (Collagenase enzyme inhibition) เพื่อประเมินความสามารถในการลดเลือนริ้วรอย (Anti-wrinkle)

7) ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Inhibition of tyrosinase enzyme activity) โดยการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ Tyrosinase ดัดแปลงตามวิธีของ Charles Fox (1995) โดยอาศัยหลักการวัด การดูดกลืนแสงของสารสกัดที่มีแอกติวิตีของเอนไซม์ไทโรซิเนสที่แยกจากเห็ดเป็นสารตั้งต้น เมื่อทำปฏิกิริยาใน หลอดทดลองแล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 nm และแปลผลของสารสกัดที่ทำให้แอกติวิตี ของเอนไซม์ไทโรซิเนสลดลง ประเมินฤทธิ์ของสารสกัดทดสอบต่อการทำให้ผิวขาว

8) ฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ α -amylase และ α -glucosidase ของสารสกัด (ฤทธิ์ลด/ ยับยั้งภาวะเมแทบอลิกซินโดรม ซึ่งมีความสัมพันธ์กับโรคเบาหวาน ไขมัน ความดัน)

9) ฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ α -amylase และ α -glucosidase ของน้ำมันโดย ดัดแปลง ตามวิธีการของ Oyedemi et al. (2017)

10) วิเคราะห์ α -glucosidase inhibition assay โดยเตรียมเอนไซม์ 1 หน่วย/มิลลิลิตร ของ α -glucosidase ใน 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0 $\pm$ 0.1) และทำปฏิกิริยากับสารสกัดทดสอบด้วย เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (negative control) ที่มีแต่บัฟเฟอร์แต่ไม่มีสารทดสอบ และทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วเติมสารตั้งต้น 5 mM p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside ที่เตรียมในบัฟเฟอร์ 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0 $\pm$ 0.1) แล้วทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร และวิเคราะห์ค่า %inhibition กิจกรรมเอนไซม์ที่ทดสอบด้วยสารสกัด โดยทดสอบที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และหา ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ได้ 50% (IC₅₀)

11) ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง กับกลไกการเกิดภาวะความดันสูง

7. จัดทำแนวทางการวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์จากชาอัสสัมที่มีอัตลักษณ์เฉพาะถิ่นสำหรับนำไปพัฒนาต่อ ยอดเป็นผลิตภัณฑ์ที่เหมาะสม เช่น อาหารสุขภาพ ผลิตภัณฑ์สมุนไพร และเครื่องสำอาง เป็นต้น