ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การอาหาร)

ปริญญา

วิทยาศาสตร์การอาหาร | วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร

สาขา | **ภาควิชา**

เรื่อง สารประกอบฟีนอลิกในใบมะกอกโอลีฟ (*Olea europaea* L.) และชาใบมะกอกโอลีฟ

Phenolic Compounds in Olive Leaves (*Olea europaea* L.) and Olive Leaf Tea

นามผู้วิจัย นางสาวนันทิชา สายสุทธิ์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(อาจารย์ศศิธร ตรงจิตภักดี, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์วรรณี จิรภาคย์กุล, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์วรรณี จิรภาคย์กุล, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... **เดือน** ..... **พ.ศ.** .....

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

สารประกอบฟีนอลิกในใบมะกอกโอลีฟ (*Olea europaea* L.) และชาใบมะกอกโอลีฟ

Phenolic Compounds in Olive Leaves (*Olea europaea* L.) and Olive Leaf Tea

โดย

นางสาวนันทิชา สายสุทธิ์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การอาหาร)
พ.ศ. 2555

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นันทิชา สายสุทธิ์ 2555: สารประกอบฟีนอลิกในใบมะกอกโอลีฟ (*Olea europaea* L.) และชาใบมะกอกโอลีฟ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การอาหาร) สาขาวิทยาศาสตร์การอาหาร ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อาจารย์ศศิธร ตรงจิตภักดี, Ph.D. 116 หน้า

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสารประกอบฟีนอลิกในใบมะกอกโอลีฟและชาใบมะกอกโอลีฟ โดยศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของตัวทำละลายต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และความสามารถต้านออกซิเดชัน (2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay) ในใบมะกอกโอลีฟ (*Olea europaea* L.) รวมทั้งศึกษาผลของสายพันธุ์ (Hojiblanca Arbequina Manzanillo และ Picual) และกระบวนการผลิตชา (ชาเขียวและชาดำ) ต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกชนิดหลัก สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และความสามารถต้านออกซิเดชัน จากผลการทดลองพบว่า เมื่อสกัดใบมะกอกโอลีฟสายพันธุ์ Hojiblanca ด้วยตัวทำละลายเอทานอลหรือเมทานอลที่ความเข้มข้น 40% 60% 80% และ 100% พบสารสกัด 80% เอทานอลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของ DPPH มากที่สุด ($p \leq 0.05$) นอกจากนั้นยังพบว่าใบมะกอกโอลีฟสายพันธุ์ Hojiblanca มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH มากที่สุด รองลงมาคือ Arbequina Manzanillo และ Picual ตามลำดับ ($p \leq 0.05$) อีกทั้งสายพันธุ์ยังมีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกชนิดหลักในใบมะกอกโอลีฟ โดยสายพันธุ์ Manzanillo มีปริมาณสาร oleuropein (3,709.3±105.6 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแห้ง 100 กรัม) และ luteolin 4′-glucoside (230.3±5.0 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแห้ง 100 กรัม) มากที่สุด สายพันธุ์ Manzanillo และ Arbequina มีปริมาณสาร luteolin 7-glucoside มากที่สุด (219.6±7.7 และ 210.0±1.9 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแห้ง 100 กรัม ตามลำดับ) และสายพันธุ์ Arbequina มีปริมาณสาร luteolin มากที่สุด (98.4±1.4 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแห้ง 100 กรัม) นอกจากนี้ยังพบว่ากระบวนการผลิตชาเขียวช่วยเพิ่มปริมาณสาร oleuropein luteolin 7-glucoside luteolin 4′-glucoside สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ ($p \leq 0.05$) และจากการศึกษาชาดำใบมะกอกโอลีฟที่หมักช่วงอุณหภูมิ 25-45^{O}ซ นาน 1-3 ชั่วโมง พบว่า ชาดำใบมะกอกโอลีฟที่หมักที่อุณหภูมิ 35 ^{O}ซ นาน 1 ชั่วโมง มีปริมาณสาร oleuropein luteolin 7-glucoside และ luteolin 4′-glucoside สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH มากที่สุด ($p \leq 0.05$) ในขณะที่ตรวจไม่พบสาร luteolin ทั้งในชาเขียวและชาดำใบมะกอกโอลีฟ

/ /

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Nunticha Saisut 2012: Phenolic Compounds in Olive Leaves (*Olea europaea* L.) and Olive Leaf Tea. Master of Science (Food Science), Major Field: Food Science, Department of Food Science and Technology. Thesis Advisor: Mrs. Sasitorn Tongchitpakdee, Ph.D. 116 pages.

The objective of this research was to study the phenolic compounds in olive leaves and olive leaves tea. The effect of extraction solvent and concentration of solvent on total phenolic content, total flavonoid content and antioxidant capacity (2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay) of olive leaves (*Olea europaea* L.). In additon, the effect of cultivars (cv. Hojiblanca, Arbequina, Manzanillo and Picual) and tea processing including green and black tea processes on major phenolic compounds, total phenolic content, total flavonoid content and antioxidant capacity. The extraction results of olive leaves (cv. Hojiblanca) with 40%, 60%, 80% and 100% (v/v) of ethanol or methanol showed that 80% ethanol extract had the highest total phenolic content, total flavonoid content and DPPH radical scavenging activity ($p \leq 0.05$). The results also showed that olive leaves cv. Hojiblanca had the highest total phenolic content, total flavonoid content and DPPH radical scavenging activity, followed by Arbequina, Manzanillo and Picual, respectively ($p \leq 0.05$). Cultivars also affected on major phenolic compounds in olive leaves. Olive leaves cv. Manzanillo had the highest oleuropein and luteolin 4′-glucoside contents (3,709.3±105.6 and 230.3±5.0 mg/100 g DW basis), cv. Manzanillo and Arbequina had the highest luteolin 7-glucoside content (219.6±7.7 and 210.0±1.9 mg/100 g DW basis, respectively) and cv. Arbequina had the highest luteolin content (98.4±1.4 mg/100 g DW basis). Furthermore, the results also showed that green tea making process could increase oleuropein, luteolin 7-glucoside and luteolin 4′-glucoside contents, total phenolic content, total flavonoid content and DPPH radical scavenging activity in olive leaf green tea ($p \leq 0.05$). In the study of olive leaf black tea processing, in which olive leaves were fermented at 25-35^{o}C for 1-3 hours, olive leaf black tea fermented at 35^{o}C for 1 hour had the highest oleuropein, luteolin 7-glucoside and luteolin 4′-glucoside contents, total phenolic content, total flavonoid content and DPPH radical scavenging activity ($p \leq 0.05$), whereas luteolin content could not be detected in olive leaf green and black tea.

_____ _____ ___ / ___ / ____

Student's signature Thesis Advisor's signature

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ศศิธร ตรงจิตภักดี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์วรรณี จิรภาคย์กุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษาในเรื่องการเรียน การค้นคว้างานวิจัย ตลอดจนตรวจสอบและแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์กนิฐพร วังใน ประธานการสอบปากเปล่าขั้นสุดท้าย และรองศาสตราจารย์ทนง ภัครัชพันธุ์ ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่กรุณาให้คำแนะนำในการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์มากขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่าน ที่ได้อบรมสั่งสอนและมอบความรู้อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการนำไปใช้ในอนาคตต่อไป และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหารทุกท่านที่ได้ให้ความช่วยเหลือและให้คำแนะนำต่างๆ ในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณอาจารย์ปราโมทย์ สฤษดิ์นิรันดร์ และเจ้าหน้าที่จากภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่ให้ความอนุเคราะห์ใบมะกอกโอลีฟสำหรับการทำวิจัยพร้อมทั้งความช่วยเหลือและการอำนวยความสะดวกในด้านต่างๆ

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อและคุณแม่ที่ได้ให้กำลังใจ คำปรึกษา และคอยสนับสนุนการศึกษาของข้าพเจ้าในทุกเรื่องให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ตลอดจน พี่ ๆ เพื่อน ๆ และน้อง ๆ ปริญญาโทและเอก สาขาวิทยาศาสตร์การอาหารทุกท่านที่ให้กำลังใจ คำปรึกษา และความช่วยเหลือในการทำวิจัยที่ดีเสมอมา

นันทิชา สายสุทธิ์

ตุลาคม 2555

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	32
อุปกรณ์	32
วิธีการ	35
ผลและวิจารณ์	44
สรุปและข้อเสนอแนะ	73
สรุป	73
ข้อเสนอแนะ	74
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	75
ภาคผนวก	85
ภาคผนวก ก การวิเคราะห์ทางเคมี	86
ภาคผนวก ข การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก	88
ภาคผนวก ค การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และสมบัติการต้านออกซิเดชัน	99
ภาคผนวก ง การคำนวณค่า Recovery rate ของวิธีการสกัดตัวอย่าง	105
ภาคผนวก จ ตัวอย่างใบมะกอกโอลีฟ	109
ภาคผนวก ฉ ภาพแสดงกระบวนการผลิตชาใบมะกอกโอลีฟ	111
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	116

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1 องค์ประกอบทางเคมีของใบมะกอกโอลีฟ (*Olea europaea* L. var Memecik) 4
2 อุณหภูมิและระยะเวลาที่ใช้ในขั้นตอนการทำแห้ง 25
3 สัดส่วนวัฏภาคเคลื่อนที่ในการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกด้วยเครื่อง HPLC 39
4 ระบบของเครื่องแมสสเปกโทรเมตรี 40

ตารางผนวกที่

ข1 ปริมาณสาร luteolin 7-glucoside ในชาดำใบมะกอกโอลีฟที่หมักที่อุณหภูมิและระยะเวลาที่แตกต่างกัน 89
ข2 ปริมาณสาร luteolin 4′-glucoside ในชาดำใบมะกอกโอลีฟที่หมักที่อุณหภูมิและระยะเวลาที่แตกต่างกัน 90
ข3 ปริมาณสาร oleuropein ในชาดำใบมะกอกโอลีฟที่หมักที่อุณหภูมิและระยะเวลาที่แตกต่างกัน 91
ค1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในชาดำใบมะกอกโอลีฟที่หมักที่อุณหภูมิและระยะเวลาที่แตกต่างกัน 100
ค2 ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในชาดำใบมะกอกโอลีฟที่หมักที่อุณหภูมิและระยะเวลาที่แตกต่างกัน 101
ค3 สมบัติการต้านอนุมูลอิสระของ DPPH ในชาดำใบมะกอกโอลีฟที่หมักที่อุณหภูมิและระยะเวลาที่แตกต่างกัน 102

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิกในใบมะกอกโอลีฟ	12
2	กระบวนการสังเคราะห์สารโอเลยูโรเปอินในมะกอกโอลีฟ	16
3	กระบวนการสังเคราะห์สารในกลุ่มฟลาโวนอยด์	18
4	โครงสร้างของอนุมูลอิสระ DPPH	22
5	ปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารฟีนอลในระหว่างการหมักชาดำ	29
6	ปฏิกิริยาการเกิดสีในระหว่างการหมักใบชาดำ	30
7	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในใบมะกอกโอลีฟสายพันธุ์ Hojiblanca ที่สกัดด้วยตัวทำละลายและความเข้มข้นที่แตกต่างกัน	45
8	ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดและความสามารถต้านออกซิเดชันด้วยการวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของ DPPH ในใบมะกอกโอลีฟสายพันธุ์ Hojiblanca ที่สกัดด้วยตัวทำละลายและความเข้มข้นที่แตกต่างกัน	46
9	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 80% เอทานอลของใบมะกอกโอลีฟ 4 สายพันธุ์	48
10	ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดและความสามารถต้านออกซิเดชันด้วยการวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของ DPPH ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 80% เอทานอลของใบมะกอกโอลีฟ 4 สายพันธุ์	49
11	โครมาโทแกรมของสารประกอบฟีนอลิกชนิดหลักในใบมะกอกโอลีฟซึ่งวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC-DAD ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรและ 350 นาโนเมตร	51
12	แมสสเปกตรัมของสารประกอบฟีนอลิกชนิดที่ 1 และสารประกอบฟีนอลิกชนิดที่ 2 ในใบมะกอกโอลีฟ	52
13	สเปกตรัมของสาร luteolin 7-glucoside luteolin 4′-glucoside oleuropein และ luteolin ในใบมะกอกโอลีฟ และสเปกตรัมของสารมาตรฐาน luteolin 7-glucoside luteolin 4′-glucoside oleuropein และ luteolin	53
14	โครมาโทแกรมของ oleuropein ในใบมะกอกโอลีฟสายพันธุ์ Arbequina สายพันธุ์ Hojiblanca สายพันธุ์ Manzanillo และสายพันธุ์ Picual	55

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

15 โครมาโทแกรมของสารประกอบฟีนอลิกชนิดหลักในใบมะกอกโอลีฟสายพันธุ์ Hojiblanca สายพันธุ์ Arbequina สายพันธุ์ Manzanillo และสายพันธุ์ Picual 56

16 ปริมาณสาร oleuropein ในใบมะกอกโอลีฟ 4 สายพันธุ์ 57

17 ปริมาณสาร luteolin 4′-glucoside และ luteolin 7-glucoside ในใบมะกอกโอลีฟ 4 สายพันธุ์ 58

18 ปริมาณสาร luteolin ในใบมะกอกโอลีฟ 4 สายพันธุ์ 59

19 ปริมาณสารสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และความสามารถต้านออกซิเดชันด้วยการวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของ DPPH ของชาดำใบมะกอกโอลีฟที่หมักอุณหภูมิและระยะเวลาต่างกัน 61

20 ปริมาณสาร oleuropein ของชาดำใบมะกอกโอลีฟที่หมักอุณหภูมิและระยะเวลาต่างกัน 63

21 ปริมาณสาร luteolin 7-glucoside และ luteolin 4′-glucoside ของชาดำใบมะกอกโอลีฟที่หมักอุณหภูมิและระยะเวลาต่างกัน 64

22 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของใบมะกอกโอลีฟสดและชาใบมะกอกโอลีฟ 67

23 ความสามารถต้านออกซิเดชันด้วยการวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของ DPPH ของใบมะกอกโอลีฟสดและชาใบมะกอกโอลีฟ 68

24 ปริมาณสาร oleuropein ของใบมะกอกโอลีฟสดและชาใบมะกอกโอลีฟ 70

25 ปริมาณสาร luteolin 7-glucoside และ luteolin 4′-glucoside ของใบมะกอกโอลีฟสดและชาใบมะกอกโอลีฟ 71

ภาพผนวกที่

ข1 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน luteolin ที่ความเข้มข้น 60 ppm 93

ข2 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน luteolin 7-glucoside ที่ความเข้มข้น 60 ppm 93

ข3 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน luteolin 4′-glucoside ที่ความเข้มข้น 60 ppm 94

ข4 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน oleuropein ที่ความเข้มข้น 1000 ppm 94

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่ **หน้า**

ข5	กราฟมาตรฐาน luteolin	95
ข6	กราฟมาตรฐาน luteolin 7-glucoside	95
ข7	กราฟมาตรฐาน luteolin 4′-glucoside	96
ข8	กราฟมาตรฐาน oleuropein	96
ข9	โครมาโทแกรมของชาเขียวใบมะกอกโอลีฟที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ที่ความยาวคลื่น 350 นาโนเมตร	97
ข10	โครมาโทแกรมของชาดำใบมะกอกโอลีฟที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ที่ความยาวคลื่น 350 นาโนเมตร	97
ข11	โครมาโทแกรมของ oleuropein ในชาเขียวใบมะกอกโอลีฟที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร	98
ข12	โครมาโทแกรมของ oleuropein ในชาดำใบมะกอกโอลีฟที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร	98
ค1	กราฟมาตรฐานกรดแกลลิกสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในใบมะกอกโอลีฟ	103
ค2	กราฟมาตรฐานคาเทคินสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในใบมะกอกโอลีฟ	103
ค3	กราฟมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกสำหรับการวิเคราะห์สมบัติต้านออกซิเดชัน DPPH ในใบมะกอกโอลีฟ	104
ง1	โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน naringin ที่ไม่ผ่านวิธีการสกัดตัวอย่าง	108
ง2	โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน naringin หลังผ่านวิธีการสกัดตัวอย่าง	108
จ1	ยอดและใบมะกอกโอลีฟสายพันธุ์ Hojiblanca	110
จ2	ยอดและใบมะกอกโอลีฟสายพันธุ์ Arbequina	110
จ3	ยอดและใบมะกอกโอลีฟสายพันธุ์ Manzanillo	110
จ4	ยอดและใบมะกอกโอลีฟสายพันธุ์ Picual	110
ฉ1	ใบมะกอกโอลีฟสายพันธุ์ Hojiblanca สำหรับผลิตชาใบมะกอกโอลีฟ	112
ฉ2	การล้าง คัดแยก และผึ่งให้แห้ง	112

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่ **หน้า**

ฉ3 การลวกใบมะกอกโอลีฟและแช่ใบมะกอกโอลีฟในน้ำเย็นทันทีหลังการลวก สำหรับการผลิตชาเขียวใบมะกอกโอลีฟ 113

ฉ4 การคั่วนวดใบมะกอกโอลีฟในกระทะด้วยไฟอ่อนสำหรับการผลิตชาเขียวใบมะกอกโอลีฟ 113

ฉ5 การคั่วนวดใบมะกอกโอลีฟในกระทะด้วยไฟอ่อนสำหรับการผลิตชาดำใบมะกอกโอลีฟ 114

ฉ6 การหมักใบมะกอกโอลีฟที่ควบคุมอุณหภูมิและระยะเวลา สำหรับการผลิตชาดำใบมะกอกโอลีฟ 114

ฉ7 การอบใบมะกอกโอลีฟที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง สำหรับการผลิตชาเขียวใบมะกอกโอลีฟและชาดำใบมะกอกโอลีฟ 115

ฉ8 ผลิตภัณฑ์ชาเขียวใบมะกอกโอลีฟและชาดำใบมะกอกโอลีฟ 115

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารประกอบฟีนอลิกในใบมะกอกโอลีฟ (*Olea europaea* L.) และชาใบมะกอกโอลีฟ

Phenolic Compounds in Olive Leaves (*Olea europaea* L.) and Olive Leaf Tea

คำนำ

มะกอกโอลีฟ (*Olea europaea* L.) จัดอยู่ในวงศ์ *Oleaceae* เช่นเดียวกับ *Jasminum* เป็นพืชอาหารที่มีคุณค่าชนิดหนึ่งและมีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศต่างๆ ในเขตเมดิเตอร์เรเนียน ได้แก่ อิตาลี กรีซ สเปน โปรตุเกส ตุรกี และตูนีเซีย (Bunker, 1999) โดยส่วนต่างๆของต้นมะกอกโอลีฟสามารถนำมาใช้ทำผลิตภัณฑ์ต่างๆ มากมาย เช่น ส่วนผลนำมาใช้ประกอบอาหารและผลิตภัณฑ์น้ำมัน ส่วนใบมะกอกโอลีฟใช้ในการปรุงอาหารและใช้บำบัดรักษาทางการแพทย์ ในขณะที่ส่วนเนื้อไม้ของกิ่งก้านและลำต้น นำมาใช้ทำผลิตภัณฑ์แกะสลักและผลิตภัณฑ์เฟอร์นิเจอร์ เป็นต้น (โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชฯ, 2544) ปัจจุบันมีงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับสารประกอบฟีนอลิกที่สำคัญในใบมะกอกโอลีฟซึ่งมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันได้ โดยสาร oleuropein เป็นสารที่มีรสขมและเป็นสารที่เป็นองค์ประกอบหลักของสารโพลีฟีนอล ซึ่งสามารถที่จะลดอัตราการเกิดโรคหัวใจ ป้องกันกระบวนการเกิดออกซิเดชันจากสารอนุมูลอิสระที่มีผลในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน และชะลอการเกิดโรคหลอดเลือดแดงแข็งตัวที่เกิดจากการสะสมของไขมันที่ผิวหน้าหลอดเลือด (Visilio *et al*., 1994) สาร oleuropein และสาร hydroxytyrosol ยังมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย และเชื้อรา ซึ่งจะยับยั้งและชะลออัตราการเกิดของเชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้ในผู้ที่ติดเชื้อทางระบบทางเดินหายใจและลำไส้ (Bisignano *et al*., 1999) จากการศึกษาโครงสร้างของสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่สกัดจากใบมะกอกโอลีฟด้วยสารละลายเมทานอล พบว่า สารกลุ่มฟลาโวน คือ luteolin 7-*O*-glucoside สามารถช่วยป้องกันการเกิดโรคหลอดเลือดแข็งตัวและการตีบหรืออุดตันของหลอดเลือด (Kim *et al*., 2006) และในใบมะกอกโอลีฟยังพบประกอบฟีนอลิกอื่นๆ เช่น สาร luteolin apigenin luteolin 7-*O*-rutinoside และ Apigenin 7-*O*-glucoside ซึ่งสามารถช่วยป้องกันโรคสมองเสื่อมและโรคเกี่ยวกับตับได้ (Zheng *et al*., 2005) และการสกัดด้วยตัวทำละลายที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันจะส่งผลต่อปริมาณสารที่สกัดได้แตกต่างกัน โดยเมื่อนำสารสกัดมาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่า 60% เอทานอลมีความสามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH มากที่สุด (Mylonaki *et al*., 2008) ในประเทศไทยมีการปลูกมะกอกโอลีฟมากมายหลายสายพันธุ์ ซึ่งแต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกันในด้านต่างๆ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เช่น ความหนาของใบ รูปร่างของใบ ขนาดของใบ สีของใบ และการทนต่อสภาพอากาศ เป็นต้น ซึ่งปัจจัยดังกล่าวอาจมีผลต่อปริมาณของสารประกอบฟีนอลิก นอกจากนี้ การใช้ประโยชน์จากใบมะกอกโอลีฟยังคงมีจำกัด จึงพยายามหาวิธีการแปรรูปเป็นชาใบมะกอกโอลีฟ ซึ่งอาจมีส่วนช่วยสนับสนุนการใช้ประโยชน์จากใบมะกอกโอลีฟ และเป็นการเพิ่มมูลค่าทางการตลาดให้กับใบมะกอกโอลีฟ รวมทั้งเป็นทางเลือกใหม่ให้กับผู้บริโภค แต่อย่างไรก็ตามกระบวนการผลิตชาอาจมีผลต่อความคงตัวของสารประกอบฟีนอลิกในใบมะกอกโอลีฟ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสายพันธุ์ของใบมะกอกโอลีฟ ชนิดและความเข้มข้นของตัวทำละลายที่มีขั้วต่างกันต่อปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกในใบมะกอกโอลีฟ เนื่องจากสารในกลุ่มนี้มีความสำคัญต่อสมบัติการต้านออกซิเดชัน รวมทั้งกระบวนการผลิตชาอาจมีผลต่อความคงตัวของสารประกอบฟีนอลิกในใบมะกอกโอลีฟ โดยการศึกษาเรื่องความคงตัวและการระบุสารประกอบฟีนอลิกที่สำคัญบางชนิดในใบมะกอกโอลีฟในประเทศไทยนั้นยังคงมีค่อนข้างจำกัด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาผลของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดต่อสารประกอบฟีนอลิกและความสามารถต้านออกซิเดชันในใบมะกอกโอลีฟ

2. เพื่อศึกษาอิทธิพลของสายพันธุ์ต่อสารประกอบฟีนอลิกและความสามารถต้านออกซิเดชันในใบมะกอกโอลีฟ

3. เพื่อศึกษาชนิดและปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกที่สำคัญบางชนิดในใบมะกอกโอลีฟ

4. เพื่อศึกษาผลของกระบวนการผลิตชาต่อสารประกอบฟีนอลิกและความสามารถต้านออกซิเดชันในใบมะกอกโอลีฟ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การตรวจเอกสาร

มะกอกโอลีฟ

มะกอกโอลีฟ เป็นชื่อเรียกพื้นเมือง จัดเป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Oleaceae มีชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Olea europaea* L. มะกอกโอลีฟเป็นพืชอาหารที่สำคัญและมีคุณค่าชนิดหนึ่งในเขตเมดิเตอร์เรเนียน โดยส่วนต่างๆของต้นมะกอกโอลีฟสามารถนำมาใช้ทำผลิตภัณฑ์ต่างๆ มากมาย เช่น ส่วนผลนำมาใช้ประกอบอาหารและผลิตภัณฑ์น้ำมัน ซึ่งในทางการแพทย์แนะนำให้บริโภคน้ำมันมะกอกโอลีฟ เนื่องจากมีไขมันที่ไม่เป็นอันตรายต่อสุขภาพสูงกว่าน้ำมันที่ผลิตจากพืชอื่นๆ อีกทั้งยังสามารถนำน้ำมันมะกอกโอลีฟมาใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตสบู่และน้ำมันนวด ส่วนใบมะกอกโอลีฟใช้ในการปรุงอาหารและใช้บำบัดรักษาทางการแพทย์ ในขณะที่ส่วนเนื้อไม้ของกิ่งก้านและลำต้น นำมาใช้ทำผลิตภัณฑ์แกะสลักและผลิตภัณฑ์เฟอร์นิเจอร์ (โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชฯ, 2544) และมีองค์ประกอบทางเคมีของใบมะกอกโอลีฟ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 องค์ประกอบทางเคมีของใบมะกอกโอลีฟ (*Olea europaea* L. var Memecik)

องค์ประกอบทางเคมี	ร้อยละ* (โดยน้ำหนักสด)
โปรตีน	5.45±0.22
ไขมัน	6.54±0.27
คาร์โบไฮเดรต	27.58 ±0.24
เส้นใย	7.00±0.18
เถ้า	3.61±0.25
ความชื้น	49.83±0.51

หมายเหตุ *ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ที่มา: ดัดแปลงจาก Erbay and Icier (2009)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

1.1 ราก

ต้นมะกอกโอลีฟที่โตเต็มจะมีระบบรากที่แผ่กระจายและตื้น เป็นรากซึ่งงอกออกมาจากส่วนล่างของลำต้น ความลึกของการหยั่งรากขึ้นอยู่กับลักษณะของดิน ในพื้นที่ดินร่วนซุย รากสามารถหยั่งได้ลึกตั้งแต่ 10.15 ถึง 80 เซนติเมตร ความเติบโตตามแนวกว้างของต้นพืชนั้นจะเป็น 2-3 เท่าของรัศมีของส่วนยอดสุด โดยมีความสัมพันธ์ของระยะห่างของต้นพืชเข้ามาเกี่ยวข้องด้วย

1.2 ต้น

ลำต้นของมะกอกโอลีฟ จะมีลักษณะขึ้นอยู่กับการตัดแต่งเป็นสำคัญ เช่น การอนุบาลต้นไม้ และอุปกรณ์ที่ใช้ เป็นต้น ในพื้นที่หลายส่วนของประเทศสเปน พบว่า ต้นมะกอกมีลักษณะที่ขึ้นเป็นกอ ในขณะที่ต้นมะกอกในประเทศอื่นๆ เกือบทั้งหมดเป็นลำต้นเดี่ยว ส่วนลำต้นอาจสูงได้ถึง 20 เมตร ซึ่งความสูงของต้นมะกอกนั้นจะขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น การตัดแต่งกิ่ง กิ่งตอนที่นำมาปลูก และปัจจัยอื่นๆ ซึ่งมีส่วนทำให้ความสูงของต้นมะกอกแตกต่างจากกันราว 1-2 เมตร ลำต้นของต้นมะกอกขณะที่ยังเล็กจะมีลักษณะเป็นลำต้นตรงมากกว่า ในขณะที่ต้นมะกอกที่โตกว่ามีกิ่งก้านแตกใหญ่ดูคล้ายกับว่ามีกลุ่มกอที่ขึ้นอยู่รวมกัน กิ่งใหญ่จะแยกออกจากลำต้น และแตกกิ่งก้านสาขาออกไป ความหนาแน่นของกิ่งใบขึ้นอยู่กับการจัดวางผังในพื้นที่เพาะปลูก ความอุดมสมบูรณ์ของดิน แหล่งน้ำ รวมทั้งการตัดแต่งกิ่ง ลักษณะกิ่งอ่อนของต้นมะกอกโอลีฟจะเป็นกิ่งเล็ก

1.3 ใบ

มะกอกโอลีฟเป็นต้นไม้ไม่ผลัดใบ มีใบเดี่ยวเรียงตรงข้ามกัน ลักษณะของใบเป็นรูปใบหอก กว้าง 1-1.5 เซนติเมตร ยาว 5-6 เซนติเมตร ปลายใบแหลมหรือมนแคบ มีติ่งเล็กๆ โคนรูปลิ่ม ขอบเรียบ ก้านใบสั้น ยาว 3-4 มิลลิเมตร ผิวด้านบนสีเขียวเข้มเป็นมัน ผิวใบด้านล่างสีเทา มีรูเปิดเล็กๆ ที่อยู่ใต้ใบเพื่อช่วยควบคุมการคายน้ำ ตำแหน่งของตาใบและตาดอกจะอยู่ตรงซอกใบ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.4 ดอก

ดอกมีลักษณะเป็นดอกฝอยอยู่บนช่อดอกที่แตกออกมาจากตาอ่อน ในแต่ละช่อมีตั้งแต่ 11 - 23 ดอก มีทั้งดอกสมบูรณ์เพศและดอกไม่สมบูรณ์เพศ ก้านดอกยาว กลีบเลี้ยง 4 กลีบ โคนเชื่อมติดกันเป็นรูปทรงกระเปาะ ขนาดสั้น และมีสีเขียวอ่อน กลีบดอก 4 กลีบโคนเชื่อมติดกัน ดอกมีสีขาวหรือสีครีม เกสรตัวผู้มี 2 อัน ขนาดใหญ่ติดที่กลีบดอก อับเรณูมีสีเหลืองลักษณะเป็น 2 พู ก้านเกสรตัวเมียตรง สั้น และหนา รังไข่มี 2 คาร์เพลแต่ละคาร์เพลมี 2 ออวุล ยอดเกสรตัวเมียค่อนข้างใหญ่ ซึ่งเป็นส่วนที่คอยดักจับละอองเรณูมีลักษณะเป็นสองแฉกและมีขนอ่อน เมื่อเกิดการผสมพันธุ์ขึ้นในโพรงเกสรตัวเมียที่มีถุงรังไข่แยกออกจากกัน โดยในแต่ละคาร์เพลจะมีออวุลอยู่สองออวุล ออวุลที่ได้รับการผสมแล้วจะฟักตัวเป็นผลเมล็ดเดี่ยวหรือโมโนสเปิร์ม ในดอกมะกอกจะมีทั้งเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมียอยู่ในดอกเดียวกันซึ่งจัดเป็นดอกสมบูรณ์เพศจะสามารถผสมพันธุ์กันและให้ผลให้เมล็ดต่อไป ส่วนในดอกมะกอกที่ไม่สมบูรณ์เพศ ที่บางดอกอาจจะไม่มีเกสรตัวเมียจึงไม่ติดผล หรือบางดอกอาจจะไม่มีเซลล์ไข่ หรือเกสรตัวผู้ไม่สมบูรณ์ ผลมะกอกที่ได้ก็จะแกร็นและไม่สมบูรณ์ อย่างไรก็ตาม มีลูกมะกอกเพียง 2-3 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้นที่มีความสมบูรณ์เพียงพอที่จะเก็บเกี่ยวได้

1.5 ผล

มีลักษณะกลมรี ความยาว 1-4 เซนติเมตร ความกว้าง 0.6-2 เซนติเมตร สีของผลจะมีสีต่างๆ เช่น สีเขียว สีแดง สีม่วง หรือสีดำ ผลของมะกอกโอลีฟมีเมล็ดในเดี่ยว และมีรูปทรงค่อนข้างกลม อาจจะกลมน้อย หรือกลมมากแตกต่างกันไป ส่วนขนาดของผลขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ ส่วนประกอบของผลจะประกอบด้วยส่วนของเปลือกชั้นนอก ซึ่งสีจะเปลี่ยนเมื่อผลสุก และเนื้อของมะกอกโอลีฟเป็นส่วนที่มีปริมาณน้ำมันมากที่สุด

1.6 เมล็ด

เมล็ดเป็นเมล็ดเดี่ยว มีลักษณะแข็ง ยาว และมีตุ่มอยู่ตรงส่วนบนของเมล็ดห่อหุ้มเมล็ดพันธุ์ที่อยู่ด้านใน ซึ่งพบว่า มีทั้งคัพภะ (embryo) และโภชนาสาร (โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชฯ, 2544)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. ลักษณะทางภูมิศาสตร์

มะกอกโอลีฟมีถิ่นฐานเดิมซึ่งเริ่มมาตั้งแต่ประเทศแถบบอลข่าน ทะเลเดรียติค ที่ราบสูงในอิหร่าน ปาเลสไตน์ จนถึงแถบชายฝั่งของซีเรีย ต่อมาได้กระจายมาถึงประเทศที่เป็นเกาะอยู่ในทะเลเมดิเตอร์เรเนียนใกล้กับประเทศกรีก คือ Chipre ต่อไปทาง Anatolio ผ่าน Crete ไปจนถึงอียิปต์ จนกระทั่งกระจายไปทั่วบริเวณลุ่มแม่น้ำที่ติดกับชายฝั่งของทะเลเมดิเตอร์เรเนียน และจากการค้นพบทวีปอเมริกา การปลูกมะกอกโอลีฟจึงได้แพร่ออกไปสู่โลกใหม่ด้วยเช่นกัน ซึ่งในปัจจุบันได้มีการปลูกในแถบอเมริกาใต้ จีน ญี่ปุ่น และออสเตรเลียอีกด้วย พื้นที่ที่นิยมปลูกมะกอกโอลีฟนั้นโดยมากจะอยู่ในช่วงระหว่างเส้นรุ้งที่ 30-45 องศา เป็นได้ทั้งในซีกโลกตอนเหนือ ซึ่งได้แก่ บริเวณทะเลเมดิเตอร์เรเนียน แอฟริกาตอนเหนือ ญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา และเม็กซิโก และซีกโลกตอนใต้ บริเวณออสเตรเลีย และบางประเทศในเขตแอฟริกาใต้ ซึ่งจะเป็นพื้นที่ที่สภาพภูมิอากาศมีลักษณะเด่นคือ เป็นฤดูร้อนที่ร้อนและแห้ง (โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชฯ, 2544)

3. สายพันธุ์ของมะกอกโอลีฟ

การขยายพันธุ์มะกอกจากเดิมที่อาศัยการผสมของเกสรเปลี่ยนมาสู่วิธีการใช้ส่วนต่างๆ ของพืชนั้น ก็เป็นวิธีที่ไม่ต้องอาศัยเพศซึ่งใช้กันตามปกติทั่วไป คือ การตอนกิ่ง การติดตา การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อฯ และด้วยวิทยาการด้านปฐพีศาสตร์และเทคนิคทางการเกษตรที่ถูกนำมาใช้ในการทดลองและคัดเลือกสายพันธุ์มะกอกเด่นๆ นั้นได้ก่อให้เกิดสายพันธุ์ใหม่ๆ อีกมากมาย ซึ่งเจ้าของสายพันธุ์ใหม่เหล่านี้กระจัดกระจายอยู่ตามพื้นที่ต่างๆ กัน และมีเพียงบางสายพันธุ์เท่านั้นที่นำไปเพาะในพื้นที่ที่อยู่ห่างไกลจากถิ่นกำเนิดได้เป็นผลสำเร็จ อย่างไรก็ตาม มะกอกโอลีฟที่ปลูกกันในประเทศทางแถบเมดิเตอร์เรเนียนนั้น เป็นต้นไม้เก่าแก่ที่อยู่มาชั่วนาตาปี ดังนั้น สวนที่ปลูกจึงมักเป็นมะกอกพันธุ์พื้นเมืองเป็นส่วนมาก นอกจากนี้ พื้นที่แถบเมดิเตอร์เรเนียนยังเป็นประเทศผู้เป็นแหล่งผลิตมะกอกแหล่งใหญ่ที่มีการทำโคลน (clone) เพื่อคัดเลือกพันธุ์มะกอกที่มีลักษณะเด่นๆ กันมาหลายรุ่นแล้ว และในงานวิจัยยังคงศึกษาเรื่องลำต้นใต้ดิน (rootstock) เพื่อช่วยให้การขยายพันธุ์มะกอก (โดยอาศัยส่วนของพืช) สามารถแก้ปัญหาในเรื่องติดรากยาก รวมทั้งศึกษาเรื่องการถ่ายทอดลักษณะเฉพาะทางพันธุกรรมจากกิ่งต้นพันธุ์ ทั้งนี้เพื่อปรับปรุงสายพันธุ์ให้ดีขึ้น ซึ่งมะกอกโอลีฟสามารถแบ่งเป็นประเภทตามการใช้ประโยชน์ดังนี้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1) เพื่อการผลิตน้ำมัน ได้แก่ พันธุ์ Picual Picudo Arbequina และ Cornicabra เป็นต้น

2) เพื่อรับประทานผล ได้แก่ พันธุ์ Manzanillo Gordal และ Cacerena เป็นต้น

3) เพื่อผลิตน้ำมันและรับประทานผล ได้แก่ พันธุ์ Hojiblanca และ Pico Limon เป็นต้น (โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชฯ, 2544)

4. การดูแลรักษา

ต้นมะกอกโอลีฟจะเริ่มตัดแต่งตั้งแต่ต้นสูงประมาณ 40 เซนติเมตร โดยจะตัดแต่งให้เหลือกิ่งเดียวให้ต้นตั้งตรง ในการตัดกิ่งช่วงนี้จะไม่ลิดใบบริเวณลำต้นทิ้ง และจะทำการตัดแต่งเรื่อย ๆ จนด้านล่างมีความสูง 1-1.20 เมตร ในการปลูกควรใช้กิ่ง 1 ปีในการปลูก ไม่ควรใช้กิ่งที่มีอายุมากในการปลูก เนื่องจากรากจะพันกันในถุงทำให้ต้นไม่เจริญ ถึงเจริญก็ไม่ดี จะให้ผลผลิตน้อย เมื่อต้นเจริญถึงปีที่ 3 การตัดแต่งกิ่งก็จะเหลือ 2-3 ปี ต่อครั้ง กิ่งที่แยกออกไปจากต้นหลักจะมี 2-3 กิ่งเท่านั้น และความสูงจะให้สูงได้ประมาณ 4-5 เมตร เพื่อความสะดวกในการเก็บและดูแล รูปทรงของพุ่มในทางปฏิบัติแล้วควรตัดให้มีแสงผ่านอย่างทั่วถึง เนื่องจากแสงมีความสำคัญต่อผลผลิต บริเวณที่ถูกแสงมากจะให้ผลผลิตมากตามไปด้วย ส่วนบริเวณที่มีลมพัดแรงก็จะทำการตัดกิ่งตรงกลางออกเพื่อให้ลมผ่านได้ง่ายเป็นการลดแรงปะทะ และมะกอกโอลีฟที่มีการตัดแต่งกิ่งก็จะให้ผลผลิตดีกว่าต้นที่ไม่มีการตัดแต่งกิ่งเลย ในการตัดแต่งต้นมะกอกโอลีฟโดยทั่วไปมี 4 ลักษณะ คือ

1) การตัดแต่งต้นที่มีอายุน้อย ต้นมะกอกโอลีฟที่มีอายุน้อยหรือมีความสูงไม่เกิน 1.5 เมตร ซึ่งเป็นระยะการเจริญเติบโตที่ยังไม่ให้ผลผลิต ไม่ควรตัดแต่งมากนัก การตัดแต่งควรทำเพียงเพื่อส่งเสริมให้ต้นมะกอกโอลีฟมีรูปทรงต้นที่ดี ไม่ให้แตกกิ่งก้านมากเกินไปอย่างไร้ทิศทางและกำจัดกิ่งระดับล่าง ๆ

2) การตัดแต่งที่มีอายุปานกลาง ต้นมะกอกโอลีฟที่เริ่มต้นใหญ่ขึ้น หรือมีความสูงเกินกว่า 1.5 เมตร หรือเริ่มให้ผลผลิต จำเป็นต้องมีการตัดแต่งรูปทรงต้นให้เหมาะสม โดยคงกิ่งก้านหลักไว้ 2-3 กิ่ง ภายหลังการตัดแต่งสำหรับให้แตกยอดใหม่ในปีต่อไป

3) การตัดแต่งต้นที่มีอายุมาก ต้นมะกอกโอลีฟที่มีอายุมากแล้ว จำเป็นต้องได้รับการตัดแต่ง เพื่อให้มีการสร้างกิ่งก้านอย่างต่อเนื่องและมีผลผลิตออกมาอย่างสม่ำเสมอ ซึ่งปกติจะทำการตัดแต่งภายหลังการเก็บเกี่ยวผลผลิตแล้ว คือ ระหว่างปลายเดือนกุมภาพันธ์ถึงปลายเดือนพฤษภาคม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การได้รับแสงแดดของต้นมะกอกโอลีฟ ใบของต้นมะกอกโอลีฟจะต้องได้รับแสงมากที่สุด สัดส่วนระหว่างใบและลำต้น (รวมทั้งกิ่ง) จะต้องให้มีสัดส่วนสูงที่สุด เพื่อให้ต้นมะกอกโอลีฟมีใบมากที่สุด ส่วนการระบายอากาศในเรือนพุ่ม จะต้องให้มีการหมุนเวียนของอากาศภายในเรือนพุ่มดี พุ่มใบต้องไม่หนาทึบ และสัดส่วนระหว่างใบกับราก ต้องไม่ตัดแต่งมากเกินไปจนกระทั่งเกินสมดุล

4) การตัดแต่งเพื่อสร้างยอดรุ่นใหม่ ต้นมะกอกโอลีฟที่มีอายุนานมากจะเริ่มให้ผลผลิตไม่สม่ำเสมอ การแตกยอดและกิ่งก้านใหม่น้อย จำเป็นต้องมีการตัดแต่งเพื่อให้มีการสร้างยอดรุ่นใหม่บนต้น (ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศฯ, 2550)

5. การเก็บเกี่ยวผลผลิต

ต้นมะกอกโอลีฟสามารถให้ผลผลิตภายหลังการปลูกตั้งแต่ 5-7 ปี ขึ้นไปและจะให้ผลผลิตเพิ่มขึ้นจนถึงอายุ 35 ปี จึงเริ่มให้ผลผลิตเต็มที่จากนั้นหากมีการปฏิบัติดูแลรักษาอย่างถูกต้องและสม่ำเสมอจะสามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตอย่างต่อเนื่องไปได้ถึงอายุ 150 ปี อย่างไรก็ตาม ในพื้นที่แห้งแล้ง การให้ผลผลิตจะล่าช้าออกไปเป็น 10-15 ปีหลังจากปลูก การเก็บเกี่ยวผลผลิตมะกอกโอลีฟในสมัยก่อน จะใช้วิธีเก็บด้วยมือ และยังมีการใช้ไม้ยาวตีที่กิ่ง หรือใช้วิธีเขย่ากิ่งให้ผลมะกอกโอลีฟตกลงบนผ้าที่ปูรองรับใต้ต้น ซึ่งการเก็บด้วยมือต้องใช้แรงงานมากและต้นทุนสูงต่อมาจึงหันมาใช้เครื่องทุ่นแรงและเครื่องจักรกลมากขึ้น โดยได้มีการพัฒนาเครื่องจักรกลเพื่อการเก็บเกี่ยวผลมะกอกโอลีฟขึ้น เพื่อทุ่นแรงงานในการเก็บเกี่ยว เครื่องจักรกลที่ใช้มีขนาดเล็กที่สามารถเข้าไปทำงานในระหว่างแปลงปลูกได้ ในการเจริญเติบโตของมะกอกโอลีฟในแถบเมดิเตอร์เรเนียนสามารถแบ่งออกเป็นแต่ละช่วง คือ

ช่วงเดือนพฤศจิกายน-กุมภาพันธ์	เป็นระยะพักตัวระหว่างช่วงภูมิอากาศหนาว
ช่วงเดือนมีนาคม-เมษายน	มะกอกโอลีฟจะเริ่มแตกตาดอกและยอดใหม่
ช่วงเดือนพฤษภาคม-มิถุนายน	ตาดอกจะพัฒนาและเริ่มออกดอก
ช่วงเดือนกรกฎาคม-สิงหาคม	ผลมะกอกโอลีฟเจริญขึ้นภายหลังการผสมเกสรเมล็ดที่อยู่ภายในผลเจริญเต็มที่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ช่วงกลางเดือนสิงหาคม-ตุลาคม	เนื้อของผลมะกอกโอลีฟจะเจริญสมบูรณ์เต็มที่สามารถเริ่มเก็บเกี่ยวผลมะกอกโอลีฟของพันธุ์ที่สุกแก่เร็วและผลมะกอกโอลีฟที่ใช้เพื่อรับประทานผลเขียวโดยระยะเวลาการสุกแก่ของผลมะกอกโอลีฟจะแตกต่างกันไปแล้วแต่ละพันธุ์
ช่วงเดือนพฤศจิกายน-กุมภาพันธุ์	เริ่มเก็บเกี่ยวผลผลิตมะกอกโอลีฟ เพื่อรับประทานผลดำหรือผลแก่และที่ใช้เพื่อการผลิตน้ำมันมะกอกโอลีฟ (ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศฯ, 2550)

6. ประโยชน์ของมะกอกโอลีฟ

6.1 สีย้อมผ้า

จากการที่มีการนำต้นมะกอกโอลีฟมาปลูกในประเทศไทย ในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี เมื่อมะกอกโอลีฟเจริญเติบโตจะมีการตัดแต่งทรงพุ่มอยู่เสมอ จึงนำเอาใบของมะกอกโอลีฟมาทดลองย้อมสีเส้นไหม พบว่า สามารถย้อมสีเส้นไหมได้ผลดี โดยใช้ใบมะกอกโอลีฟสดจำนวน 15 กิโลกรัม นำมาต้มเพื่อสกัดน้ำสีโดยใช้อัตราส่วนใบสดต่อน้ำ 1:2 นาน 1 ชั่วโมง กรองใช้เฉพาะน้ำน้ำสีที่ได้สามารถนำมาย้อมเส้นไหมได้ 1 กิโลกรัม ย้อมด้วยกรรมวิธีย้อมร้อน นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำเส้นไหมที่ผ่านการย้อมมาแช่ในสารละลายสารช่วยติดสี นาน 10-15 นาที สีเส้นไหมที่แช่สารละลายจุนสีได้สีน้ำตาลเขียว (กรมส่งเสริมอุตสาหกรรม, 2549)

6.2 ชาใบมะกอกโอลีฟ

สำหรับการผลิตชาใบมะกอกโอลีฟ ทำได้โดยการเอาใบมะกอกมาล้างน้ำให้สะอาด แล้วนำไปนึ่งให้แห้ง หรืออบให้แห้งสนิท ที่อุณหภูมิไม่เกิน 60 องศาเซลเซียส นำมาบดหยาบและบรรจุซองเป็นชาพร้อมดื่ม หรืออาจไว้ใช้ใส่ในกาต้มชาโดยตรงซึ่งต้องกรองเอากากทิ้ง หรือรอให้ตกตะกอน แต่เพื่อให้ได้สารที่มีอยู่ในใบออกฤทธิ์ จึงต้องมีการชงชามะกอกที่ถูกวิธี ดังนี้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ถ้าเป็นใบบดให้ใส่ประมาณ 10 กรัม ลงในกาต้มน้ำ และลดไฟลงมาให้ร้อนระดับปานกลาง ทิ้งไว้ประมาณ 5-10 นาที คนเป็นระยะ สีของชาจะออกสีน้ำตาลจางๆ นำไปดื่มทันทีหรือเก็บไว้ในตู้เย็นได้ไม่เกิน 2 วัน

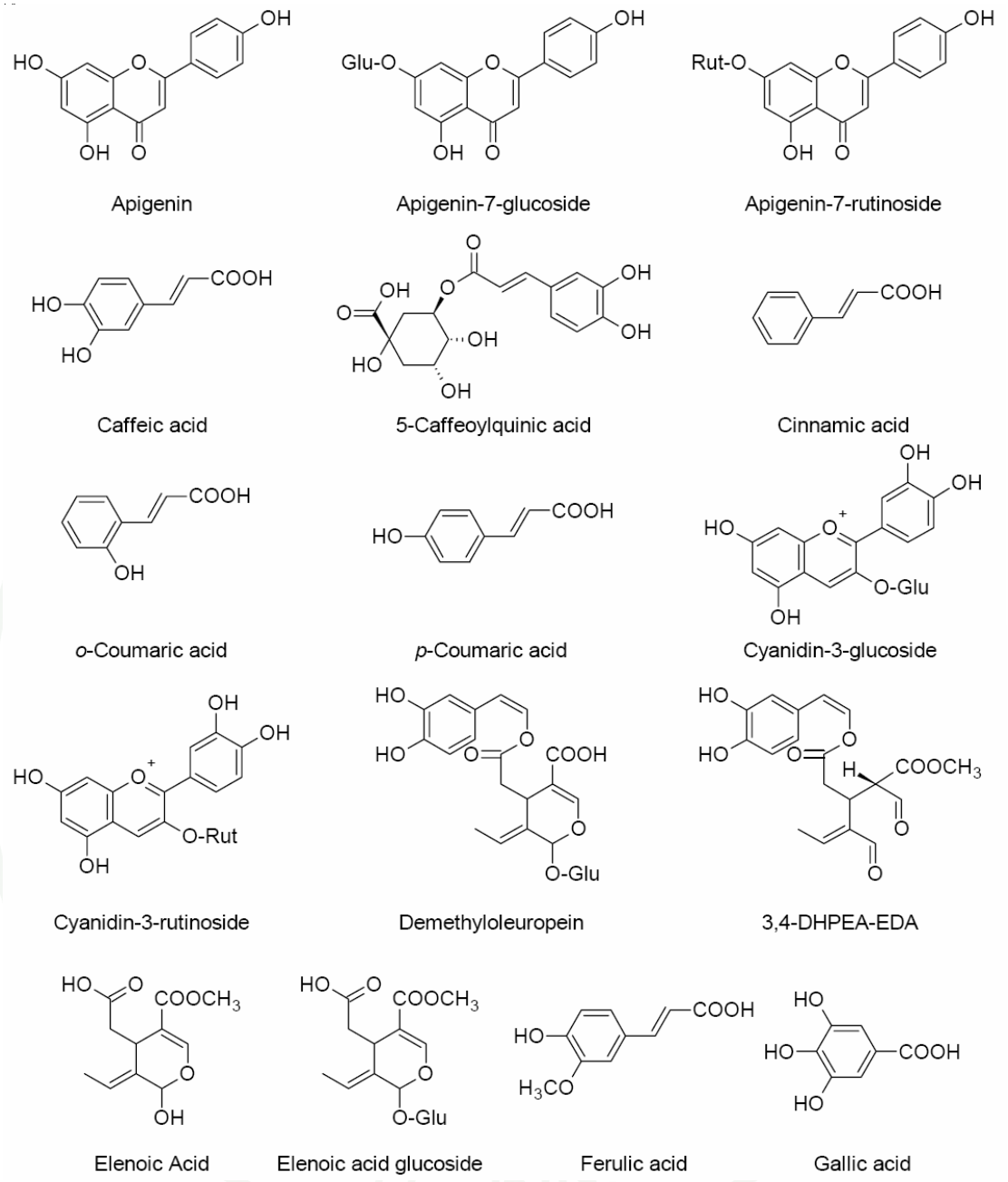
ถ้าเป็นถุงชาให้เติมน้ำร้อนจัดลงไปในแก้วที่ใส่ถุงชาให้ท่วมและแช่ทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที ในบางครั้งอาจจะใช้เป็นเครื่องเทศชนิดหนึ่ง โดยการใส่ใบที่บดเป็นผงและไม่ต้องกรองกากใบทิ้ง ซึ่งนิยมใส่ในซุป (จุลสารสวนพฤกษศาสตร์โรงเรียน, 2547)

7. สารประกอบฟีนอลิก

สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารที่พบได้ในพืชทั่วไป มีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวนที่มีหมู่ไฮดรอกซิลอย่างน้อยหนึ่งหมู่หรือมากกว่า โดยมากเป็นสารที่มีขั้วละลายในตัวทำละลายจำพวกแอลกอฮอล์และน้ำได้ดี สารประกอบฟีนอลิกส่วนใหญ่ที่พบในพืชมักจะรวมอยู่ในโมเลกุลของน้ำตาลในรูปของสารประกอบไกลโคไซด์ (glycosides) และพบได้ในส่วนของช่องว่างภายในเซลล์ (cell vacuole) สารประกอบฟีนอลิกที่พบในธรรมชาติมีมากมายหลายชนิด มีลักษณะสูตรโครงสร้างทางเคมีที่แตกต่างกัน ซึ่งกลุ่มใหญ่ที่สุดที่พบจะเป็นสารประกอบพวกฟลาโวนอยด์ (flavonoids) นอกจากนั้นยังมีสารประกอบต่างๆ เช่น simple monocyclic phenol, phenyl propanoid, phenolic quinine และ polyphenolic ซึ่งได้แก่ พวกลิกนินและแทนนิน เป็นต้น รวมทั้งยังพบว่ามีสารประกอบที่มีกลุ่มฟีนอล (phenolic unit) รวมอยู่ในโมเลกุลของโปรตีนอัลคาลอยด์ (alkaloid) และเทอร์พีนอยด์ (terpenoid) เป็นต้น (อัญชนา, 2544; Pietta, 2000) ทั้งนี้ สารประกอบฟีนอลิกยังทำหน้าที่เป็นทั้งสารให้อิเล็กตรอนหรือเป็นตัวให้ไฮโดรเจนและกำจัดออกซิเจนที่อยู่ในรูปแอคทีฟ ด้วยหน้าที่ต่างๆ ดังกล่าว จึงทำให้สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารต้านออกซิเดชันที่สำคัญชนิดหนึ่งในพืชทั่วไป (Rice-Evans and Miller, 1996)

ในน้ำมันมะกอกโอลีฟ ผลมะกอกโอลีฟ และใบมะกอกโอลีฟมีสารประกอบฟีนอลิกมากมายหลายชนิดที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของยาและอาหารเพื่อสุขภาพ ซึ่งมีโครงสร้างทางเคมีของสารประกอบฟีนอลิก ดังแสดงในภาพที่ 1

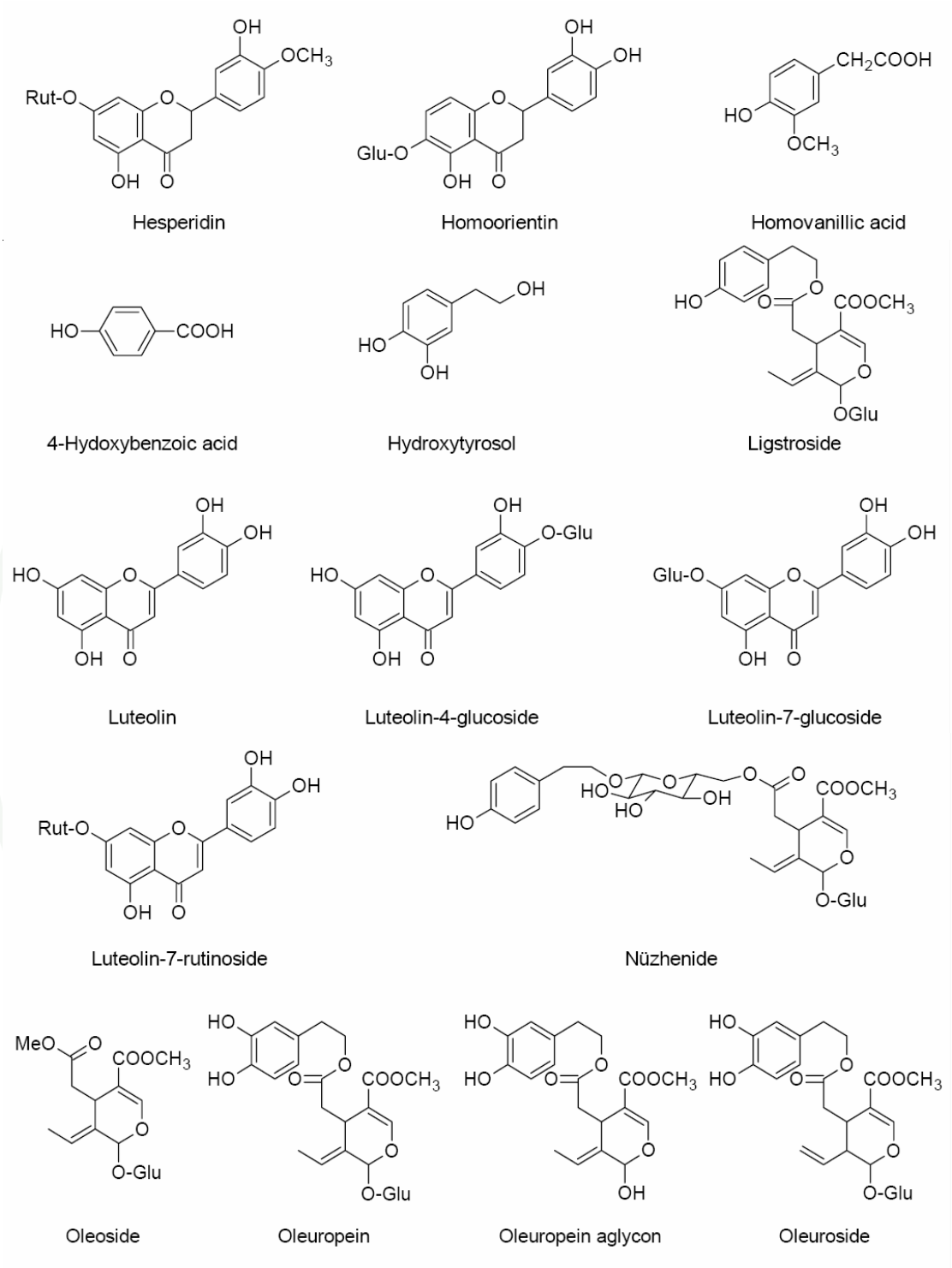
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 1 โครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิกในใบมะกอกโอลีฟ

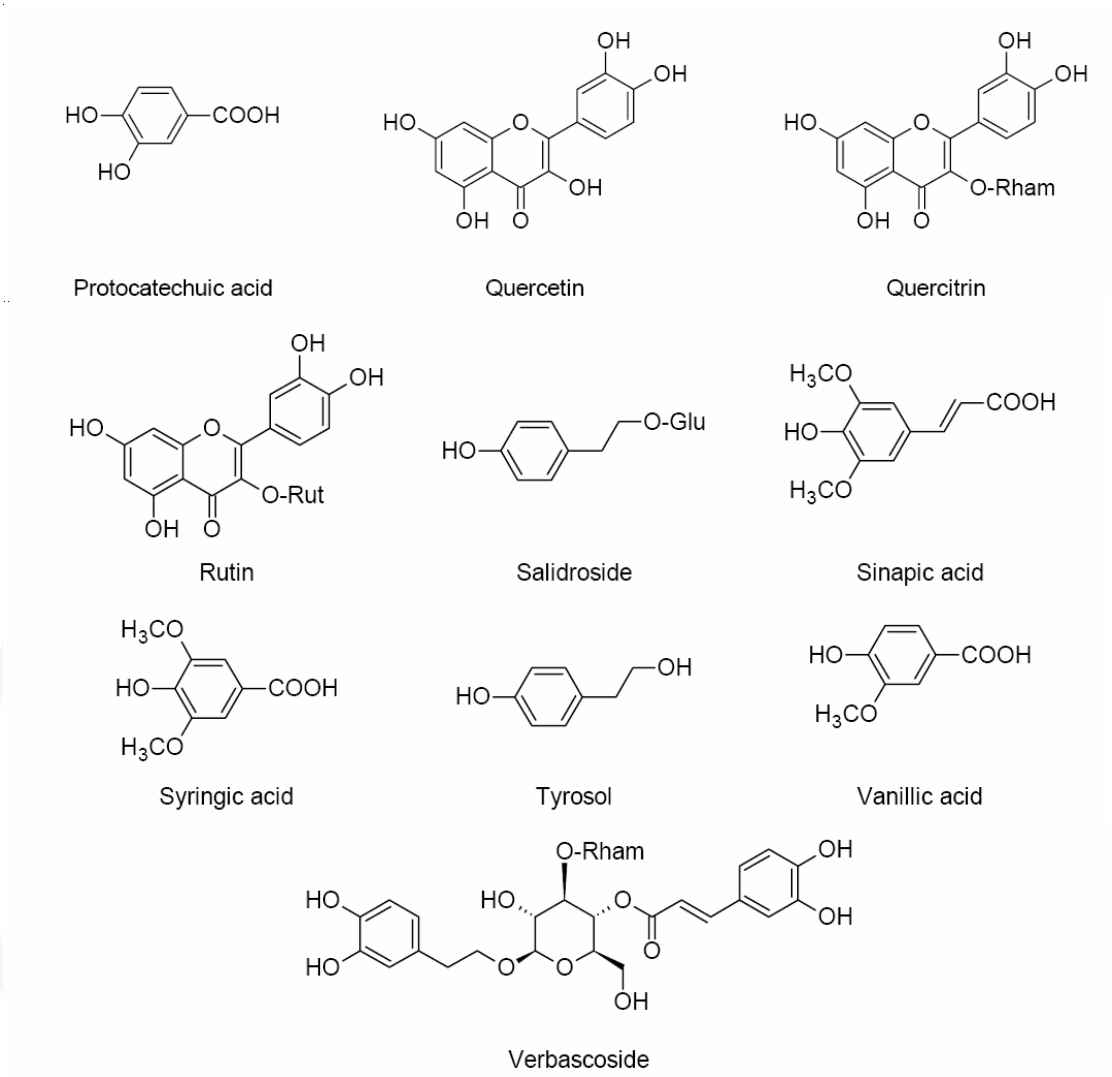
ที่มา: Omar (2010)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 1 (ต่อ)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



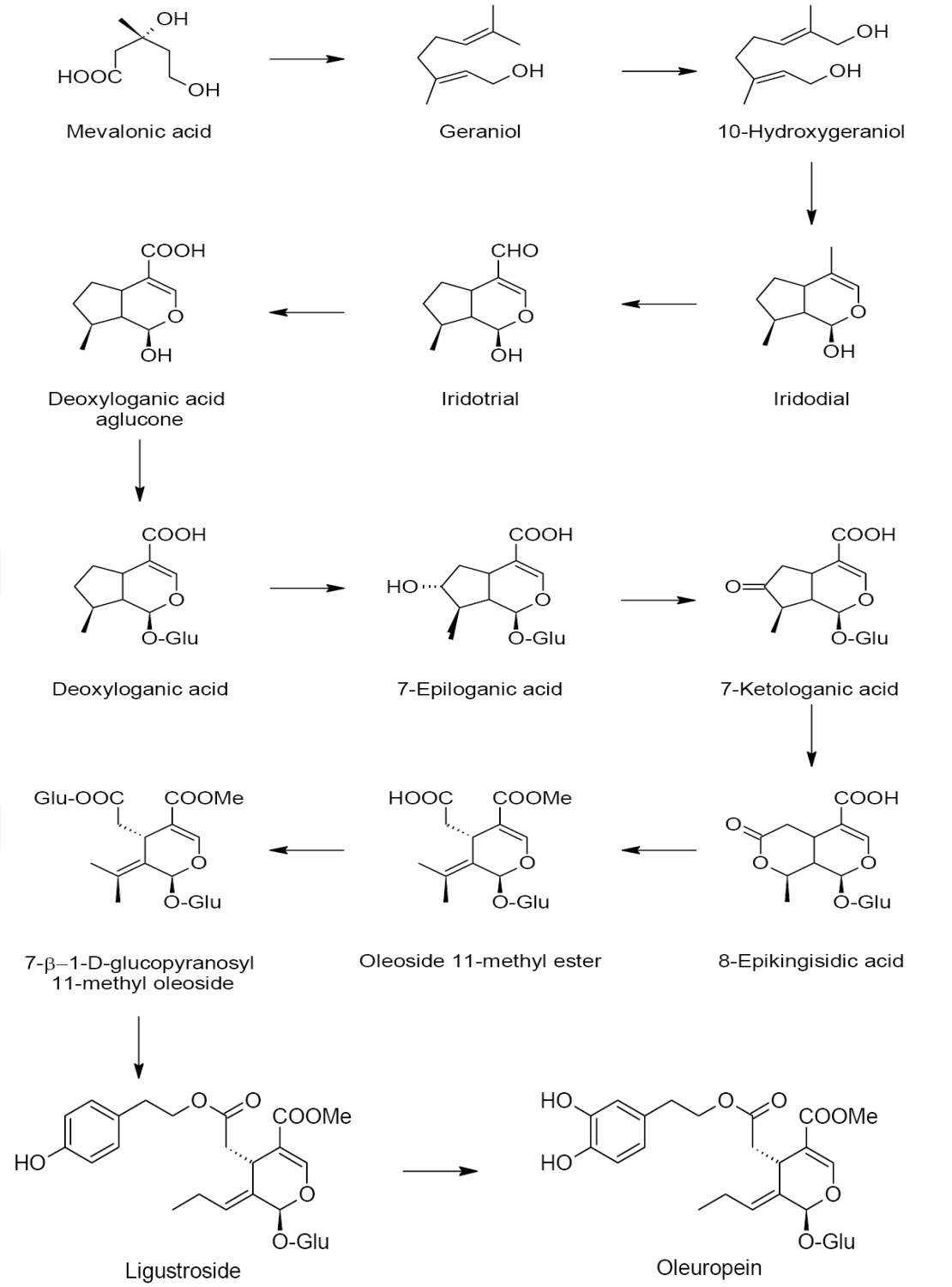
ภาพที่ 1 (ต่อ)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

7.1 สารโอเลยูโรเปอิน (oleuropein)

สารโอเลยูโรเปอินที่สกัดสารจากใบมะกอกโอลีฟมีสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชันที่สามารถต่อต้านเชื้อโรคและแมลงที่ทำลายพืช และยังมีคุณสมบัติที่ดีอีกมาก มีรสชาติที่ดีและมีประโยชน์ต่อมนุษย์ที่บริโภค ช่วยให้ร่างกายมีสุขภาพดีและไม่แก่เกินวัย มีคุณสมบัติคล้ายกับสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโรค (antibiotic) และทำลายจุลินทรีย์ ซึ่งการทำงานของสารตัวนี้จากใบมะกอกโอลีฟจะช่วยทำให้ร่างกายสร้างภูมิคุ้มกันขึ้นมารักษาโรคหรือต่อสู้กับเชื้อโรค ขณะที่สาร antibiotic นั้นฆ่าเชื้อโรคแต่ไม่ส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกัน สารที่ได้จากมะกอกโอลีฟนั้นได้จากสารสกัดจากใบมะกอกโอลีฟและชาใบมะกอกโอลีฟ (จุลสารสวนพฤกษศาสตร์โรงเรียน, 2547) และเนื่องจากสารโอเลยูโรเปอีนเป็นองค์ประกอบหลักของสารโพลีฟีนอลในใบมะกอกโอลีฟแต่เป็นสารที่มีรสขม ซึ่งการลดรสขมนี้สามารถทำได้โดยการสกัดด้วยตัวทำละลายน้ำที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน เพปไทด์ และโซเดียมไบคาร์บอเนต (Uematsu *et al.,* 2011) สารโอเลยูโรเปอีนนี้สามารถช่วยลดอัตราการเกิดโรคหัวใจ ป้องกันกระบวนการเกิดออกซิเดชันจากสารอนุมูลอิสระซึ่งมีผลในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน และชะลอการเกิดโรคหลอดเลือดแดงแข็งตัวที่เกิดจากการสะสมของไขมันที่ผิวหน้าของหลอดเลือด (Visilio *et al*., 1994) อีกทั้ง สารโอเลยูโรเปอีนและสารไฮดรอกซีไทโรซอลยังมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย และเชื้อรา (microfungi) ด้วยการยับยั้งและชะลออัตราการเกิดของเชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้ในผู้ที่ติดเชื้อทางระบบทางเดินหายใจและลำไส้ได้ (Bisignano *et al*., 1999) และจากการทดลองในหลอดทดลองพบว่าสารโพลีฟีนอลที่ได้จากใบมะกอกโอลีฟสามารถช่วยขัดขวางการเคลื่อนที่ของเกล็ดเลือดซึ่งเป็นผลดีต่อสุขภาพของผู้ชายที่ไม่สูบบุหรี่ (Singh *et al*., 2008) และการนำสารโอเลยูโรเปอินมาเป็นส่วนผสมในเครื่องสำอางยังสามารถช่วยป้องกันผิวไม่ให้เป็นผื่นแดงที่เกิดรังสีจากแสง UVB ได้ (Perugini *et al*., 2008) นอกจากนี้ สารโอเลยูโรเปอินยังมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาอื่นๆ เช่น มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ต้านกิจกรรมการเกิดโรคมะเร็ง ต้านกิจกรรมการทำงานของจุลินทรีย์ ต้านกิจกรรมการทำงานของไวรัส และยังมีฤทธิ์ในการลดระดับน้ำตาลและลดระดับไขมันในเลือด (Omar, 2010) โดยสารโอเลยูโรเปอินจะมีกระบวนการสังเคราะห์ ดังแสดงในภาพที่ 2

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 2 กระบวนการสังเคราะห์สารโอเลยูโรเปอินในมะกอกโอลีฟ

ที่มา: Omar (2010)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

7.2 สารไฮดรอกซีไทโรซอล (hydroxytyrosol)

สารไฮดรอกซีไทโรซอลหรือ 3,4-dihydroxyphenylethanol เป็นสารประเภทฟีนอลที่สามารถออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ (bio-active phenols) และมีอยู่ในธรรมชาติ จากรายงานการศึกษาต่างๆ พบว่า สารไฮดรอกซีไทโรซอลเป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันและสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่มีผลต่อโรคต่างๆของมนุษย์ได้ เช่น โรคหัวใจและหลอดเลือดหัวใจ โดยธรรมชาติแล้วสารไฮดรอก-ซีไทโรซอลจะพบในรูปอิสระได้ยาก แต่จะพบมากในผลมะกอกสุกซึ่งจะมีปริมาณในช่วง 1-3 กรัมต่อ 100 กรัมของน้ำหนักแห้ง ดังนั้น สารไฮดรอกซีไทโรซอลจะเป็นสารที่ได้จากการย่อยสารฟีนอลที่มีโครงสร้างซับซ้อนด้วยเอนไซม์หรือสารเคมี ซึ่งในปัจจุบันถือได้ว่าสารไฮดรอกซีไทโร-ซอลที่บริสุทธิ์และสูตรต่างๆ เป็นสารทางการค้าที่มีประโยชน์อย่างมาก (Leonardis and Macciola, 2008)

7.3 สารเวอร์บาสโคไซด์ (verbascoside)

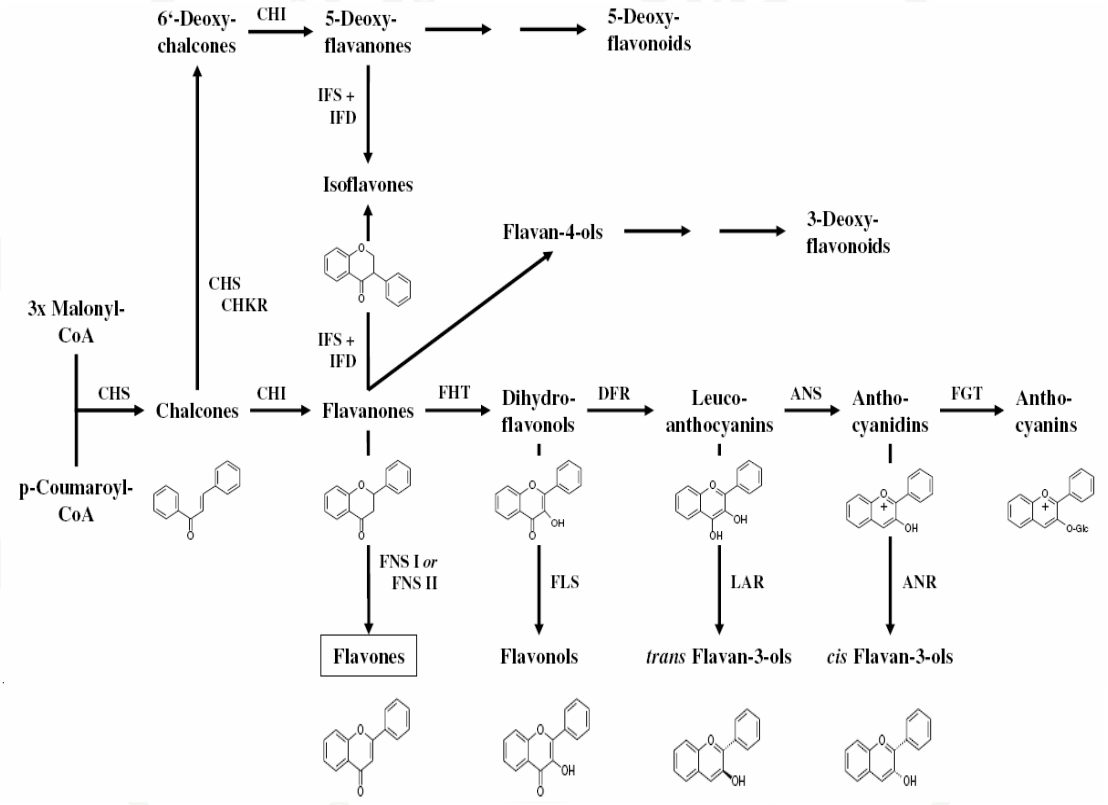
สารเวอร์บาสโคไซด์อาจรวมตัวอยู่กับสารโอเลยูโรเปอินที่อยู่ในรูปของโอเลยูโรเป-โอไซด์ (oleuropeosides) ที่เป็นองค์ประกอบหลักของใบมะกอกโอลีฟ โดยสารเวอร์บาสโคไซด์นี้สามารถช่วยซ่อมแซมเซลล์สมองที่ถูกทำลายของผู้ป่วยที่มีอาการติดเฮโรอีน มีฤทธิ์ต้านกิจกรรมการทำงานของแบคทีเรีย ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลพอกซีจีเนส และมีฤทธิ์ต้านการเกิดเนื้องอก (Qiusheng *et al*., 2005; Santoro *et al.,* 2008)

7.4 สารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids)

จากการศึกษาโครงสร้างของสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ โดยการฉีดสารที่สกัดจากใบมะกอกโอลีฟด้วยสารละลายเมทานอลในเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ที่มีเครื่องตรวจวัดชนิด diode array detector และเครื่อง Liquid Chromatography-Mass Spectrometry ซึ่งสามารถระบุชนิดของสารได้ โดยพบสารกลุ่มฟลาโวน คือ luteolin 7-*O*-glucoside สามารถช่วยป้องกันการเกิดโรคหลอดเลือดแข็งตัว (atherosclerosis) และการตีบหรืออุดตันของหลอดเลือด (restenosis) (Kim *et al*., 2006) สาร luteolin 7-*O*-rutinoside และ apigenin 7-*O*-glucoside สามารถช่วยป้องกันโรคสมองเสื่อมและโรคเกี่ยวกับตับได้ (Patil *et al*., 2003; Zheng *et al*., 2005) และยังพบสาร luteolin และ apigenin ซึ่งสาร luteolin เป็นสารต้านออกซิเดชันที่มีฤทธิ์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ทางเภสัชวิทยา เช่น มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ต้านกิจกรรมการเกิดโรคมะเร็ง ต้านกิจกรรมการทำงานของจุลินทรีย์ (แบคทีเรีย ไวรัส เชื้อรา และปรสิต) ป้องกันการเกิดโรคหัวใจด้วยการช่วยลดความดันโลหิตและลดระดับของคอเลสเตอรอล ป้องกันการเกิดโรคเบาหวานด้วยการช่วยลดระดับของกลูโคส และยังมีฤทธิ์ในการต้านอาการภูมิแพ้ด้วยการลดการปลดปล่อยสารฮีสตามีนในใบมะกอกโอลีฟอีกด้วย (López-Lázar, 2009) ส่วนสารกลุ่มฟลาโวนอลที่พบคือ rutin (Bouaziz *et al*., 2008) โดยสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์มีกระบวนการสังเคราะห์ ดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 กระบวนการสังเคราะห์สารในกลุ่มฟลาโวนอยด์

CHS, chalcone synthase; CHKR, chalcone polyketide reductase; CHI, chalcone isomerase; FHT, flavanone 3-b-hydroxylase; DFR, dihydroflavonol 4-reductase; ANS, anthocyanidin synthase; FGT, flavonoid glycosyltransferase; FNS, flavone synthase; FLS, flavonol synthase; LAR, leucoanthocyanidin reductase; ANR, anthocyanidin reductase; IFS, isoflavone synthase; IFD, isoflavone dehydratase

ที่มา: Martens and Mithofer (2005)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นอกจากนี้ ใบมะกอกโอลีฟยังมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic content) 11– 40 กรัมต่อกิโลกรัมแต่จะมีปริมาณมากขึ้นเมื่อนำไปทำแห้ง (Silva *et al*., 2006) รวมทั้งยังมีสารประเภทฟีนอลิกชนิดอื่นๆอีก คือ สารไทโรซอล (tyrosol) หรือ *p*-hydroxyphenyl-ethanol (Benavente-GarcõÂa *et al*., 2000) สารวานิลิน (vanillin) กรดวานิลิก (vanillic acid) และกรดคาเฟอิก (caffeic acid) (Bouaziz and Sayadi, 2005) โดยสารสกัดจากใบมะกอกโอลีฟจะอุดมไปด้วยสารต้านออกซิเดชันและผลการทดสอบทางวิทยาศาสตร์พบว่า มีจำนวนสารต้านออกซิเดชันมากกว่าวิตามินซีถึง 5 เท่า และมากกว่าสารสกัดจากชาเขียวและเมล็ดองุ่นเกือบ 2 เท่า อีกทั้งผลไม้ที่เป็นที่รู้จักกันดีว่าอุดมไปด้วยสารต้านออกซิเดชันอย่างแครนเบอร์รี่และราสเบอร์รี่ยังมีจำนวนสารต้านออกซิเดชันน้อยมากเมื่อเทียบกับสารสกัด สารฟีนอลและสารโอเลยูโรเปอีนในสารสกัดจากใบมะกอกโอลีฟ มีผลการวิจัยระบุว่าช่วยเสริมสร้างภูมิคุ้มกันโรค ส่วนฟลาโวนอยด์ที่ประกอบไปด้วยสารที่ต้านออกซิเดชันอย่าง รูติน คาเทคิน และลูทีโอลิน จะช่วยเสริมสร้างให้สารสกัดจากใบมะกอกโอลีฟมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น ซึ่งการทำงานร่วมกันระหว่างสารต้านออกซิเดชันและสารโพลีฟีนอลิกจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการปกป้องเซลล์ เพิ่มคุณสมบัติการต้านจุลชีพ และเพิ่มสมรรถภาพในการทำงานของหัวใจ และความแตกต่างระหว่างสารสกัดจากใบมะกอกโอลีฟและน้ำมันมะกอกโอลีฟ พบว่า สารสกัดจากใบมะกอกโอลีฟมีปริมาณสารฟีนอลิกสูงกว่าน้ำมันมะกอกโอลีฟบริสุทธิ์ชนิดพิเศษ (ภาวะความเป็นกรดน้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์) ถึง 40 เท่า จากผลการทดสอบที่จัดทำโดยกรมส่งเสริมอุตสาหกรรมการเกษตรแห่งนิวเซาท์เวลล์ (The New South Wales Department of Primary Industries' Agricultural Institute) รายงานว่า สารสกัดจากใบมะกอกโอลีฟมีปริมาณสารฟีนอลถึง 6,360-8,190 มิลลิกรัม ในขณะที่น้ำมันมะกอกโอลีฟบริสุทธิ์ชนิดพิเศษมีปริมาณสารฟีนอลเพียงแค่ 200-800 มิลลิกรัมเท่านั้น นอกจากสารสกัดจากใบมะกอกโอลีฟจะมีระดับปริมาณสารต้านออกซิเดชันที่สูงกว่าแล้วยังไม่มีปริมาณไขมันสูงอย่างเช่นน้ำมันมะกอกโอลีฟอีกด้วย (นิรนาม, 2009)

8. สารต้านออกซิเดชัน

สารต้านออกซิเดชัน (antioxidant) คือสารที่ทำหน้าที่ยับยั้งหรือต่อต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันหรือสารที่สามารถขจัดอนุมูลอิสระออกจากร่างกาย โดยสารอนุมูลอิสระ (free radical) เป็นสารโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยวอยู่ในวงรอบของอะตอม ซึ่งไม่มีความเสถียรและพยายามจับคู่กับอิเล็กตรอนเดี่ยวอื่น ดังนั้น อนุมูลอิสระจึงมีคุณสมบัติเฉพาะคือ มีความไวสูงในการเกิดปฏิกิริยา

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กับโมเลกุลอื่นเรียกว่า ปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) บทบาทสำคัญของสารต้านออกซิเดชันคือ ป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในร่างกาย ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคต่างๆ ของมนุษย์ และป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันที่เป็นสาเหตุหลักของการเสื่อมคุณภาพในอาหาร ดังนั้น สารต้านออกซิเดชันจึงสามารถช่วยลดโอกาสเสี่ยงต่อการเกิดโรคต่างๆ เช่น โรคหัวใจ โรคเบาหวาน โรคความดันโลหิตสูง โรคมะเร็ง และความผิดปกติของระบบภูมิคุ้มกัน เป็นต้น นอกจากนี้สารต้านออกซิเดชันยังช่วยชะลอการเสื่อมสภาพของผิว โดยการลดจำนวนเซลล์ที่ถูกทำลาย (มลศริ, 2540; โอภา 2550) โดยทั่วไปสารต้านออกซิเดชันสามารถพบได้ในธรรมชาติจากสารหลายชนิด เช่น สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) สารประกอบไนโตรเจน (nitrogen compounds) และฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ซึ่งประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิลที่เกาะบนวงเบนซีน (aromatic hydroxyl) ตั้งแต่ 2 หมู่ขึ้นไป หมู่ฟังก์ชัน (functional group) เหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการดักจับอนุมูลอิสระไม่ให้ไปกระตุ้นหรือก่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ โดยการให้อนุมูล $H^{\cdot}$ แก่อนุมูลอิสระเหล่านั้น นอกจากนี้สารประกอบโพลีฟีนอลที่มีโครงสร้างของ ortho-dihydroxyl phenol อยู่ในโมเลกุลยังสามารถยับยั้งการเกิดอนุมูล $OH^{\cdot}$ ในปฏิกิริยาที่มีอนุมูลโลหะทรานซิชัน คือ Fe^{2+} และ Cu^{2+} เป็นตัวเหนี่ยวนำได้โดยการเข้าจับกับโลหะดังกล่าวเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน (complex compound) (Sanchez-Moreno *et al.,* 2000) ดังนั้นจึงมีการคิดวิธีทดสอบความสามารถรวมในการต้านออกซิเดชันซึ่งเป็นการรวมองค์ประกอบทั้งหมดหรือสภาวะรีดอกซ์โดยรวม โดยหลักการวัดสมบัติการต้านออกซิเดชันสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มหลัก ดังนี้

1. วิธีการที่วัดการแลกเปลี่ยนอะตอมไฮโดรเจน (based on hydrogen atom transfer reaction; HAT)

สารประกอบฟีนอลจะทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระและไอออนของโลหะที่สามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันและโมเลกุลอื่นๆ ด้วยการให้อะตอมไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระอย่างรวดเร็ว เมื่อสารประกอบฟีนอลให้อะตอมไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระไปแล้ว อนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลจะค่อนข้างมีเสถียรภาพ ดังนั้นจึงไม่ทำปฏิกิริยาอื่นต่อไป ดังแสดงในสมการที่1 (โอภา, 2550) ยิ่งไปกว่านั้นอนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลบางชนิดยังคงสามารถรวมตัวกับอนุมูลอิสระอื่นได้อีกด้วย จึงทำให้สารประกอบฟีนอลเหล่านั้นลดจำนวนอนุมูลอิสระลงได้ถึง 2 เท่า ตัวอย่างของการวัดด้วยวิธีนี้ คือ Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) assay เป็นวิธีการวัดสมบัติการต้านออกซิเดชัน โดยอาศัยหลักการลดลงของแสงฟลูออเรสเซนซ์เมื่อวัดด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงฟลูออเรสเซนซ์ โดยเมื่อฟลูออเรสซีนทำปฏิกิริยากับอนุมูลเพอร์ออก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ซิลแล้วความเข้มของแสงจะลดลง หากมีปริมาณสารต้านออกซิเดชันน้อยจะทำให้ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ลดลงอย่างรวดเร็ว แต่ถ้าปริมาณสารต้านออกซิเดชันมากจะทำให้ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ลดลงอย่างช้าๆ เนื่องจากอนุมูลอิสระต้องทำปฏิกิริยากับสารต้านออกซิเดชันจนหมดก่อนแล้วจึงทำปฏิกิริยากับฟลูออเรสซีน (วิวัฒน์, 2545)

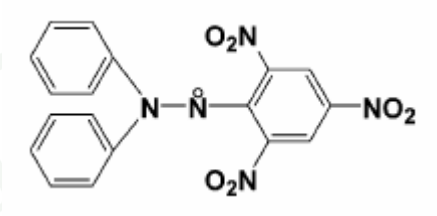
$$X^{\bullet} + AH \longrightarrow XH + A^{\bullet}$$ สมการ (1)

2. วิธีการที่วัดการแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอนเดี่ยว (based on single electron transfer reaction; SET)

หลักการของวิธีการ SET เป็นการหาความสามารถในการส่งผ่านอิเล็กตรอนไปรีดิวซ์สารอื่น ได้แก่ โลหะ และอนุมูลอิสระ เมื่อมีอนุมูลอิสระมาดึงอิเล็กตรอนไปแต่ในโครงสร้างมีอิเล็กตรอนหนาแน่นจึงสามารถเกิดการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนไปทั่วโครงสร้าง (delocalization) ทำให้โครงสร้างเสถียรไม่เกิดเป็นสารอนุมูลอิสระต่อไป (Pietta, 2000) ซึ่งปฏิกิริยานี้จะมีการเปลี่ยนแปลงสีเมื่อเกิดการแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอน โดยการเปลี่ยนสีจะสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารต้านออกซิเดชัน คือ ถ้าสารต้านออกซิเดชันมีความเข้มข้นมากสีของสารละลายก็จะซีดจางลงอย่างรวดเร็ว ตัวอย่างที่ใช้วิธีการนี้ คือ 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging capacity assay Total phenols assay by Folin Ciocalteu reagent (FCR) Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay และ Ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) assay เป็นต้น โดยกลไกการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารจำพวกฟีนอลจะเกิดจากการให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ DPPH ของสารจำพวกฟีนอล ซึ่งอนุมูลอิสระ DPPH ในสารละลายจะมีสีม่วง เมื่อสารจำพวกฟีนอลให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ DPPH จะได้เป็นสาร DPPH ที่มีโครงสร้างเสถียรและไม่เป็นสารอนุมูลอิสระต่อไป ซึ่งจะเห็นเป็นสีเหลืองนวล (ขั้นที่ 1) ส่วน phenoxy radical ที่เกิดขึ้นจะจับกัน ทำให้ปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิดอนุมูลอิสระหมดไป (ขั้นที่ 2) แล้วนำมาทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร แล้วรายงานผลเป็นค่าความสามารถในการต้านออกซิเดชัน (antiradical efficiency, AE) (Kim *et al*., 2002; Amic *et al,* 2003) ข้อดีของวิธีนี้คือ ง่าย แม่นยำ ใช้เวลาน้อย และนิยมใช้เป็นวิธีเบื้องต้นในการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ ส่วนข้อด้อยของวิธีนี้คือ อนุมูลอิสระ DPPH มีความคงตัวไม่ไวต่อปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลที่เกิดในเซลล์หรือร่างกาย ดังนั้น วิธีนี้จึงไม่สามารถใช้จัดอันดับอนุมูลที่มีความไวสูงได้ นอกจากนี้อิเล็กตรอนเดี่ยวของอนุมูลอิสระ DPPH จะถูกบดบังด้วยวงเบนซีน 3 วงและหมู่ไนโตรใน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

โครงสร้าง (ภาพที่ 4) ทำให้สารต้านอนุมูลอิสระที่มีฤทธิ์แรงแต่มีขนาดใหญ่ไม่สามารถเข้าไปทำปฏิกิริยาขจัดอนุมูลอิสระหรือเกิดปฏิกิริยาช้ากว่าความเป็นจริง อีกทั้งสารรีดิวซ์ยังสามารถทำให้สีของอนุมูลอิสระ DPPH จางลงได้อีกด้วย (โอภา, 2550)



ภาพที่ 4 โครงสร้างของอนุมูลอิสระ DPPH

ที่มา: Huang *et al.* (2005)

ส่วนวิธี Folin-Ciocalteu method เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณ Total phenolics ในพืชผัก ผลไม้ และเครื่องดื่มต่างๆ เช่นเดียวกับวิธี Folin-Denis แต่มีความแตกต่างกันของ reagent ที่ใช้บางตัวโดยทั้งสองวิธีนี้จะอาศัยปฏิกิริยารีดอกซ์ในการทำให้เกิดปฏิกิริยา เนื่องจากมี molybdotungstate ion เหมือนกัน โดย reagent ของ Folin-Denis method ประกอบด้วย sodium tungstate phosphomolybdic acid orthophosphoric acid และ sodium bicarbonate ส่วน Folin-Ciocalteu reagent ประกอบด้วย sodium tungstate sodium molybdate phosphoric acid และ sodium carbonate โดยจะติดตามการเปลี่ยนแปลงสีจากปฏิกิริยาของไอออน Mo(VI) ซึ่งมีสีเหลือง เมื่อได้รับอิเล็กตรอนจากสารต้านออกซิเดชัน แล้วจะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของ Mo(V) ซึ่งมีสีน้ำเงิน เช่นเดียวกับปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น สารฟีโนเลตนั้นสามารถรีดิวซ์ FCR ให้เกิดเป็นสีน้ำเงิน ดังแสดงในสมการที่ 2 (Huang *et al.,* 2005) ซึ่งเมื่อนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 นาโนเมตร และนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิกที่มีความเข้มข้นต่างๆ แล้วสามารถรายงานผลเป็นสมบัติการให้อิเล็กตรอนได้ในหน่วยกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อ100 กรัมของน้ำหนักแห้ง ข้อดีของวิธีนี้ก็คือ สะดวก ง่าย รวดเร็ว และมีความแม่นยำ (Prior *et al*., 2005)

$$Mo(VI) + e^{-} \longrightarrow Mo(V)$$ สมการ (2)

สีเหลือง สีน้ำเงิน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กระบวนการผลิตชา

1. ประเภทของชา

การแบ่งประเภทของชาตามระยะเวลาการหมักแบ่งได้เป็น 3 ประเภท ดังนี้

1.1 ชาที่ไม่ผ่านการหมัก

ชาเขียวตามคำจำกัดความกล่าวไว้แล้วหมายถึง ชาที่ได้จากกระบวนการผลิตที่ไม่ผ่านขั้นตอนการหมัก (non-fermented tea processing) โดยการหลีกเลี่ยงและป้องการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันระหว่างสารในกลุ่มโพลีฟีนอล (polyphenols) กับเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส (polyphenoloxidase) ในใบชาสด ซึ่งการหยุดหรือยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาเคมีนั้นทำได้โดยการใช้ความร้อนสูงไปทำให้เอนไซม์เสียสภาพ ไม่สามารถไปเปลี่ยนแปลงสารในกลุ่มโพลีฟีนอลให้กลายเป็นสารเคมีชนิดอื่นได้ เช่น การคั่ว การลวก หรือการนึ่งด้วยไอน้ำ ดังนั้น ชาเขียวจึงเป็นชาที่มีการคงอยู่ของปริมาณคาเทคิน (catechin) อยู่สูงเมื่อเทียบกับชาชนิดอื่น ทำให้มีการใช้ชื่อของชาเขียวหรือ green tea กันอย่างแพร่หลายเพื่อกล่าวอ้างถึงสรรพคุณในการใช้ประโยชน์ทางด้านสุขภาพ เนื่องมาจากการมีคุณสมบัติในด้านการป้องกันและรักษาโรคของสารในกลุ่มคาเทคินที่ยังคงอยู่ในปริมาณสูงในชาเขียวนั่นเอง (วัฒน์ระวี, 2549) และโดยทั่วไปแล้ว การผลิตชาเขียวจะได้ผลิตภัณฑ์ออกมาเป็นชาแห้งที่มีลักษณะใบม้วนเป็นเส้นชา เมื่อผ่านการลวกหรือชงชาด้วยน้ำร้อนใบชาจะคลายตัวออกมาเป็นรูปใบที่เป็นกากชา ซึ่งจะสังเกตเห็นลักษณะที่เป็น “สองใบกับหนึ่งยอด” ของวัตถุดิบได้ชัดเจน

จากกระบวนการผลิตชาเขียวที่ไม่ผ่านขั้นตอนการผึ่ง (withering) และผ่านการหมัก (fermentation) ทำให้กลิ่นรสของชาเขียวส่วนใหญ่นั้นจะขึ้นเกิดจากความร้อนในกระบวนการทำแห้ง (firing) ชาเขียวจะมี 2 ชนิดที่เป็นที่รู้จักกันโดยทั่วไป คือ เซ็น-ชา (sen-cha) ของประเทศญี่ปุ่น และคาไมริ-ชา (kamairi-cha) ของจีน ชาเขียวทั้ง 2 ชนิดนี้จะแตกต่างกันที่วิธีการให้ความร้อนเพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในระยะแรกของกระบวนการผลิต โดยขั้นตอนการทำให้เอนไซม์เสียสภาพด้วยไอน้ำร้อนอย่างความรวดเร็วจะเป็นเทคนิคการผลิตชาเขียวแบบญี่ปุ่น นั่นคือ การนำเอาใบชาสดมาให้ความร้อนด้วยการนึ่งใบสดด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 95-100 องศาเซลเซียส ความร้อนจะยับยั้งเอนไซม์ไม่ให้ทำปฏิกิริยากับสารในใบชาและยังคงความเขียวสดของใบชาไว้ได้ ใบชาที่ผ่าน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การนึ่งแล้วจะนำมาผ่านลูกกลิ้งซึ่งปรับให้มีอุณหภูมิต่างกัน โดยชุดแรกจะมีอุณหภูมิ 70 องศา-เซลเซียส ชุดที่ 2 จะมีอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ชุดที่ 3 อาจจะมีอุณหภูมิสูงถึง 160 องศาเซลเซียส ก่อนที่จะทำการทำแห้งและอบใบชาที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ส่วนเทคนิคการทำชาเขียวแบบจีน นิยมใช้วิธีการคั่วด้วยความร้อนเป็นการทำให้เอนไซม์เสียสภาพหรือจะใช้การอบใบชาสดด้วยถ่านที่ไม่มีควัน วิธีการนี้เรียกว่า พาชชิ่ง (parching) ชาเขียวชนิดนี้หลังจากผ่านการอบด้วยถ่านจะผ่านการนวด การร่อน เพื่อจำแนกขนาดใบและผ่านการทำแห้งเช่นเดียวกับชาปกติทั่วไป (สิริ, 2545) เพื่อเป็นการลดความชื้นและการเกิดปฏิกิริยาต่างๆ ในใบชา จนทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ชาที่แห้ง มีกลิ่นหอม และมีลักษณะทางกายภาพตามที่ต้องการ นอกจากนี้ เทคนิคการผลิตชาเขียวในแต่ละโรงงานจะมีลักษณะเฉพาะที่แตกต่างกัน บางโรงงานก็จะมีเทคนิคที่เป็นความลับ เพื่อให้ได้ชาเขียวที่มีเอกลักษณ์เฉพาะและเป็นที่นิยมของผู้บริโภค

1.2 ชากึ่งหมัก

ชากึ่งหมักเกิดจากกระบวนการผลิตชาที่เป็นแบบ semi-fermentated tea processing กล่าวคือ ในขั้นตอนการผลิตจะมีการปล่อยให้เกิดหมักในบางส่วน ชากึ่งหมักที่นิยมดื่มกัน ได้แก่ ชาเหลือง (yellow tea) และชาแดง (red tea) ในการผลิตชากึ่งหมักนั้นจะมีวิธีการที่ค่อนข้างประณีตละเอียดอ่อนและต้องการผู้เชี่ยวชาญในการดูแลการผลิตอย่างใกล้ชิด รวมทั้งต้องการเทคโนโลยีการผลิตที่ค่อนข้างซับซ้อนเพื่อให้ได้ชาที่มีกลิ่นหอม มีรสชาติดี โดยชาเหลืองจะผ่านกระบวนการผึ่งชาให้เหี่ยวเป็นระยะเวลาสั้นๆแต่ไม่ผ่านการหมักแล้วอบแห้ง การผึ่งชาจะทำให้สารในใบชาเกิดการเปลี่ยนแปลง น้ำชาที่ชงจากใบชาเหลืองจะมีสีเข้มกว่าน้ำชาที่ชงจากใบชาเขียว รสชาติของชาเหลืองจะอยู่ระหว่างชาเขียวกับชาดำ โดยจะมีความใกล้เคียงกับชาเขียวมากกว่าชาดำ ส่วนชาแดง เช่น ชาอูหลง (oolong) และชาเปาจ้ง (pouchong) เป็นชาที่ผ่านการหมักเล็กน้อย โดยจะมีการหมักที่ใช้ระยะเวลาสั้นกว่าชาดำ กลิ่นรสจะคล้ายชาดำมากกว่าชาเขียว เมื่อชงจะได้น้ำชาสีน้ำตาลออกแดง ชาอูหลงจะผ่านการหมักร้อยละ 50 ส่วนชาเปาจ้งจะผ่านการหมักเพียงร้อยละ 30 ในกระบวนการผลิตชาแดงนั้นจะนำใบชามาผึ่งแดดให้เหี่ยว 5-20 นาที จากนั้นนำมาหมักในที่ร่ม 2-4 ชั่วโมง ส่วนการทำแห้งจะใช้อุณหภูมิสูงในช่วงแรกและค่อยๆ ลดอุณหภูมิให้ต่ำลง (สิริ, 2545) โดยมีลำดับขั้นตอนดังแสดงในตารางที่ 2

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 2 อุณหภูมิและระยะเวลาที่ใช้ในขั้นตอนการทำแห้ง

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)
230	8-10
150	10
110	15
100	30
80	60

ที่มา : ดัดแปลงจาก สิริ (2545)

ในกระบวนการผลิตชากึ่งหมักมีหลักสำคัญที่ทำให้เกิดการหมัก ได้แก่ การปล่อยให้ใบชาสดผึ่งทั้งแบบกลางแดด (solar withering) และผึ่งในร่ม (indoor withering) ซึ่งการผึ่งในร่มในบางโรงงานจะมีการปรับอุณหภูมิให้คงที่ โดยใช้ห้องที่มีเครื่องปรับอากาศปรับอุณหภูมิการผึ่งให้เหมาะสม แต่เนื่องด้วยเทคโนโลยีที่ทันสมัยกระบวนการผลิตที่ซับซ้อน และต้นทุนการผลิตสูง ทำให้ราคาของชาอูหลงนั้นมีราคาค่อนข้างสูง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของพันธุ์ชาที่นำมาผลิตเป็นองค์ประกอบ เช่น ชาอูหลงพันธุ์อูหลงก้านอ่อนเป็นชาที่นิยมปลูกและผลิตในจังหวัดเชียงราย ชาที่ได้จะเป็นชาคุณภาพดี ราคาค่อนข้างสูง และพบได้ในร้านชาทั่วไป เป็นต้น นอกจากนี้พันธุ์ชาจีนชนิดอื่นๆ ก็สามารถนำมาผลิตชาอูหลงที่มีคุณภาพดีได้ ชาอูหลงที่มีการผลิตโดยทั่วไปในจังหวัดเชียงรายจะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะใบม้วนเป็นเม็ด เมื่อชงหรือลวกด้วยน้ำร้อนใบชาจึงจะเกิดการคลายตัวเป็นรูปใบที่สมบูรณ์ (ไพโรจน์, 2532)

1.3 ชาหมัก

ชาหมักหรือชาดำ (black tea) จัดอยู่ในกลุ่มของชาที่มีการผลิตแบบ fermented tea processing หมายถึง เป็นการผลิตชาที่มีปล่อยให้เกิดหมักอย่างสมบูรณ์ สารในกลุ่มโพลีฟีนอลในใบชาสดจะเปลี่ยนไปเป็นสารอื่นๆ ซึ่งก็ได้แก่ สารพวก theaflavins และ thearubigins ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่เมื่อชงดื่มแล้วจะได้ชาที่มีกลิ่นหอม น้ำชาจะมีสีน้ำตาลแดงเข้ม ตัวอย่างเช่น ชาลิปตัน ชาดำนั้นจะเป็นชาที่มีผู้บริโภคสูงสุดในโลกเมื่อเทียบกับชาชนิดอื่น คนในประเทศแถบยุโรปโดยเฉพาะอังกฤษนิยมดื่มชาดำยามบ่ายตั้งแต่สมัยที่มีการนำเข้าชาจากอินเดียที่เป็นเมืองขึ้นในสมัย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นั้นและยังเป็นเครื่องดื่มที่นิยมเรื่อยมาจนถึงปัจจุบัน การผลิตชาดำนั้นมีมากในประเทศแถบอินเดีย ศรีลังกา ในประเทศไทยนั้นพบว่า มีการผลิตชาดำกันในบางพื้นของจังหวัดเชียงรายโดยเฉพาะเขต อำเภอเวียงป่าเป้า พันธุ์ชาที่ใช้ผลิตชาดำนั้น ได้แก่ ชาพันธุ์อัสสัมที่ให้รสชาติของชาเข้มข้นและมีกลิ่นหอม การดื่มชาดำนิยมผสมน้ำตาลและนมลงไปเพื่อเพิ่มรสชาติ ในบางโรงงานที่ผลิตจะมีการเติมสีผสมอาหารลงไปให้ได้ชาที่มีสีแดงส้มเพื่อใช้ชงดื่มเป็นชาเย็นซึ่งเป็นที่นิยมของคนไทยในปัจจุบัน ขั้นตอนในกระบวนการผลิตที่เกิดการหมักในขั้นแรกจะอยู่ในขั้นตอนของการผึ่ง (withering) เป็นการเอาใบชาสดมาผึ่ง ก่อนเข้าขบวนการนวดและการหมัก ในขั้นที่สองจะอยู่ในขั้นตอนการหมัก (fermentation) ที่มีการปล่อยให้ปฏิกิริยาเคมีเกิดอย่างเต็มที่ก่อนที่จะมีการอบชาให้แห้งในขั้นตอนสุดท้าย การผลิตชาดำนั้นผลิตภัณฑ์ที่ได้อาจจะเป็นลักษณะใบที่แห้งแตกหัก และในบางครั้งในการผลิตนิยมใช้ใบชาแก่ๆ นอกเหนือจากส่วนที่เป็นสองใบกับหนึ่งยอดมาผลิตชาดำ ทำให้ชาดำนั้นมีราคาไม่แพงเมื่อเทียบกับชาที่ผลิตด้วยกระบวนการอื่นๆ

2. ขั้นตอนการผลิตชา

2.1 การผึ่งใบชา (withering)

การผึ่งใบชาจะใช้อุณหภูมิ 20-35 องศาเซลเซียส โดยอาจมีการใช้ลมเป่าที่อุณหภูมิห้องการเป่าด้วยลมร้อน หรือการใช้ลูกกลิ้ง (drum drying) การผึ่งใบชาปกติจะใช้เวลานาน 4-6 ชั่วโมง จะช่วยทำให้ใบชามีความชื้นลดลงจากเดิมร้อยละ 75 ลดลงเหลือร้อยละ 55-56 ซึ่งน้ำที่มีจำนวนมากนี้จะเป็นตัวขัดขวางการทำปฏิกิริยาเคมีของสารต่างๆ ในใบชา และในระหว่างการผึ่งชาจะมีการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีต่างๆ ในใบชา การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีจะเกิดขึ้นและสิ้นสุดลงภายใน 6-10 ชั่วโมงแรก เช่น ผนังเซลล์มีสภาพความซึมเพิ่มขึ้น สารในกลุ่มโพลีฟีนอลจะเข้มข้น เนื่องจากการที่ความชื้นลดลงทำให้สารต่างๆ ภายในใบชาเข้มข้น ช่วยทำให้เอนไซม์บางชนิดทำงานได้ดีขึ้น เช่น เอนไซม์ไลโพไลทิก เอซิลไฮโดรเลส (lipolytic acylhydrolase) เอนไซม์ไลพอกซีจีเนส (lipooxygenase) และเอนไซม์ไฮโดรเพอรอกซิเดส (hydroperoxidase) ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารเคมีในใบชา พบว่า ใบชาที่ผ่านการผึ่งจะมีปริมาณคาโรทีนอยด์ลดลงแต่จะมีปริมาณของ linalool และlinalool oxide สูง ซึ่งเป็นสารที่สำคัญในการให้กลิ่นรสใบชา ใบชาที่ไม่ผ่านการผึ่งจะมีสีสดแต่รสชาติของชาไม่เข้มข้น เนื่องจากอัตราการเกิดสารทีเฟลวิน (theaflavin, TF) ซึ่งมีสีเหลืองส้มจะสูงกว่าการเกิดสารทีรูบิจิน (thearubigin,TR) ซึ่งมีสีเข้มและมีผลต่อรสชาติของชา ชาที่ไม่ผ่านการผึ่งจะมีกลิ่นเหม็นเขียว ในการผึ่งใบชาจะเป็นการทำให้ใบชาเหี่ยวและอ่อนนุ่ม โดยมีประโยชน์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

คือ ไม่ทำให้ใบชาแตกหรือหัก เมื่อนำไปผ่านกระบวนการนวดใบชาในขั้นตอนถัดไป ใบชาจะม้วนตัวได้ดีไม่ฉีกขาดเป็นชิ้นเล็กๆ เนื่องจากน้ำยางที่ถูกบีบออกมาคลุกเคล้านั้นเข้มข้นและเหนียว ทำให้การหมักรวดเร็วและสม่ำเสมอ และทำให้ได้กลิ่นรสของชาดีขึ้น อีกทั้งยังสามารถประหยัดพลังงานในขั้นตอนการทำแห้งด้วย

2.2 การนวดใบชา (rolling)

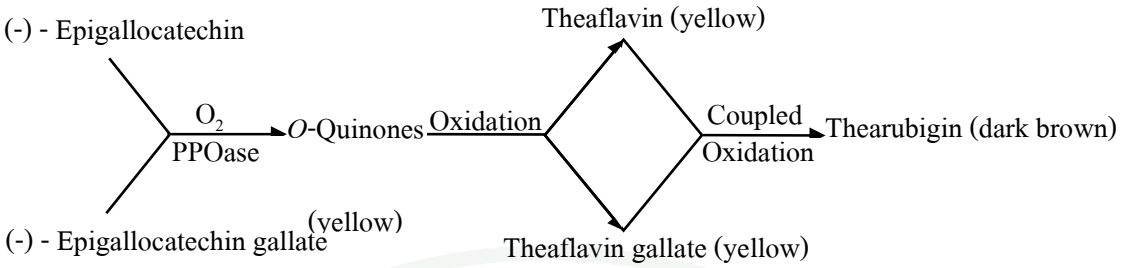
การนวดใบชามีวัตถุประสงค์หลัก คือ การทำให้เซลล์ของใบชาแตกออกโดยที่ใบชาไม่แตกหัก การที่เซลล์แตกออกนั้นจะทำให้เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสสามารถซึมผ่านผนังเซลล์ไปทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้น catechin polyphenols (flavanols) ซึ่งอยู่ที่ส่วนอื่นได้ ระยะนี้ถือว่าเป็นระยะแรกของการเกิดการหมักอย่างแท้จริงของใบชา และวัตถุประสงค์อีกประการคือ ทำให้ใบชาม้วนตัวแน่นและสวยงาม ซึ่งมีส่วนสัมพันธ์กับราคาของชาด้วย โดยการนวดอาจจะใช้วิธีแบบดั้งเดิมที่เรียกว่า ออธอดอกซ์ (orthodox) วิธีนี้เป็นวิธีการใช้มือในการคัด นวด และม้วนใบชา วิธีนี้เหมาะสำหรับการทำชาเขียวหรือชาอูหลงซึ่งจะได้ชาที่มีรสชาติดี แต่ข้อเสียคือ ใช้เวลาในการผลิตนาน ส่วนวิธีการนวดโดยใช้เครื่องจักรที่มีลูกกลิ้ง 2 ลูกหมุนเข้าหากัน ช่วงแรกจะเป็นการนวดเบาๆ เพื่อให้เอนไซม์กระจายตัวไปทั่วๆ เมื่อเอนไซม์กระจายตัวดีแล้วจึงม้วนแรงขึ้น โดยลูกกลิ้งทั้ง 2 จะหมุนเข้าหากันด้วยความเร็วที่แตกต่างกัน 70:700 รอบ/นาที การม้วนใบจะทำจนกระทั่งมีน้ำชาออกมาเคลือบ สำหรับอุตสาหกรรมขนาดใหญ่อาจมีวิธีการผลิตชาดำโดยใช้เครื่องจักรที่เรียกว่าเครื่อง crushing tearing and curling (CTC) โดยใช้หลักการคือ การตัดใบชา ใช้แรงบีบอัด และม้วนใบชาอย่างต่อเนื่อง วิธีการนี้จะใช้เวลาสั้นลงโดยลดระยะเวลาการผึ่งและการหมักลงเหลือเพียง 2-3 ชั่วโมง ในการผลิตอาจมีการตัดใบชาให้มีขนาดเล็กลง เช่น การใช้ legg cutter ใบชาจะถูกแรงดันผ่านไปตามช่องและถูกตัดเป็นเส้นๆ อย่างไรก็ตามการใช้เครื่องจักรจะทำให้ใบชาเกิดการแตกหักได้ จึงไม่สามารถใช้ในการผลิตชาประเภทใบเต็มแบบสมบูรณ์ได้ การใช้ CTC ในการผลิตจะได้ใบชาแบบไม่เต็มใบซึ่งจะแบ่งตามเกรดของใบชา อีกทั้งการใช้เครื่องจักรจะทำให้อุณหภูมิไม่เปลี่ยนแปลง เพราะการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิมีผลอย่างมากต่อใบชา (สิริ, 2545;ไพโรจน์, 2532)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.3 การหมักใบชา (fermentation)

การหมักใบชา เป็นขั้นตอนที่สำคัญของการผลิตชาดำ เนื่องจากเป็นขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาเคมีต่างๆ อย่างสมบูรณ์ ในการหมักนั้นจะต้องเกลี่ยใบชาให้มีความหนาประมาณ 5-7.5 เซนติเมตร ในห้องที่มืดและชื้น การเกลี่ยใบชาไม่ควรจะให้หนามากเกินไป เนื่องจากการหมักใบชานั้นต้องการออกซิเจน ถ้าชั้นของใบชาหนามากเกินไปอาจจะทำให้ออกซิเจนไม่เพียงพอสำหรับใบชาที่อยู่ด้านล่าง อุณหภูมิของห้องควรจะอยู่ในช่วง 35-40 องศาเซลเซียส โดยทั่วไปการหมักจะใช้เวลาประมาณ 45 นาที - 4 ชั่วโมง และหยุดการหมักเมื่อใบชามีสีน้ำตาลแดง (coppery red) และมีกลิ่นออกเปรี้ยว ถ้าใบชามีขนาดเล็กการหมักจะสิ้นสุดเร็วกว่าใบชาขนาดใหญ่ พื้นที่หมักใบชาจะต้องทำความสะอาดบ่อยๆ เนื่องจากน้ำในใบชา (tea juice) เป็นแหล่งอาหารที่ดีของเชื้อจุลินทรีย์ การเปลี่ยนแปลงของสารในระหว่างการหมักที่สำคัญ ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงของสารในกลุ่มฟีนอลไปเป็นสาร 2 ประเภท ได้แก่ theaflavin และ thearubigin ซึ่งเป็นผลจากเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส ใบชาอ่อนที่มีคุณภาพดีจะมีปริมาณสารในกลุ่มฟีนอล เช่น สารฟลาวานอล (flavanol) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของปฏิกิริยาในปริมาณสูง และเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสยังทำให้เกิดสีน้ำตาลขึ้นด้วย โดยสาร catechins จะถูกออกซิไดซ์เป็น *o*-quinone มีสีอมเหลือง และสาร *o*-quinone จะถูกออกซิไดซ์ต่อไปเป็น theaflavin และ theaflavin gallate ซึ่งมีรงควัตถุสีเหลือง สารประกอบทั้ง 2 นี้จะถูกออกซิไดซ์ต่อไปจนเกิดเป็น thearubigin ซึ่งมีสีน้ำตาลเข้มอันเป็นสีเฉพาะของชาดำ ดังแสดงในภาพที่ 5 ในการควบคุมคุณภาพของใบชาดำจะต้องพิจารณาคุณสมบัติด้านสีและความขม ซึ่งพบว่าสัมพันธ์กับปริมาณของ theaflavin ทั้งหมด ส่วนรสชาติเฉพาะของชาจะสัมพันธ์กับปริมาณของ theaflavin thearubigin และ caffeine นอกจากเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสที่มีส่วนในการผลิตชาที่มีคุณภาพแล้ว เอนไซม์เพอร์ออกซิเดสที่มีอยู่ในใบชาก็พบว่า มีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างคุณภาพชาด้วย โดยปฏิกิริยาของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสจะไปทำให้ phloroglucinol rings ของ theaflavin สลายตัว ซึ่งจะทำให้ได้ชาที่มีคุณภาพต่ำ ดังนั้นจึงต้องมีการควบคุมสายพันธุ์ของชาให้มีระดับเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสที่สูง เพื่อช่วยเพิ่มคุณภาพของชาดำ (สิริ, 2545; ปราณี, 2547)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

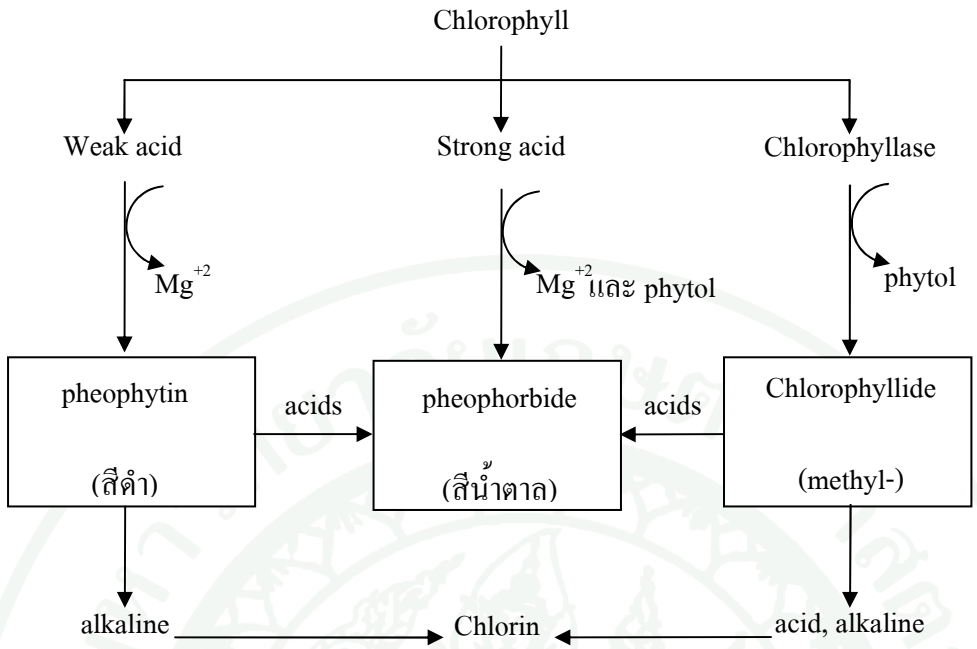


ภาพที่ 5 ปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารฟีนอลในระหว่างการหมักชาดำ

ที่มา: ปราณี (2547)

นอกจากนี้ การเปลี่ยนแปลงของคลอโรฟิลด์ไปเป็น phytol และ isophytol ซึ่งมีความสำคัญต่อสีแต่ไม่สำคัญต่อกลิ่นหมักมากนัก และในใบชายังมี oxalic acid, citric acid, isocitric acid และ succinic acid จึงมีโอกาสเกิด pheophorbide ซึ่งจะเกิดขึ้นในการหมัก ถ้าให้ความร้อนเข้าไปจะเป็นการหยุดกิจกรรมของเอนไซม์ทำให้เกิดเป็น pheophytin ที่อุณหภูมิสูงกว่า 75 องศาเซลเซียส ชาที่ได้จะมีสีดำ ดังแสดงในภาพที่ 6 ส่วนเอนไซม์ไลพอกซีจีเนสจะเร่งปฏิกิริยา peroxidation ของกรด linoleic และ linolenic ทำให้เกิดสารให้กลิ่นที่มีกลิ่นออกหวาน (sweetish) และมีกลิ่นเหม็นเขียวเล็กน้อย สารให้กลิ่นซึ่งเกิดจากปฏิกิริยานี้มีความสำคัญต่อกลิ่นโดยรวมของชา (สิริ, 2545; ไพโรจน์, 2535)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 6 ปฏิกิริยาการเกิดสีในระหว่างการหมักใบชาดำ (acids: oxalic acid, citric acid, isocitric acid)

ที่มา: ไพโรจน์ (2535)

2.4 การทำแห้งใบชา (firing)

หลังจากที่ใบชาผ่านการหมักแล้ว จะถูกนำไปผ่านการอบที่อุณหภูมิเริ่มแรก 87-95 องศาเซลเซียส ในช่วงหลังของการอบจะลดอุณหภูมิลงเหลือประมาณ 60 องศาเซลเซียส ใช้เวลาอบรวมประมาณ 20-22 นาที การอบแห้งนี้จะเป็นการไล่น้ำที่เหลือในใบชาออกจนแห้ง ทำให้ใบชามีความชื้นเหลืออยู่เพียงร้อยละ 3-5 ซึ่งการเปลี่ยนแปลงในระหว่างการอบแห้งนั้น นอกจากความชื้นจะลดลงแล้วยังมีผลในการยับยั้งกระบวนการหมักให้สิ้นสุดลง ระหว่างการอบแห้งจะทำให้เกิดปฏิกิริยาทำให้เกิดสีน้ำตาลที่เรียก millard browning reaction ทำให้สีของใบชาเปลี่ยนเป็นสีออกดำ และมีกลิ่นของใบชา สาร theaflavin เปลี่ยนเป็นสาร thearubigin เพิ่มมากขึ้น และเนื่องจากสารคลอโรฟิลล์เปลี่ยนเป็นสารฟีโอไฟติน (pheophytin) จะทำให้ใบชามีสีเข้มจนเกือบดำ อีกทั้งการอบใบชาถ้าใช้อุณหภูมิสูงเกินไป โดยเฉพาะถ้าสูงกว่า 120 องศาเซลเซียส จะสูญเสียกลิ่นรสของชาได้ เพราะการอบจะทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างโปรตีนและโพลีฟีนอล ทำให้ความฝาดลดลง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.5 การคัดเกรด (sorting)

การคัดเกรดของใบชาจะใช้การร่อนด้วยตะแกรง เพื่อจำแนกใบชาตามความสมบูรณ์ของใบชา การคัดเกรดควรจะทำให้เร็วที่สุดไม่ควรปล่อยใบชาทิ้งไว้นานก่อนการบรรจุ เนื่องใบชาจะดูดความชื้นจากอากาศได้ดี

2.6 การบรรจุ (packaging)

การเก็บรักษาใบชาแห้งให้คงกลิ่นรสที่ดีอยู่ได้ ควรจะป้องกันใบชาจากความร้อน อากาศ แสง และความชื้น เนื่องจากปัจจัยเหล่านี้จะทำห้าสารให้กลิ่นของใบชาเกิดการเสื่อมสลายจากปฏิกิริยาออโตออกซิเดชัน (autooxidation) และไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ในการบรรจุใบชาจึงควรเลือกภาชนะบรรจุที่ป้องกันใบชาจากปัจจัยที่ทำให้ใบชาเสื่อมเสีย การบรรจุใบชาหลังการทำแห้งอาจทำในขนาดภาชนะใหญ่ 20-50 กรัม มักจะใช้ภาชนะทำจากไม้ แล้วบุด้วยอะลูมิเนียมหรือพลาสติก เพื่อป้องกันแสง อากาศ และความชื้น ในปัจจุบันนิยมใช้ถุงกระดาษคราฟท์หลายชั้นหรือกล่องกระดาษลูกฟูก

3. การเก็บรักษาใบชา

การเก็บรักษาใบชาควรเก็บที่อุณหภูมิต่ำกว่า 30 องศาเซลเซียส ปกติแล้วใบชาจะมีอายุการเก็บ 5-6 เดือนจะสูญเสียกลิ่นรสที่ดี เนื่องจากปฏิกิริยาออโตออกซิเดชันและไฮโดรไลซิส การเก็บจึงควรป้องกันแสง อากาศ ความชื้น และไม่ควรนำภาชนะที่มีกลิ่นมาบรรจุใบชาหรือเก็บใบชาไว้ใกล้กับอาหารหรือสิ่งของที่มีกลิ่น เพราะใบชามีคุณสมบัติที่ดีในการดูดกลิ่น อีกทั้งในระหว่างการเก็บรักษาใบชาจะเกิดการเปลี่ยนแปลงได้ ในช่วงสัปดาห์แรกๆ ของการเก็บคุณภาพกลิ่นชาจะดีขึ้น เรียกระยะนี้ว่า maturation แต่หลังจากผ่านระยะนี้ไปแล้ว คุณภาพกลิ่นชาจะลดลงเนื่องจากการไฮโดรไลซิสของไขมัน ทำให้เกิดกลิ่นเหม็นหืน การเกิดออกซิเดชันของสารในกลุ่มโพลีฟีนอล การเกิดสารประกอบฟีนอลิกที่ระเหยได้ ทำให้เกิดกลิ่นชาเก่า และการเกิด non-enzymatic browing reaction (สิริ, 2545)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. วัตถุดิบ

ใบมะกอกโอลีฟ 4 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ Arbequina สายพันธุ์ Hojiblanca สายพันธุ์ Manzanillo และสายพันธุ์ Picual (ภาพผนวกที่ จ) เก็บเกี่ยวจากแปลงทดลองคณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

2. สารเคมี

2.1 เอทานอล (Ethanol; C_2H_5OH: Analytical grade, Mallinckrodt Baker Inc., Merck, Germany)

2.2 เมทานอล (Methanol; CH_3OH: HPLC grade, Mallinckrodt Baker Inc., Phillipsburg, New Jersey, U.S.A.)

2.3 กรดแกลลิก (Gallic acid; $(HO)_3C_6H_2CO_2H$: Analytical grade, Sigma-Aldrich, St. Louise, U.S.A.)

2.4 โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate; Na_2CO_3: Analytical grade, Ajax Finechem, Auckland, New Zealand)

2.5 โฟลิน-ซีโอเคาทู (Folin-Ciocalteu reagent; Analytical grade, Sigma-Aldrich, St. Louise, U.S.A.)

2.6 กรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid; $C_6H_8O_6$: food grade, ห้างหุ้นส่วนจำกัดแซทเทอร์น เคมิคอล, ประเทศไทย)

2.7 2, 2-ไดฟีนิล-1-ไพคริล-ไฮดราซิล; (2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) (DPPH, Aldrich, Steinheim, Germany)

2.8 คาเทคิน ((+)-Catechin hydrate minimum 98%: HPLC grade, Sigma-Aldrich, St. Louise, U.S.A.)

2.9 โซเดียมไนไตรท์ (Sodium nitrite; $NaNO_2$: Analytical grade, Ajax Finechem, Auckland, New Zealand)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.10 อะลูมิเนียมคลอไรด์ (Aluminium chloride; $AlCl_3.6H_2O$: Analytical grade, Ajax Finechem, Auckland, New Zealand)

2.11 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide; NaOH: Analytical grade, Merck, Germany)

2.12 อะซีโตรไนไตรล์ (Acetronitrile; CH_3CN: HPLC grade, RCI Labscan Limited , Bangkok, Thailand)

2.13 กรดอะซิติก (Acetic acid; CH_3COOH: Analytical grade, Merck, Germany)

2.14 Double Deionized Water (ระบบ milli-Q , Millpore, U.S.A)

2.15 โอเลยูโรเปอิน (Oleuropein; $C_{25}H_{32}O_{13}$, HPLC grade, Sigma-Aldrich, St. Louise, U.S.A.)

2.16 ลูทีโอลิน (Luteolin; $C_{15}H_{10}O_6$, HPLC grade, Extrasynthese, France)

2.17 ลูทีโอลิน 7-โอ-กลูโคไซด์ (Luteolin-7-O-glucoside; $C_{21}H_{20}O_{11}$, HPLC grade, Extrasynthese, France)

2.18 ลูทีโอลิน 4′-โอ-กลูโคไซด์ (Luteolin-4′-O-glucoside; $C_{21}H_{20}O_{11}$, HPLC grade, Extrasynthese, France)

2.19 นารินจิน (Naringin; $C_{27}H_{32}O_{14}$, HPLC grade, Sigma-Aldrich, St. Louise, U.S.A.)

3. อุปกรณ์และเครื่องมือ

3.1 เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatograph: HPLC) (Model Waters 600, Waters, U.S.A.) ต่อกับเครื่องตรวจวัด UV diode-array detector (Model Waters 996, Waters, U.S.A.)

3.2 คอลัมน์ชนิด C-18 ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 3.9 มิลลิเมตร ความยาว 150 มิลลิเมตร (Symmetry®, Waters, U.S.A)

3.3 ตัวกรองชนิด Nylon ขนาด 0.45 ไมโครเมตร (Water, USA)

3.4 เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Model Spectronic Genesys 10 UV Scanning Thermo Electron Corporation, U.S.A.)

3.5 ตู้อบลมร้อนแบบถาด (Tray dryer: Produce by RELIANCE TECH-SERVICE Co., Ltd.)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.6 เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze dryer: Heto Model FD 2.5, Heto Lab Equipment A/S, Denmark)

3.7 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven, Memmert, English)

3.8 เครื่องปั่นเป็นเนื้อเดียวกัน (Disperser T10 basic, IKA® - Werke GMBH & CO.KG, German)

3.9 เครื่องหมุนเหวี่ยง (Sorvall RC 6+, Thermo Scientific, U.S.A)

3.10 เครื่องผสมสารละลาย (Vortax-2 genie, Scientific industries, U.S.A)

3.11 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (Series extend, Sartorius, German)

3.12 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Series extend, Sartorius, German)

3.13 เครื่องสั่นสะเทือนโดยคลื่นเสียง (ultrasonicator) (Powersonic™ ultrasonic cleaner, Chest ultrasonics, Malaysia)

3.14 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (Orion 2 star pH benchtop, Thermo scientific, U.S.A)

3.15 ตู้แช่เยือกแข็ง (Freezer) (SF-C995(GYN), Sanyo, Thailand)

3.16 เครื่องผลิตน้ำ DI (Model simpakor1, Millipore, U.S.A.)

3.17 นาฬิกาจับเวลา (Digital timer, Model TMR-71, Casio, China)

3.18 เครื่องปั่นผสม (Blender, Model R201 ultra, Robot coupe, U.S.A.)

3.19 เทอร์โมมิเตอร์ (Thermometer)

3.20 ปิเปตอัตโนมัติ (Autopipette, Gilson, France)

3.21 ชุดกรอง mobile phase HPLC

3.22 ถ้วยอะลูมิเนียม (Aluminium disc)

3.23 ตู้ดูดความชื้น (Dessicator)

3.24 ชุดเครื่องแก้วมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิธีการ

1. การศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของตัวทำละลายต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และความสามารถต้านออกซิเดชันของใบมะกอกโอลีฟ

1.1 การเตรียมตัวอย่าง

นำใบมะกอกโอลีฟสายพันธุ์ Hojiblanca มาลิดใบออกจากกิ่งแล้วทำความสะอาดด้วยการล้างน้ำและผึ่งให้แห้ง แช่ไนโตรเจนเหลว 2 นาที บดให้ละเอียดเป็นผง วิเคราะห์ความชื้นตามวิธีการของ AOAC (2000) (ภาคผนวก ก)

1.2 การสกัด

สกัดใบมะกอกโอลีฟด้วยตัวทำละลายเอทานอล (40%, 60%, 80% และ 100%) และเมทานอล (40%, 60%, 80% และ 100%) โดยใช้วิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Japón-Luján *et al*. (2006) และ Boudhrioua *et al*. (2009) โดยนำใบมะกอกโอลีฟที่ผ่านการเตรียมจากข้อ 1.1 จำนวน 1 กรัม สกัดด้วยตัวทำละลายปริมาตร 12.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดหมุนเหวี่ยงขนาด 50 มิลลิลิตร นำไปปั่นผสมด้วยเครื่องปั่นเป็นเนื้อเดียวกันที่ความเร็วเบอร์ 4 นาน 2 นาที จากนั้นนำไปเหวี่ยงให้ตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำสารละลายส่วนใสใส่ขวดปรับปริมาตรและนำส่วนกากที่ได้ไปสกัดอีกครั้ง จากนั้นปรับปริมาตรสารละลายส่วนใสทั้งหมดในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตรด้วยตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด เก็บใส่ขวดสีชาในตู้แช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ทำการสกัดด้วยตัวทำละลายอย่างละ 2 ซ้ำ เพื่อตรวจสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และคุณสมบัติในการต้านออกซิเดชัน

1.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

ตรวจสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดโดยวิธี total phenols assay ที่ดัดแปลงจากวิธีของ Boudhrioua *et al*. (2009) โดยปิเปตสารสกัด 0.1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมโฟลิน-ซีโอเคาทู 0.1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้นาน 6 นาที เติมโซเดียม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

คาร์บอเนตความเข้มข้น 7% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร วางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 90 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดแต่ละสารสกัดอย่างละ 3 ซ้ำ นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานกรดแกลลิกความเข้มข้น 20-100 ppm (ภาคผนวก ค1) รายงานผลเป็นปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (มิลลิกรัมสมมูลของสารมารตฐานกรดแกลลิกในน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง 100 กรัม)

1.4 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

ตรวจสอบปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดโดยวิธีของ Kim *et al.* (2003) โดยปิเปตสารสกัดปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร และไซเดียมไนไตรท์ความเข้มข้น 5% ปริมาตร 0.15 มิลลิลิตร แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมอะลูมิเนียมคลอไรด์ความเข้มข้น 10% ปริมาตร 0.15 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 6 นาทีแล้วเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 1.2 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 510 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดแต่ละสารสกัดอย่างละ 3 ซ้ำ นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานคาเทคินความเข้นข้น 20- 100 ppm (ภาคผนวก ค2) รายงานผลเป็นปริมาณสารประกอบฟลาโว-นอยด์ทั้งหมด (มิลลิกรัมสมมูลของสารมาตรฐานคาเทคินในน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง 100 กรัม)

1.5 การวิเคราะห์คุณสมบัติในการต้านออกซิเดชันด้วยวิธี 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH radical scavenging capacity)

ตรวจสอบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ DPPH โดยใช้วิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Singh *et al.* (2002) โดยนำสารสกัด 0.1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ วิเคราะห์สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ DPPH แต่ละสารสกัดอย่างละ 3 ซ้ำ นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกความเข้นข้น 20- 100 ppm (ภาคผนวก ค3) รายงานผลเป็นสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ DPPH (มิลลิกรัมสมมูลของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกในน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง 100 กรัม)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. การศึกษาผลของสายพันธุ์ใบมะกอกโอลีฟต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และความสามารถต้านออกซิเดชัน

2.1 การเตรียมตัวอย่าง

เตรียมใบมะกอกโอลีฟสายพันธุ์ Arbequina สายพันธุ์ Hojiblanca สายพันธุ์ Manzanillo และสายพันธุ์ Picual แบ่งเป็น 2 ส่วน โดยส่วนที่ 1 เตรียมตามวิธีการเตรียมตัวอย่างในข้อ 1.1 และส่วนที่ 2 นำไปแช่ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสข้ามคืน จากนั้นจึงนำไปจุ่มในไนโตรเจนเหลวและทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง บดตัวอย่างแห้งให้ละเอียดเป็นผง เก็บรักษาในถุงอะลูมิเนียมที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นำไปวิเคราะห์ความชื้นตามวิธีการของ AOAC (2000) (ภาคผนวก ก)

2.2 การสกัด

นำใบมะกอกโอลีฟแต่ละสายพันธุ์ในส่วนที่ 1 ที่ผ่านการเตรียมจากข้อ 2.1 จำนวน 1 กรัม สกัดด้วยตัวทำละลายที่เลือกจากการทดลองที่ 1 คือ 80% เอทานอล ปริมาตร 12.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดหมุนเหวี่ยงขนาด 50 มิลลิลิตร นำไปปั่นผสมด้วยเครื่องปั่นเป็นเนื้อเดียวกันที่ความเร็วเบอร์ 4 นาน 2 นาที จากนั้นนำไปเหวี่ยงให้ตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำสารละลายส่วนใสใส่ขวดปรับปริมาตรและนำส่วนกากที่ได้ไปสกัดอีกครั้ง จากนั้นปรับปริมาตรสารละลายส่วนใสทั้งหมดในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตรด้วยตัวทำละลาย 80% เอทานอล เก็บใส่ขวดสีชาในตู้แช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สกัดใบมะกอกโอลีฟแต่ละสายพันธุ์อย่างละ 2 ซ้ำ เพื่อตรวจสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และคุณสมบัติในการต้านออกซิเดชัน ส่วนใบมะกอกโอลีฟแต่ละสายพันธุ์ในส่วนที่ 2 ที่ผ่านการเตรียมจากข้อ 2.1 จะสกัดด้วยวิธีการสกัดเช่นเดียวกับส่วนที่ 1 เพื่อนำมาวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกชนิดหลักในใบมะกอกโอลีฟด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.3 การวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

ตรวจสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเช่นเดียวกับวิธีในข้อ 1.3

2.4 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

ตรวจสอบปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเช่นเดียวกับวิธีในข้อ 1.4

2.5 การวิเคราะห์คุณสมบัติในการต้านออกซิเดชันด้วยวิธี 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH radical scavenging capacity)

ตรวจสอบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ DPPH เช่นเดียวกับวิธีในข้อ 1.5

2.6 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกชนิดหลักในใบมะกอกโอลีฟด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography: HPLC)

นำตัวอย่างสารสกัดมาวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกที่มีในใบมะกอกโอลีฟด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมกับเครื่องตรวจวัด Photodiode Array Detector ซึ่งประกอบด้วย Waters 717 plus autosampler, Waters 600 pumps และ Waters 996 photodiode array detector โดยคอลัมน์ที่ใช้เป็นคอลัมน์ชนิด C-18 ซึ่งเป็นระบบ reverse phase มีเส้นผ่าศูนย์กลางภายในเท่ากับ 3.9 มิลลิเมตร ความยาวเท่ากับ 150 มิลลิเมตร และมีขนาดเม็ดอนุภาคเท่ากับ 5 ไมโครเมตร ปริมาตรตัวอย่างที่ฉีดเท่ากับ 20 ไมโครลิตร ซึ่งตัวอย่างสารสกัดต้องกรองผ่านตัวกรองชนิดไนลอน (Nylon) ขนาด 0.45 ไมโครเมตร โดยมีวัฏภาคเคลื่อนที่ A เป็น 1% acetic acidในน้ำ ส่วนวัฏภาคเคลื่อนที่ B เป็น acetonitrile การเคลื่อนที่ของวัฏภาคเคลื่อนที่เป็นแบบ gradient elution แสดงดังตารางที่ 3 และมีอัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Japón-Luján *et al.* (2006) สำหรับการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของสาร oleuropein จะตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ส่วนการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของสาร luteolin 7-glucoside, luteolin 4′-glucoside และ luteolin จะตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 350 นาโนเมตร โดยระบุชนิดสารประกอบฟีนอลิกชนิดหลักด้วยสารมาตรฐาน oleuropein, luteolin 7-glucoside,

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

luteolin 4′-glucoside และ luteolin และคำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกชนิดหลักจากกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ข) และรายงานผลในหน่วยมิลลิกรัมต่อน้ำหนักแห้ง 100 กรัมของใบมะกอกโอลีฟ

ตารางที่ 3 สัดส่วนวัฏภาคเคลื่อนที่ในการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกด้วยเครื่อง HPLC

เวลา (นาที)	วัฏภาคเคลื่อนที่ A (ร้อยละ)	วัฏภาคเคลื่อนที่ B (ร้อยละ)
0	85	15
10	60	40
25	25	75

สำหรับการยืนยันผลการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกชนิดหลักในใบมะกอกโอลีฟจะใช้วิธีการ spike โดยเติมสารละลายมาตรฐาน oleuropein, luteolin 7-glucoside, luteolin 4′-glucoside และ luteolin ที่ทราบความเข้มข้นลงในสารสกัดที่ได้จากใบมะกอกโอลีฟในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC-DAD โดยพื้นที่ใต้กราฟของสารสกัดที่ได้จากใบมะกอกโอลีฟที่ทำการ spike จะเท่ากับพื้นที่ใต้กราฟของสารสกัดที่ได้จากใบมะกอกโอลีฟที่เจือจางลง 1 เท่ารวมกับพื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐานแต่ละชนิดที่ทราบความเข้มข้นที่เจือจางลง 1 เท่า

2.7 การวิเคราะห์ชนิดของสารประกอบฟีนอลิกชนิดหลักในใบมะกอกโอลีฟด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมกับเครื่องแมสสเปกโทรเมตรี (HPLC/MS/MS)

สำหรับการระบุชนิดของสารประกอบฟีนอลิกชนิดหลักจะทำการเก็บแฟรกชันของสารประกอบชนิดที่ 1 ที่ retention time 10.7-11.4 และเก็บแฟรกชันของสารประกอบชนิดที่ 2 ที่ retention time 13.8-14.2 ซึ่งเป็น retention time ที่ครอบคลุมสารประกอบแต่ละชนิด เก็บแฟรกชันของสารประกอบแต่ละชนิดจำนวน 20 รอบ นำส่วนสารละลายที่เก็บได้ไประเหยให้แห้งด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงสาร โดยระบบสุญญากาศที่อุณหภูมิเริ่มต้น 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นปรับอุณหภูมิเป็น 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที โดยหมุนจำนวน 5 รอบ จากนั้นนำมาละลายด้วยสารละลาย 1% acetic acid ในน้ำและนำไปสั่นสะเทือนด้วยเครื่องสั่นสะเทือนด้วยระบบคลื่นเสียงเป็นเวลา 20 นาที เขย่าให้เข้ากัน ปรับปริมาตรด้วยสารละลาย 1% acetic acid ในน้ำให้ได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 มิลลิลิตร และเก็บในขวดแก้วสีชา พ่นด้วยแก๊สไนโตรเจน เพื่อนำไปส่งตรวจวิเคราะห์ที่หน่วยเครื่องมือกลาง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ซึ่งจะทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมกับเครื่องตรวจวัดแมสสเปกโทรเมตรี ที่ดัดแปลงจากวิธีของ Bouaziz *et al*. (2005) โดยระบบประกอบด้วย เครื่อง Agilent LC 1100 series, Binary pump, Auto sampler, Micro Degasser, Column compartment control และ Diode Array Detector คอลัมน์ที่ใช้เป็นคอลัมน์ Hypersil Gold ชนิด C-18 ซึ่งมีเส้นผ่าศูนย์กลางภายในเท่ากับ 4.6 มิลลิเมตร ความยาวเท่ากับ 150 มิลลิเมตร และมีขนาดเม็ดอนุภาคเท่ากับ 3 ไมโครเมตร ปริมาตรตัวอย่างที่ฉีดเท่ากับ 20 ไมโครลิตร ซึ่งตัวอย่างสารสกัดต้องกรองผ่านตัวกรองชนิดไนลอน (Nylon) (Water, USA) ขนาด 0.45 ไมโครเมตร โดยมีวัฏภาคเคลื่อนที่ A เป็น 1% acetic acidในน้ำ ส่วนวัฏภาคเคลื่อนที่ B เป็น acetonitrile การเคลื่อนที่ของวัฏภาคเคลื่อนที่เป็นแบบ gradient elution แสดงดังตารางที่ 3 และมีอัตราการไหลเท่ากับ 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ส่วนระบบของเครื่องแมสสเปกโทรเมตรี แสดงดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ระบบของเครื่องแมสสเปกโทรเมตรี

Bruker Daltonic:	Esquire 3000^{+} Ion trap type mass analyzer
Parameters set:	Ion Source Type: Electro spray ionization (ESI) Capillary Voltage: 4000 V Nebulizer gas: 55 psi Dry gas: 10.0 L/min Dry temperature: 350^{O}C
Mass Analyzer (Ion trap)	Scan mode: 5500 m/z/sec Ion Charge Control: 20000 Ion Polarity: Positive Scan range: 100-1000 m/z
Tandem Mass spectrometry (MS/MS)	Fracmentation Amplitude: 0.70

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.8 การตรวจสอบค่า recovery rate

การตรวจสอบค่า recovery rate ของวิธีการสกัด สามารถทำได้โดยนำตัวอย่างใบมะกอกโอลีฟที่ทำแห้งแบบเยือกแข็งและบดละเอียดจำนวน 1 กรัม มาเติมสารละลายมาตรฐานนารินจิน (naringin) ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำมาผ่านการสกัดเช่นเดียวกับวิธีในข้อ 2.2 หลังจากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC-DAD เช่นเดียวกับวิธีในข้อ 2.6 เพื่อหาพื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐานนารินจินที่ได้จริงหลังผ่านการสกัดเปรียบเทียบกับพื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐานนารินจินที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน (ภาคผนวก ง) ซึ่งมีสูตรการคำนวณ ดังนี้

$$\text{Recovery rate (\%)} = (A_{SE}/A_S) \times 100$$

โดยที่ A_S คือ พื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐานนารินจินที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน
A_{SE} คือ พื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐานนารินจินที่ได้จริงหลังผ่านการสกัด

3. การศึกษาผลของกระบวนการผลิตชาต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและความสามารถต้านออกซิเดชันในใบมะกอกโอลีฟ

3.1 การเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างใบมะกอกโอลีฟสายพันธุ์ Hojiblanca มาทำการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ชาดำและชาเขียวโดยใช้วิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของศิริพร (2546) โดยในการผลิตชาดำทำโดยนำใบมะกอกโอลีฟมาลิดใบออกจากกิ่งแล้วทำความสะอาดด้วยการล้างน้ำและผึ่งให้แห้งในที่ร่ม แล้วนำมาคั่วและนวดในกระทะร้อนด้วยมือเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นหมักในตู้ที่ควบคุมอุณหภูมิและความชื้นที่อุณหภูมิ 25, 35 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1, 2 และ 3 ชั่วโมง แล้วนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมงด้วยเครื่องอบลมร้อน ส่วนในการผลิตชาเขียว จะนำใบมะกอกโอลีฟมาลิดใบออกจากกิ่งแล้วทำความสะอาดด้วยการล้างน้ำและผึ่งให้แห้งในที่ร่ม จากนั้นลวกในน้ำร้อนเป็นเวลา 20 วินาที แล้วนำมาคั่วและนวดในกระทะร้อนด้วยมือเป็นเวลา 30 นาทีและนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมงด้วยเครื่องอบลมร้อน (ภาคผนวก ฉ) โดยชาใบมะกอกโอลีฟที่ได้จะต้องมีความชื้นน้อยกว่าร้อยละ 5

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.2 การสกัด

นำชาดำใบมะกอกโอลีฟและชาใบมะกอกเขียวโอลีฟที่บดละเอียดจำนวน 1 กรัม สกัดด้วยตัวทำละลาย 80% เอทานอล ปริมาตร 12.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดใส่ลงในหลอด หมุนเหวี่ยงขนาด 50 มิลลิลิตร นำไปปั่นผสมด้วยเครื่องปั่นเป็นเนื้อเดียวกันที่ความเร็วเบอร์ 4 นาน 2 นาที จากนั้นนำไปเหวี่ยงให้ตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำสารละลายส่วนใสใส่ขวดปรับปริมาตรและนำส่วนกากที่ได้ไปสกัดอีกครั้ง จากนั้นปรับปริมาตรสารละลายส่วนใสทั้งหมดในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ด้วยตัวทำละลาย 80% เอทานอล เก็บใส่ขวดสีชาในตู้แช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สกัดชาใบมะกอกโอลีฟแต่ละประเภทอย่างละ 2 ซ้ำ เพื่อตรวจสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และคุณสมบัติในการต้านออกซิเดชัน รวมทั้งวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกชนิดหลัก โดยเปรียบเทียบชาใบมะกอกโอลีฟแต่ละประเภทกับใบมะกอกโอลีฟที่ยังไม่ได้ผ่านกระบวนการผลิตชา

3.3 การวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

ตรวจสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเช่นเดียวกับวิธีในข้อ 1.3

3.4 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

ตรวจสอบปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเช่นเดียวกับวิธีในข้อ 1.4

3.5 การวิเคราะห์คุณสมบัติในการต้านออกซิเดชันด้วยวิธี 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH radical scavenging capacity)

ตรวจสอบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ DPPH เช่นเดียวกับวิธีในข้อ 1.5

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.6 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกชนิดหลักในชาใบมะกอกโอลีฟด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

วิเคราะห์ชนิดและปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกชนิดหลักในชาใบมะกอกโอลีฟเช่นเดียวกับวิธีในข้อ 2.6

4. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

การศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของตัวทำละลายต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และความสามารถต้านออกซิเดชัน และการศึกษาผลของสายพันธุ์ใบมะกอกโอลีฟต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และความสามารถต้านออกซิเดชัน โดยใช้การวางแผนการทดลองแบบการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (Completely Randomized Design) สำหรับการการศึกษาผลของกระบวนการผลิตชาดำต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและความสามารถต้านออกซิเดชันใบมะกอกโอลีฟใช้การวางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียล (Factorial Design) วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ เปรียบเทียบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่าเฉลี่ยของแต่ละการทดลองด้วยวิธี Ducan’s Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

5. สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน และหน่วยเครื่องมือกลาง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

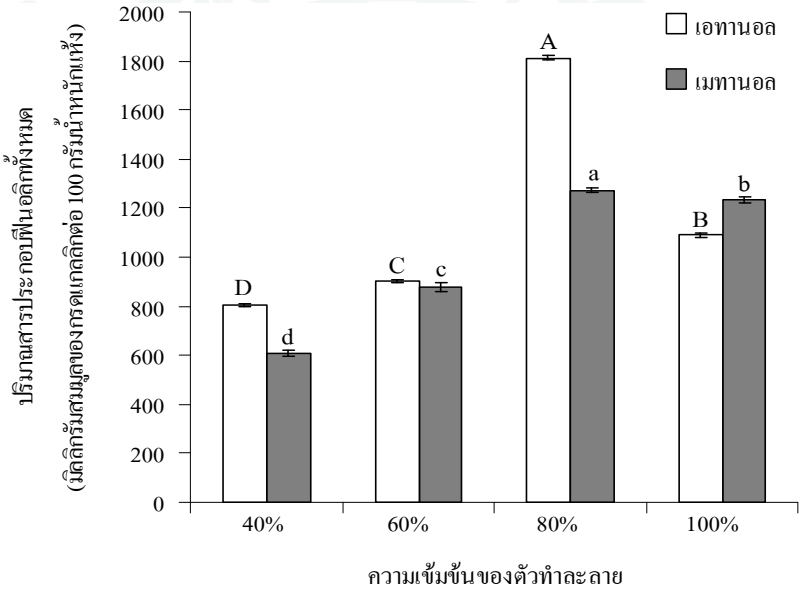
ผลและวิจารณ์

1. ผลการศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของตัวทำละลายต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และความสามารถต้านออกซิเดชันของใบมะกอกโอลีฟ

จากการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และความสามารถต้านออกซิเดชันด้วยการวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของ DPPH ในใบมะกอกโอลีฟสายพันธุ์ Hojiblanca ที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่ต่างกัน คือ 40% 60% 80% และ100% เอทานอล และ 40% 60% 80% และ 100% เมทานอล พบว่า สารสกัด 80% เอทานอล มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และความสามารถต้านออกซิเดชันมากที่สุด รองลงมา คือ สารสกัด 80% เมทานอล 100% เมทานอลหรือเอทานอล 60% เมทานอลหรือเอทานอล 40% เอทานอล และ 40% เมทานอล ตามลำดับ โดยสารสกัด 80% เอทานอลของใบมะกอกโอลีฟสายพันธุ์ Hojiblanca มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 1,812.0±10.3 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกในน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง 100 กรัม ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเท่ากับ 1,055.4±8.4 มิลลิกรัมสมมูลของคาเทคินในน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง 100 กรัม และความสามารถต้านออกซิเดชันด้วยการวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของ DPPH เท่ากับ 1,323.7±3.9 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแอสคอร์บิกในน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง 100 กรัม ดังแสดงในภาพที่ 7 และ8 ตามลำดับ นั่นคือ อัตราส่วนของตัวทำละลายร่วมและชนิดของตัวทำละลายมีผลอย่างมากต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของ DPPH ทั้งนี้เนื่องจากอัตราส่วนของตัวทำละลายร่วมมีความสัมพันธ์กับรูปแบบของตัวถูกละลาย (solute form) ความสามารถในการละลายของตัวถูกละลาย (solute solubility) ความหนืดของตัวกลาง (media viscosity) และปรากฏการณ์ของการแพร่ (diffusion phenomena) เป็นต้น โดยน้ำจะสามารถละลายสารประกอบอินทรีย์ที่มีขั้วสูงและมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำได้ดี ส่วนเอทานอลเป็นสารละลายกึ่งมีขั้วจะสามารถละลายสารประกอบอินทรีย์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงได้ดีกว่า ดังนั้น เมื่อผสมน้ำกับเอทานอลตัวทำละลาย อนุภาคของน้ำและเอทานอลจะเกิดแรงทางไฟฟ้าสถิตเหนี่ยวนำระหว่างอนุภาคของสารทั้งสอง ทำให้ความเป็นขั้วของเอทานอลเพิ่มมากขึ้น จึงทำให้ความสามารถในการละลายส่วนที่มีขั้วในสารประกอบฟีนอลิกดีขึ้น และการเกิดแรงยึดเหนี่ยวทางเคมีของโมเลกุลไฮโดรเจนในสารประกอบฟีนอลิกกับหมู่ออกซิเจนในเอทานอลซึ่งมีความแข็งแรงมาก จึงสามารถสกัดสารประกอบฟีนอลิกได้ดีขึ้น แต่เมื่อเติมน้ำในอัตราส่วนที่มากเกินไปจะส่งผลให้ความเป็นขั้วของสารละลายร่วมมีค่ามากขึ้น ความสามารถของเอทานอลในการละลายสารประกอบฟีนอลิกในส่วนที่ไม่มีขั้วจะลดต่ำลง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ทำให้สกัดสารประกอบฟีนอลิกได้น้อยลง ดังนั้น สัดส่วนและความเป็นขั้วของตัวทำละลายที่เลือกใช้ในการสกัดจะต้องมีความเหมาะสมกับสารที่ต้องการสกัด จึงจะสามารถสกัดสารที่ต้องการได้ปริมาณที่สูง (นันทวัฒน์, 2551) นอกจากนี้ ทั้งเอทานอลและเมทานอลต่างก็มีความสามารถในการสร้างพันธะไฮโดรเจนได้ดีทั้งคู่ (strong hydrogen bonding) แต่เนื่องจากโมเลกุลเมทานอลมีขนาดเล็กและเบาจึงสามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group; -OH) โปรตรอนของเมทานอลโมเลกุลหนึ่งกับออกซิเจนอะตอมของเมทานอลอีกโมเลกุลหนึ่งได้ จึงส่งผลให้ความสามารถในการละลายสารประกอบฟีนอลิกลดลงเมื่อเทียบกับเอทานอล (สมใจ, 2549)

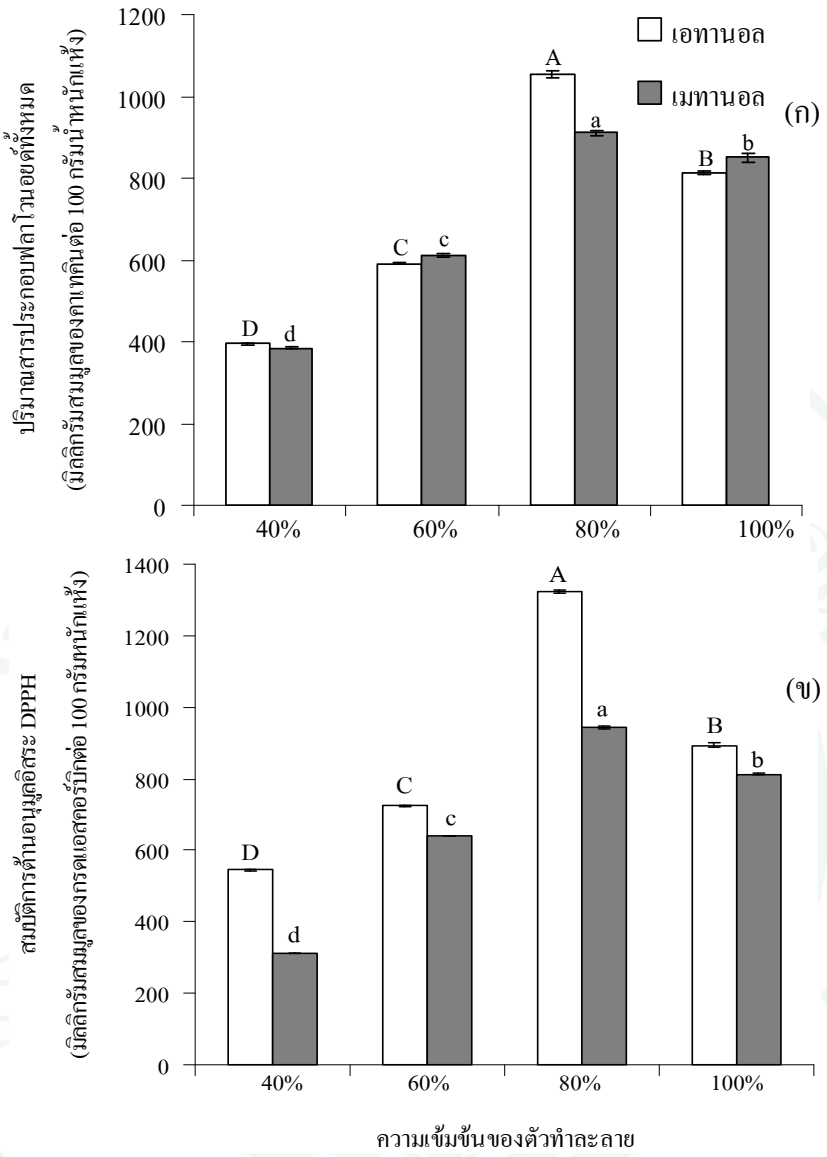


ภาพที่ 7 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในใบมะกอกโอลีฟสายพันธุ์ Hojiblanca ที่สกัดด้วยตัวทำละลายและความเข้มข้นที่แตกต่างกัน

หมายเหตุ ตัวอักษร A-D ที่แตกต่างกันของตัวทำละลายเอทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตัวอักษร a-d ที่แตกต่างกันของตัวทำละลายเมทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 8 ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (ก) และความสามารถต้านออกซิเดชันด้วยการวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของ DPPH (ข) ในใบมะกอกโอลีฟสายพันธุ์ Hojiblanca ที่สกัดด้วยตัวทำละลายและความเข้มข้นที่แตกต่างกัน

หมายเหตุ ตัวอักษร A-D ที่แตกต่างกันของตัวทำละลายเอทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตัวอักษร a-d ที่แตกต่างกันของตัวทำละลายเมทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

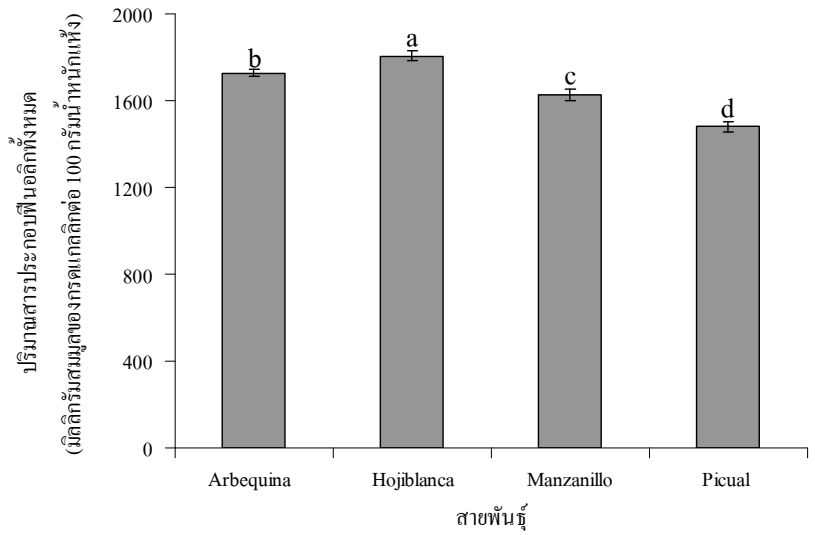
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลการทดลองข้างต้นสอดคล้องกับผลงานวิจัยของ Mylonaki *et al*. (2008) ที่พบว่า การสกัดใบมะกอกโอลีฟด้วย 60% เอทานอลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของ DPPH มากกว่าการสกัดด้วย 40% เอทานอล และ 50% เอทานอล ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกในใบมะกอกโอลีฟส่วนใหญ่มีคุณสมบัติในการละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ที่ค่อนข้างมีขั้วได้ จึงทำให้สารประกอบฟีนอลิกละลายในเอทานอลซึ่งเป็นสารละลายในกลุ่มแอลกอออล์ที่มีโมเลกุลสั้นตามหลักการละลายกันได้ (like dissolves like) จึงมีความเหมาะสมที่จะสามารถสกัดสารออกมาได้มากที่สุด และจากการศึกษาของ Benavente-Garcia *et al*. (2000) พบว่า สารประกอบฟีนอลิกในใบมะกอกโอลีฟที่อยู่ในกลุ่มของฟลาโวนอยด์มีความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระได้ เนื่องจากสารในกลุ่มนี้มีโครงสร้างหลักของ *o*-dihydroxy (catechol) ที่อยู่ใน B-ring เช่น rutin, catechin และ luteolin ซึ่งทำให้ aroxyl radicals มีความเสถียรภาพมากยิ่งขึ้น กลุ่มของ 3- และ 5-hydroxyl ที่อิสระ หรือกลุ่ม glycosylate เช่น catechin และ rutin เป็นกลุ่มที่มีความสามารถในการต้านออกซิเดชันมากที่สุดและสามารถดูดกลืนสารอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด ส่วนกลุ่มของ 2,3-double bond ที่ประกอบด้วยหมู่ฟังก์ชัน 4-oxo เช่น rutin และluteolin จะมีผลต่อการเกิดการเคลื่อนที่ของอิเล็กตรอนระหว่าง A-ring และ B-ring ของสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ นอกจากนี้ ยังมีผลการศึกษาที่พบว่า เอทานอลเป็นตัวทำละลายที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการสกัดสารที่มีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของ DPPH ในใบของโสมป่า (Jung *et al.*, 2006) ใบของสตรอเบอร์รี่ (*Arbutus unedo* L.) (Oliveira *et al.*, 2009) ใบและรากของ *Hieracium pilosella* L. (Stanojevic *et al.*, 2009) และใบของชิงช้าชาลี (*Tinospora cordifolia* Miers.) (Premanath and Lakshmidevi, 2010) โดยสามารถสกัดสารประกอบฟีนอลิกได้มากกว่าเมทานอลและน้ำ และจากการศึกษาของ Maisuthisakul (2008) พบว่า ใบพลู (*Piper betel* Linn.) ที่สกัดด้วยเอทานอลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของ DPPH มากกว่าการสกัดด้วยเมทานอลด้วยเช่นกัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. ผลการศึกษาอิทธิพลของสายพันธุ์ต่อสารประกอบฟีนอลิกและความสามารถต้านออกซิเดชันในใบมะกอกโอลีฟ

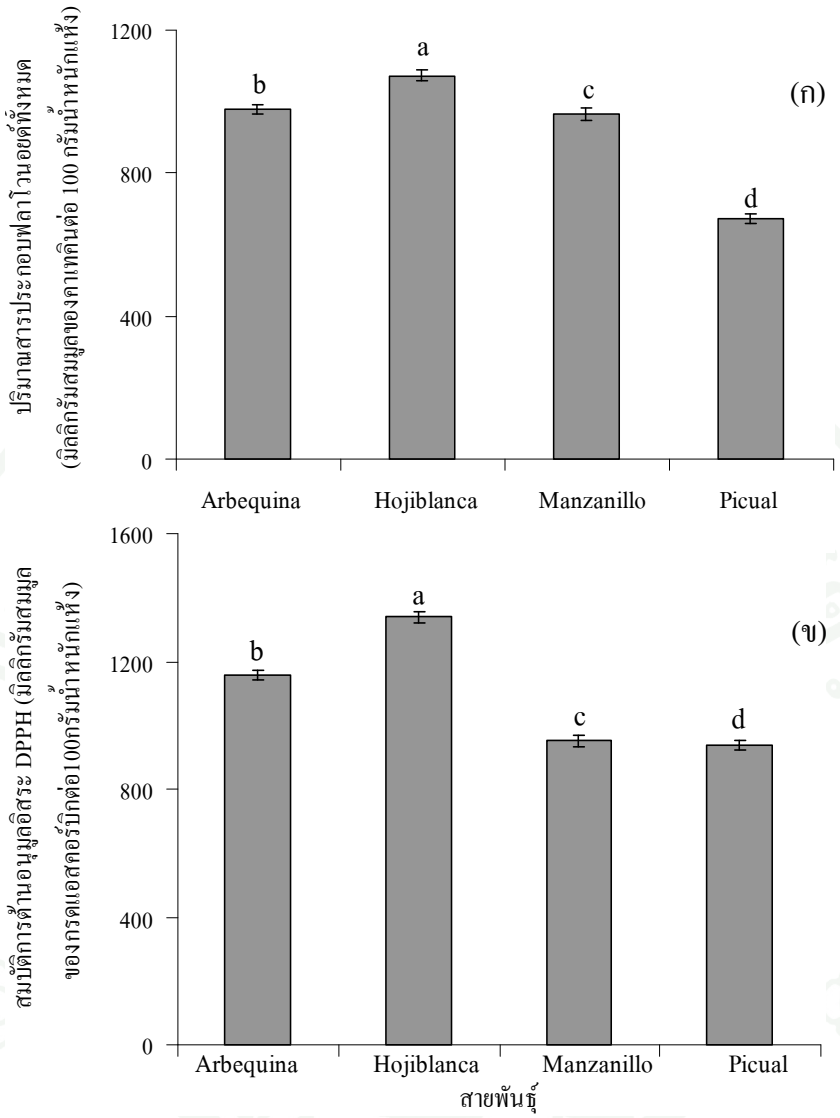
จากการศึกษาใบมะกอกโอลีฟทั้ง 4 สายพันธุ์ที่สกัดด้วย 80% เอทานอล พบว่า สายพันธุ์ Hojiblanca มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และความสามารถต้านออกซิเดชันด้วยการวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของ DPPH มากที่สุด โดยมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 1,805.9±22.0 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกในน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง 100 กรัม ปริมาณของสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเท่ากับ 1,072.6±15.9 มิลลิกรัมสมมูลของคาเทคินในน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง 100 กรัม และความสามารถต้านออกซิเดชันด้วยการวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของ DPPH เท่ากับ 1,337.8±16.0 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแอสคอร์บิกในน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง 100 กรัม ส่วนสายพันธุ์ที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และความสามารถในการต้านออกซิเดชันด้วยการวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของ DPPH รองลงมาคือ สายพันธุ์ Arbequina, สายพันธุ์ Manzanillo และสายพันธุ์ Picual ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 9 และ 10



ภาพที่ 9 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 80% เอทานอลของใบมะกอกโอลีฟ 4 สายพันธุ์

หมายเหตุ ตัวอักษร a-d ที่แตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 10 ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (ก) และความสามารถต้านออกซิเดชันด้วยการวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของ DPPH (ข) ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 80% เอทานอลของใบมะกอกโอลีฟ 4 สายพันธุ์

หมายเหตุ ตัวอักษร a-d ที่แตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

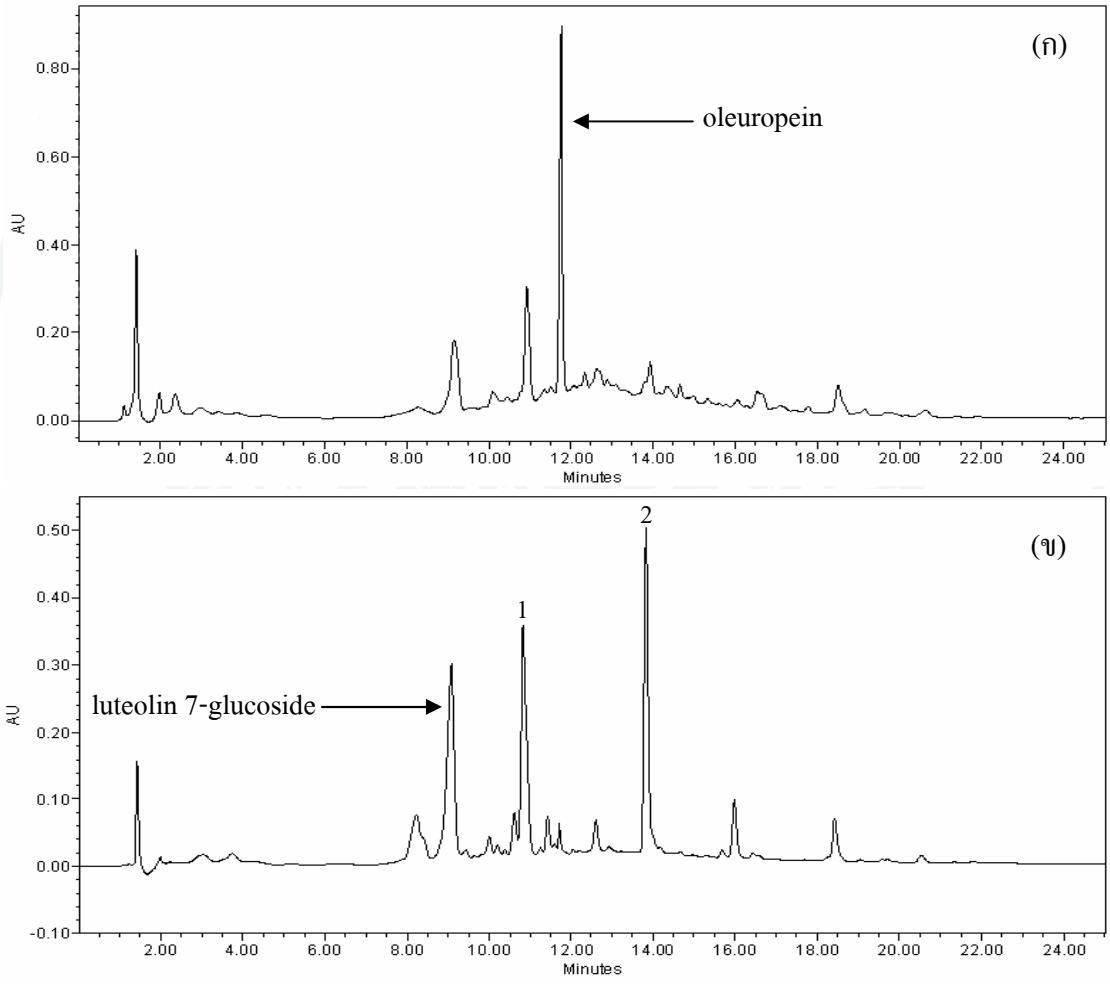
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ทั้งนี้การที่ความแตกต่างทางสายพันธุ์มีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และความสามารถในการต้านออกซิเดชันด้วยการวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของ DPPH สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Papoti and Tsimidou (2009) ที่พบว่าใบมะกอกโอลีฟทั้ง 12 สายพันธุ์ (Picual, Kothreiki, Tsounati, Megaritiki, Adramatiani, Kolovi, Amfissis, Chondrolia Ch., Vassilikada, Koroneiki, Kalamon และ Frantoi) มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของ DPPH แตกต่างกัน โดยพบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดประมาณ 61-29 มิลลิกรัมสมมูลของ oleuropein ในน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง 1 กรัม ซึ่งสายพันธุ์ Picual มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุด ส่วนสายพันธุ์ Adramatiani มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของ DPPH มากที่สุด และเมื่อศึกษาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสายพันธุ์ Chondrolia Ch. และสายพันธุ์ Koroneiki พบว่า สายพันธุ์ Chondrolia Ch. มีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดมากกว่าสายพันธุ์ Koroneiki ต่อมาในปี 2010 จากการศึกษาของ Goulas *et al*. พบว่าสารสกัดจากใบมะกอกโอลีฟแต่ละสายพันธุ์มีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของ DPPH แตกต่างกัน โดยสายพันธุ์ Amfissis มีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดมากที่สุด และสายพันธุ์ Vassilikada มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของ DPPH มากที่สุด นอกจากนี้ยังมีผลการศึกษาที่พบว่าความแตกต่างทางสายพันธุ์มีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของ DPPH ในใบผักเบี้ยใหญ่ (*Portulaca oleracea*) 6 สายพันธุ์ (Lim and Quah, 2007) ใบวอลนัท 6 สายพันธุ์ (Pereira *et al*., 2007) และใบมันเทศทั้ง 116 สายพันธุ์ (Xu *et al*., 2010)

เมื่อศึกษาชนิดสารประกอบฟีนอลิกชนิดหลักที่พบในใบมะกอกโอลีฟด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมกับเครื่องตรวจวัด Photodiode Array พบว่า มีสารประกอบฟีนอลิกชนิดหลักที่พบในใบมะกอกโอลีฟ คือ สาร oleuropein ซึ่งตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร สาร luteolin 7-glucoside สารประกอบฟีนอลิกชนิดที่ 1 และสารประกอบฟีนอลิกชนิดที่ 2 ซึ่งตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 350 นาโนเมตร ดังแสดงในภาพที่ 11 โดยสามารถยืนยันชนิดของสาร oleuropein และ luteolin 7-glucoside ที่พบได้ด้วยวิธีการ spike ส่วนสารประกอบฟีนอลิกชนิดที่ 1 และสารประกอบฟีนอลิกชนิดที่ 2 ตรวจสอบการยืนยันชนิดของสารด้วยการหาอัตราส่วนของมวลต่อประจุด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมกับเครื่องแมสสเปกโทร-เมตรีและวิธีการ spike

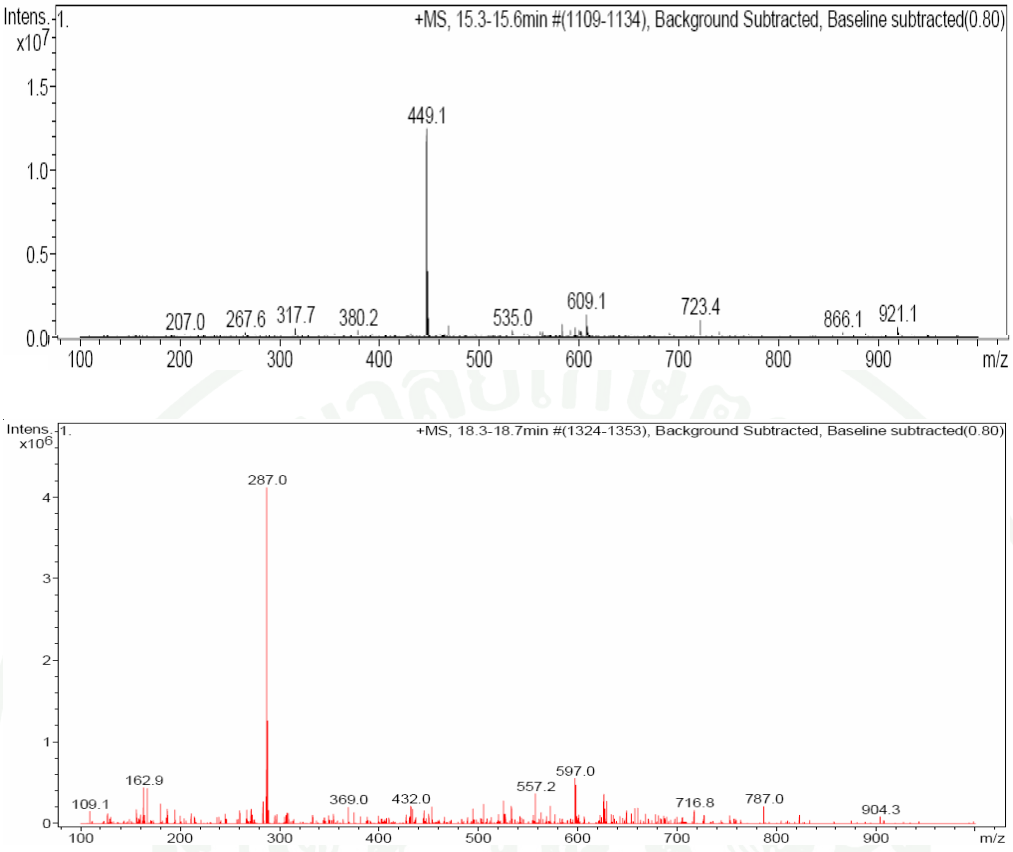
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เมื่อศึกษาการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกที่พบในใบมะกอกโอลีฟด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมกับเครื่องแมสสเปกโทรเมตรี พบว่า แมสสเปกตรัมของสาร ประกอบฟีนอลิกชนิดที่ 1 และสารประกอบฟีนอลิกชนิดที่ 2 ในใบมะกอกโอลีฟ มีอัตราส่วนของมวลต่อประจุของสารประกอบฟีนอลิกชนิดที่ 1 และสารประกอบฟีนอลิกชนิดที่ 2 คือ 449.1 และ 287.0 ตามลำดับ ซึ่งสามารถระบุได้ว่า สารประกอบฟีนอลิกชนิดที่ 1 คือ luteolin 4′-glucoside และสารประกอบฟีนอลิกชนิดที่ 2 คือ luteolin ดังแสดงในภาพที่ 12



ภาพที่ 11 โครมาโทแกรมของสารประกอบฟีนอลิกชนิดหลักในใบมะกอกโอลีฟซึ่งวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC-DAD ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (ก) และ 350 นาโนเมตร (ข)

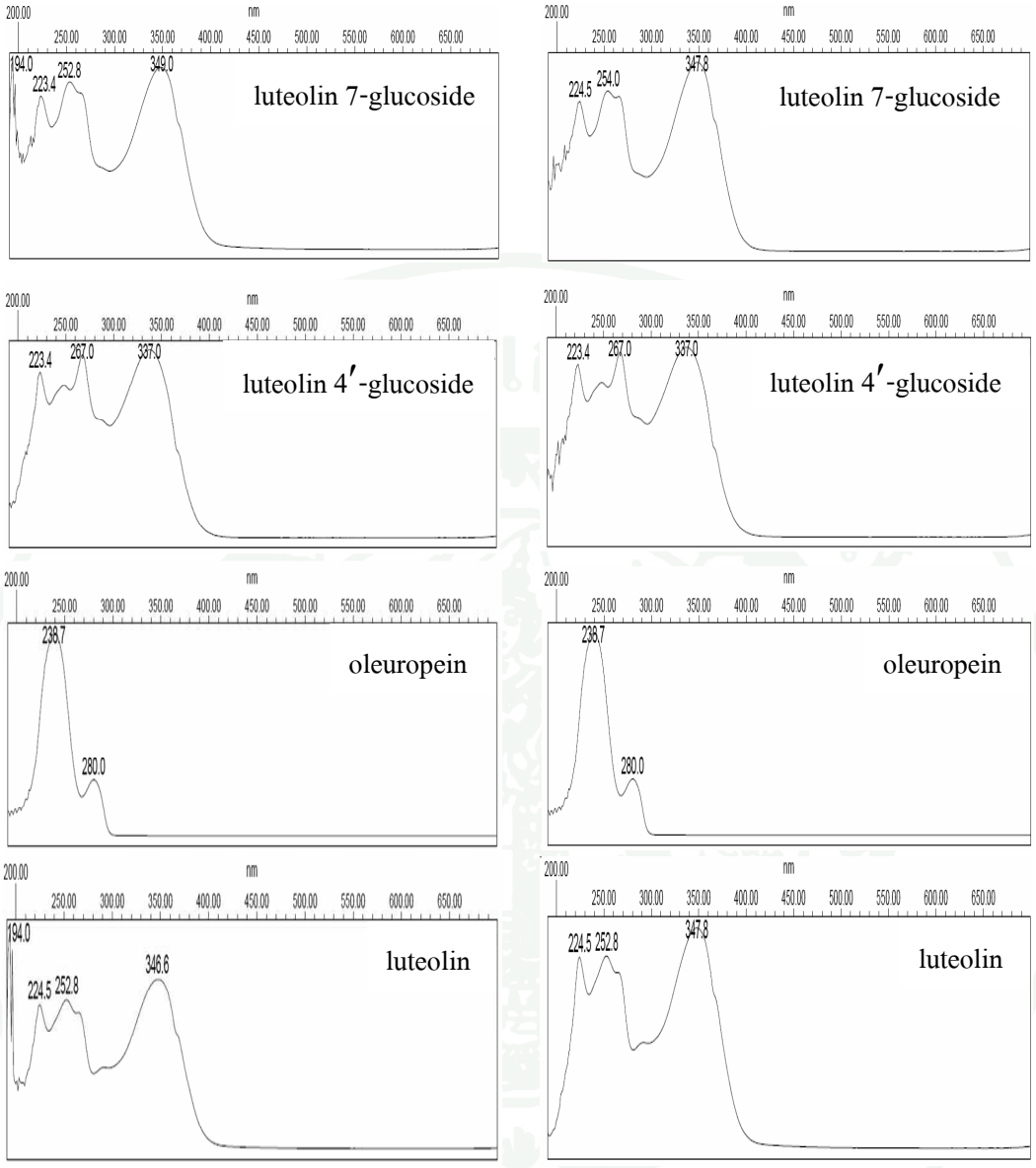
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 12 แมสสเปกตรัมของสารประกอบฟีนอลิกชนิดที่ 1 (ก) และสารประกอบฟีนอลิกชนิดที่ 2 (ข) ในใบมะกอกโอลีฟ

ส่วนการหาปริมาณของสาร oleuropein, luteolin 7-glucoside, luteolin 4′-glucoside และ luteolin สามารถคำนวณได้จากสารมาตรฐานของแต่ละสารที่สามารถวิเคราะห์ได้ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมกับเครื่องตรวจวัด Photodiode Array โดยสาร oleuropein luteolin 7-glucoside luteolin 4′-glucoside และ luteolin ในใบมะกอกโอลีฟจะมีลักษณะสเปกตรัมที่แตกต่างกันและสารแต่ละชนิดจะมีลักษณะสเปกตรัมเฉพาะของสารนั้นๆ ซึ่งเปรียบเทียบได้กับสเปกตรัมของสารมาตรฐานแต่ละชนิด ดังแสดงในภาพที่ 13

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



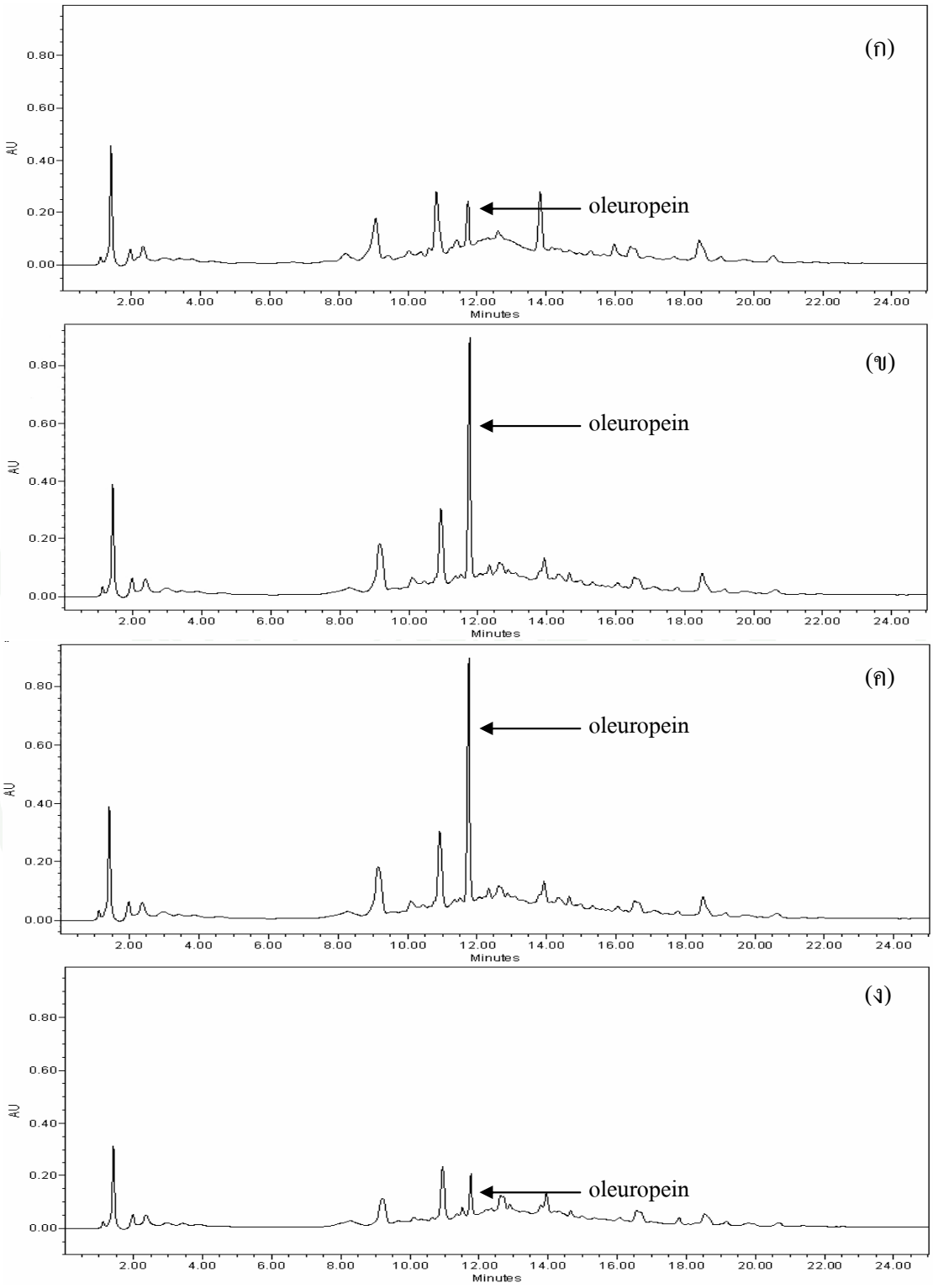
ภาพที่ 13 สเปกตรัมของสาร luteolin 7-glucoside, luteolin 4′-glucoside, oleuropein และ luteolin ในใบมะกอกโอลีฟ (ก) และสเปกตรัมของสารมาตรฐาน luteolin 7-glucoside, luteolin 4′-glucoside, oleuropein และ luteolin (ข)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จากผลการทดลองข้างต้นสอดคล้องกับผลงานวิจัยของ Meirinhos *et al*. (2005) ที่พบว่าใบมะกอกโอลีฟ 18 สายพันธุ์ที่เจริญเติบโตในโปรตุเกสซึ่งวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงสามารถระบุชนิดและปริมาณของสารประกอบฟลาโวนอยด์ต่างๆ ได้ 8 ชนิด คือ luteolin 7,4′-*O*-diglucoside luteolin 7-*O*-glucoside rutin apigenin 7-*O*-rutinoside luteolin 4′-*O*-glucoside luteolin apigenin และ diosmetin โดยพบ luteolin 4′-*O*-glucoside เป็นสารประกอบหลักในใบมะกอกโอลีฟ รองลงมาคือ luteolin 7-*O*-glucoside และจากการศึกษาของ Pereira *et al*. (2007) พบสารประกอบฟีนอลิก 7 ชนิดในใบมะกอกโอลีฟ คือ caffeic acid, verbascoside, oleuropein, luteolin 7-*O*-glucoside rutin apigenin 7-*O*-glucoside และ luteolin 4′-*O*-glucoside ขณะที่ Malik and Bradford (2008) พบว่า ในใบมะกอกโอลีฟมีสาร oleuropein, verbascoside, luteolin 7-*O*-glucoside และ luteolin 4′-*O*-glucoside และในปีเดียวกัน Mylonaki *et al*. ยังพบว่า ในใบมะกอกโอลีฟมีสารพฤกษเคมีสำคัญต่างๆ เช่น luteolin glycoside, oleuropein, rutin และ apigenin ส่วนในปี 2009 จากการศึกษาของ Papoti and Tsimidou พบว่า สารสกัดจากใบมะกอก โอลีฟพบสาร hydroxytyrosol luteolin 7-*O*-glucoside verbascoside luteolin 4′-*O*-glucoside oleuropein และ luteolin ต่อมาในปี 2010 จากการศึกษาของ Goulas *et al*. พบว่าในใบมะกอกโอลีฟมีสาร hydroxytyrosol glucoside hydroxytyrosol verbascoside luteolin 7-*O*-glucoside luteolin 4′-*O*-glucoside oleuropein oleuropein derivative และ luteolin และในปีเดียวกัน Fu *et al*. ยังรายงานว่าสารสกัดจากใบมะกอกโอลีฟมีสารที่สำคัญต่างๆ ได้แก่ rutin quercetin dihydroquercetin apigenin apigenin 7-*O*-glucoside chrysoeriol 7-*O*-glucoside และ luteolin glucosides ที่มี 2 ไอโซเมอร์คือ luteolin 7-*O*-glucoside ที่จะถูกชะออกมาก่อนแล้วจึงค่อยชะสาร luteolin 4′-*O*-glucoside ตามออกมา นอกจากนี้ในปี 2012 จากการศึกษาของ Kontogianni and Gerothanassis ยังพบว่าสารสกัดจากใบมะกอกโอลีฟมีสาร oleuropein luteolin 4′-*O*-glucoside luteolin 7-*O*-glucoside luteolin และ hydroxytyrosol ที่มีปริมาณเท่ากับ 92.5, 70.6, 67.8, 53.5 และ 18.3 มิลลิกรัมต่อกรัมของสารสกัด ตามลำดับ

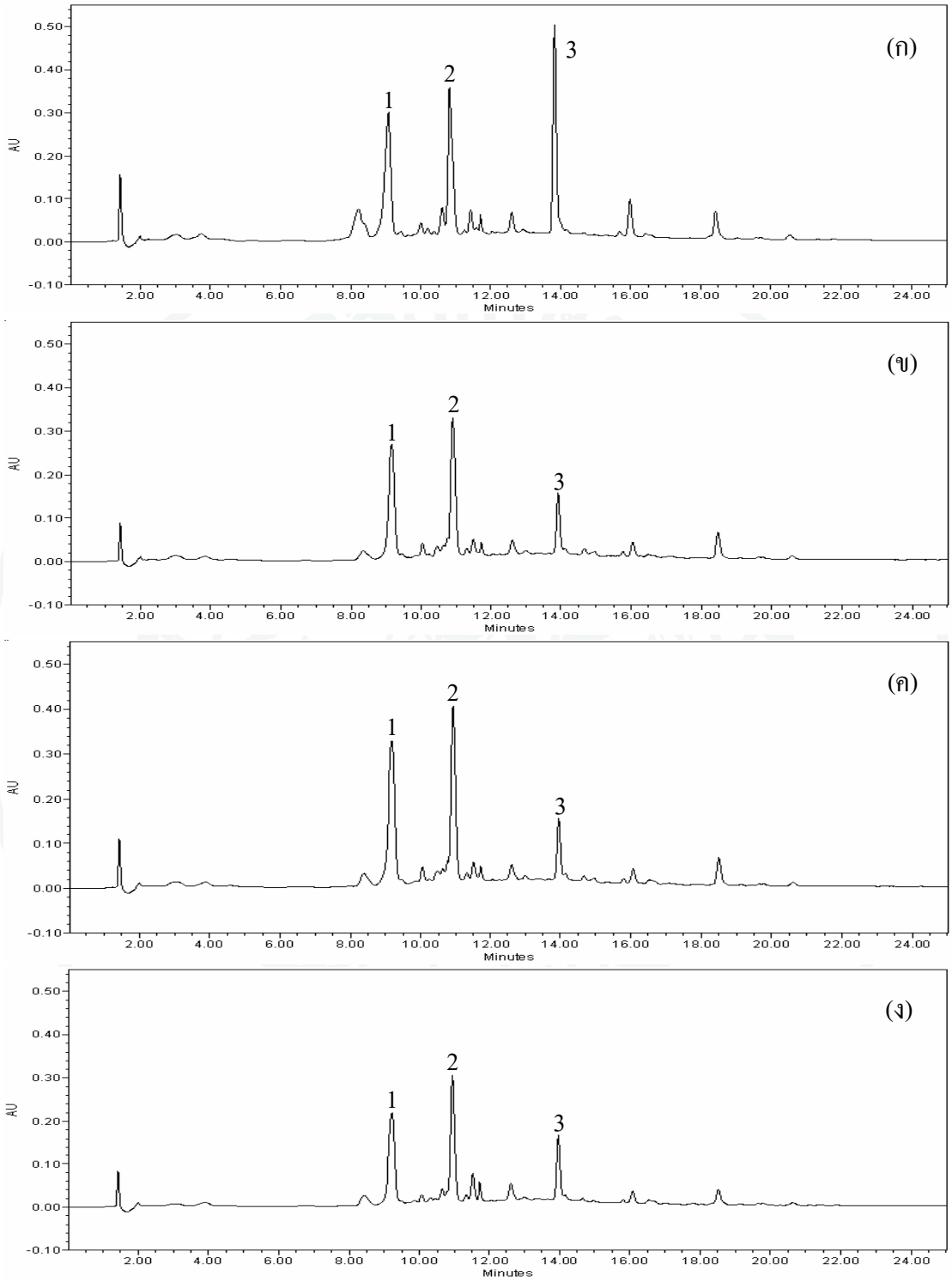
เมื่อศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกชนิดหลักในใบมะกอกโอลีฟ 4 สายพันธุ์ (Arbequina, Hojiblanca, Manzanillo และ Picual) ที่สกัดด้วย 80% เอทานอล พบว่า ทั้ง 4 สายพันธุ์มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกชนิดหลักที่สามารถระบุได้ว่าเป็นสาร oleuropein luteolin 7-glucoside luteolin 4′-glucoside และ luteolin ดังแสดงในภาพที่ 14 และ 15

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 14 โครมาโทแกรมของ oleuropein ในใบมะกอกโอลีฟสายพันธุ์ Arbequina (ก) สายพันธุ์ Hojiblanca (ข) สายพันธุ์ Manzanillo (ค) และสายพันธุ์ Picual (ง)

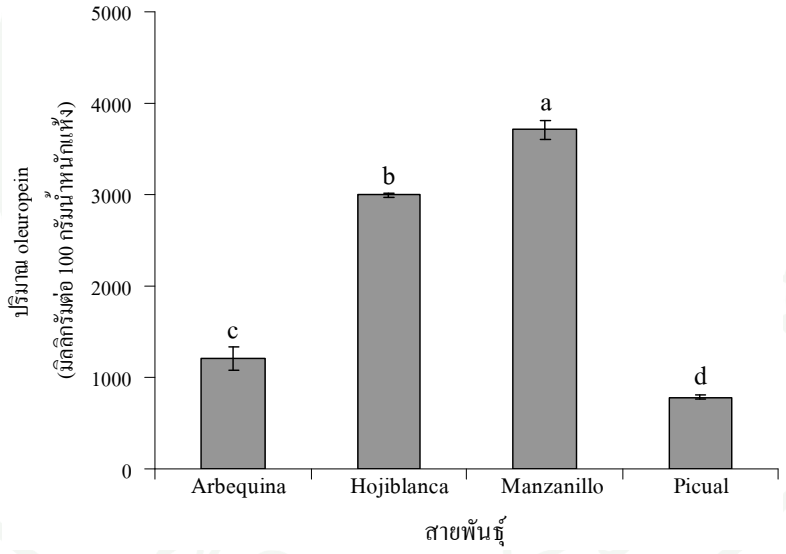
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 15 โครมาโทแกรมของสารประกอบฟีนอลิกชนิดหลักในใบมะกอกโอลีฟสายพันธุ์ Hojiblanca (ก) สายพันธุ์ Arbequina (ข) สายพันธุ์ Manzanillo (ค) และสายพันธุ์ Picual (ง) (1: luteolin 7-glucoside; 2: luteolin 4′-glucoside; 3: luteolin)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

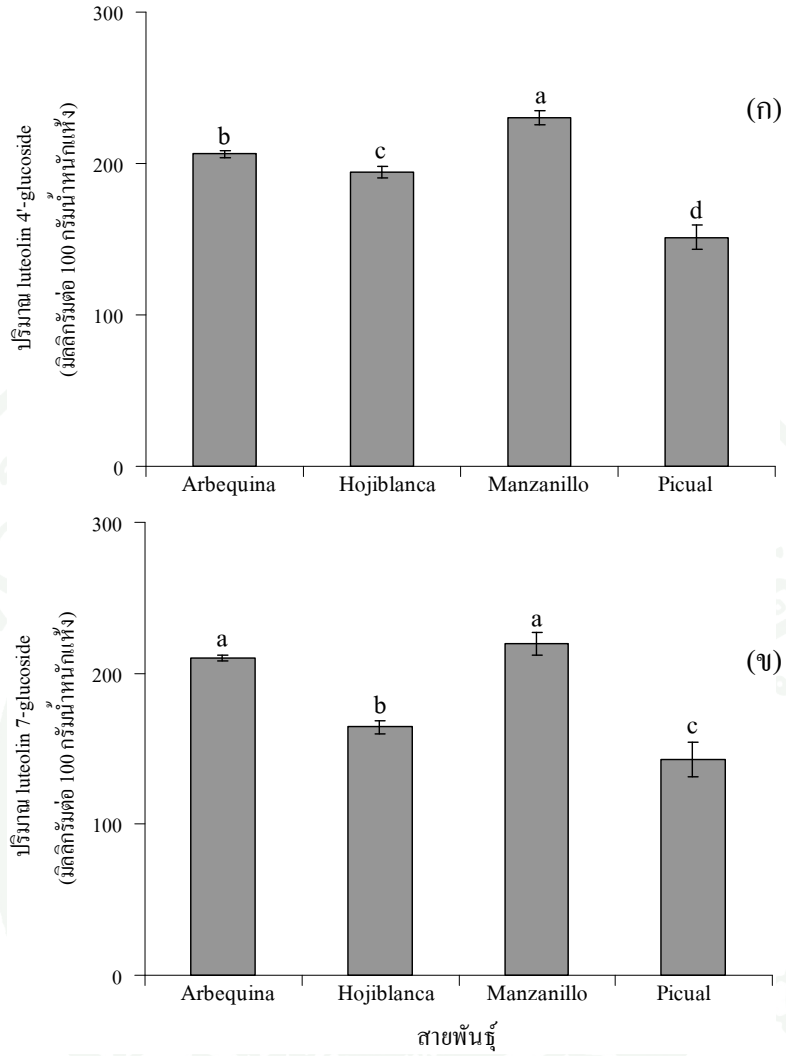
จากการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกชนิดหลักในใบมะกอกโอลีฟ 4 สายพันธุ์ที่สกัดด้วย 80% เอทานอล พบว่า ทั้ง 4 สายพันธุ์มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกชนิดหลักแตกต่างกัน โดยสายพันธุ์ Manzanillo มีปริมาณสาร oleuropein มากที่สุด (3,709.3±105.6 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแห้ง 100 กรัม) รองลงมาคือ สายพันธุ์ Hojiblanca สายพันธุ์ Arbequina และสายพันธุ์ Picual ตามลำดับ (ภาพที่ 16) อีกทั้งสายพันธุ์ Manzanillo ยังมีปริมาณสาร luteolin 4′-glucoside มากที่สุด(230.3±5.0 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแห้ง 100 กรัม) รองลงมาคือ สายพันธุ์ Arbequina สายพันธุ์ Hojiblanca และสายพันธุ์ Picual ตามลำดับ ขณะที่สายพันธุ์ Manzanillo และ Arbequina มีปริมาณสาร luteolin 7-glucoside มากที่สุด (219.6±7.7 และ 210.0±1.9 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแห้ง 100 กรัม) รองลงมาคือ สายพันธุ์ Hojiblanca และสายพันธุ์ Picual ตามลำดับ (ภาพที่ 17) ส่วนสายพันธุ์ที่พบว่ามีปริมาณสาร luteolin มากที่สุด คือ สายพันธุ์ Arbequina (98.4±1.4 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแห้ง 100 กรัม) รองลงมาคือ สายพันธุ์ Picual สายพันธุ์ Hojiblanca และสายพันธุ์ Manzanillo (ภาพที่ 18)



ภาพที่ 16 ปริมาณสาร oleuropein ในใบมะกอกโอลีฟ 4 สายพันธุ์

หมายเหตุ ตัวอักษร a-d ที่แตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

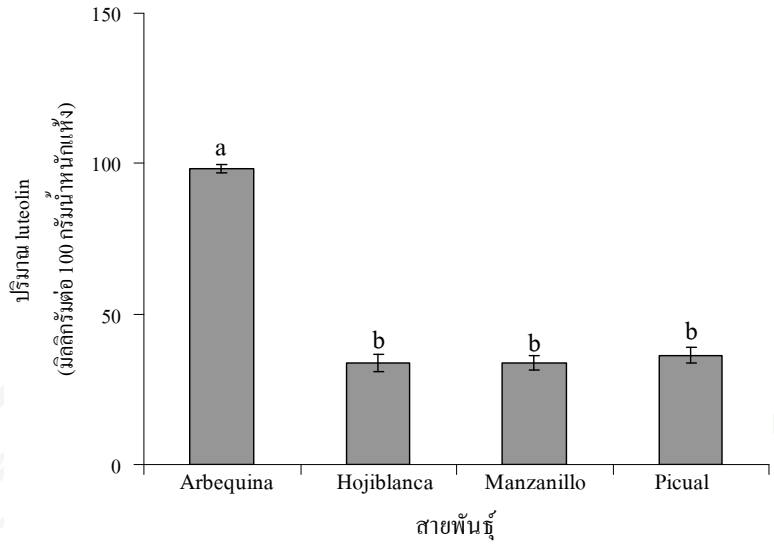
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 17 ปริมาณสาร luteolin 4′-glucoside (ก) และ luteolin 7-glucoside (ข)ในใบมะกอกโอลีฟ 4 สายพันธุ์

หมายเหตุ ตัวอักษร a-d ที่แตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 18 ปริมาณสาร luteolin ในใบมะกอกโอลีฟ 4 สายพันธุ์

หมายเหตุ ตัวอักษร a-d ที่แตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

จากผลการทดลองข้างต้นสอดคล้องกับผลงานวิจัยของ Briante *et al.* (2002) พบว่า ใบมะกอกโอลีฟ 9 สายพันธุ์ (Moraiolo, N3 (Don Carlo), N2, Coratina, Nociara, Frantoio, I-77, Kalamata และ Leccino) ที่เจริญเติบโตในอิตาลีมีปริมาณของสาร oleuropein ที่แตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ โดยสายพันธุ์ Moraiolo มีปริมาณของสาร oleuropein มากที่สุด และจากผลการศึกษาของ Meirinhos *et al.* (2005) ยังพบว่า ใบมะกอกโอลีฟ 18 สายพันธุ์ (Bical, Cordovesa, Madural, Verdeal Transmontana, Borrenta, Redondal, Borreira, Madural Fina, Madural Negra, Roupuda, Santulhana, Cobrancosa, Lentisca, Cornicabra, Negrinha do Freixo, Bical de Castelo Branco, Cordovil de Castelo Branco และ Galega) ที่เจริญเติบโตในภูมิภาคต่างๆ ของโปรตุเกสนั้นมีปริมาณของสารประกอบฟลาโวนอยด์ (luteolin 7,4′-*O*-diglucoside, luteolin 7-*O*-glucoside, rutin, apigenin 7-*O*-rutinoside, apigenin 7-*O*-glycoside, luteolin 4′-*O*-glucoside, luteolin, apigenin และ diosmetin) ที่แตกต่างกัน ต่อมาในปี 2011 จากผลการศึกษาของ Ansari *et al.* พบว่า ใบมะกอกโอลีฟสายพันธุ์ต่างๆ 8 สายพันธุ์ (Shiraz, Kerman, Behshahr, Roodbar, Paveh, Amol, Kermanshah และ Sarpol-e-Zahab) ที่เก็บจากพื้นที่ที่แตกต่างกันทางตอนใต้และเหนือของประเทศอิหร่าน มีปริมาณของสาร oleuropein ที่แตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ โดยพบปริมาณของสาร oleuropein

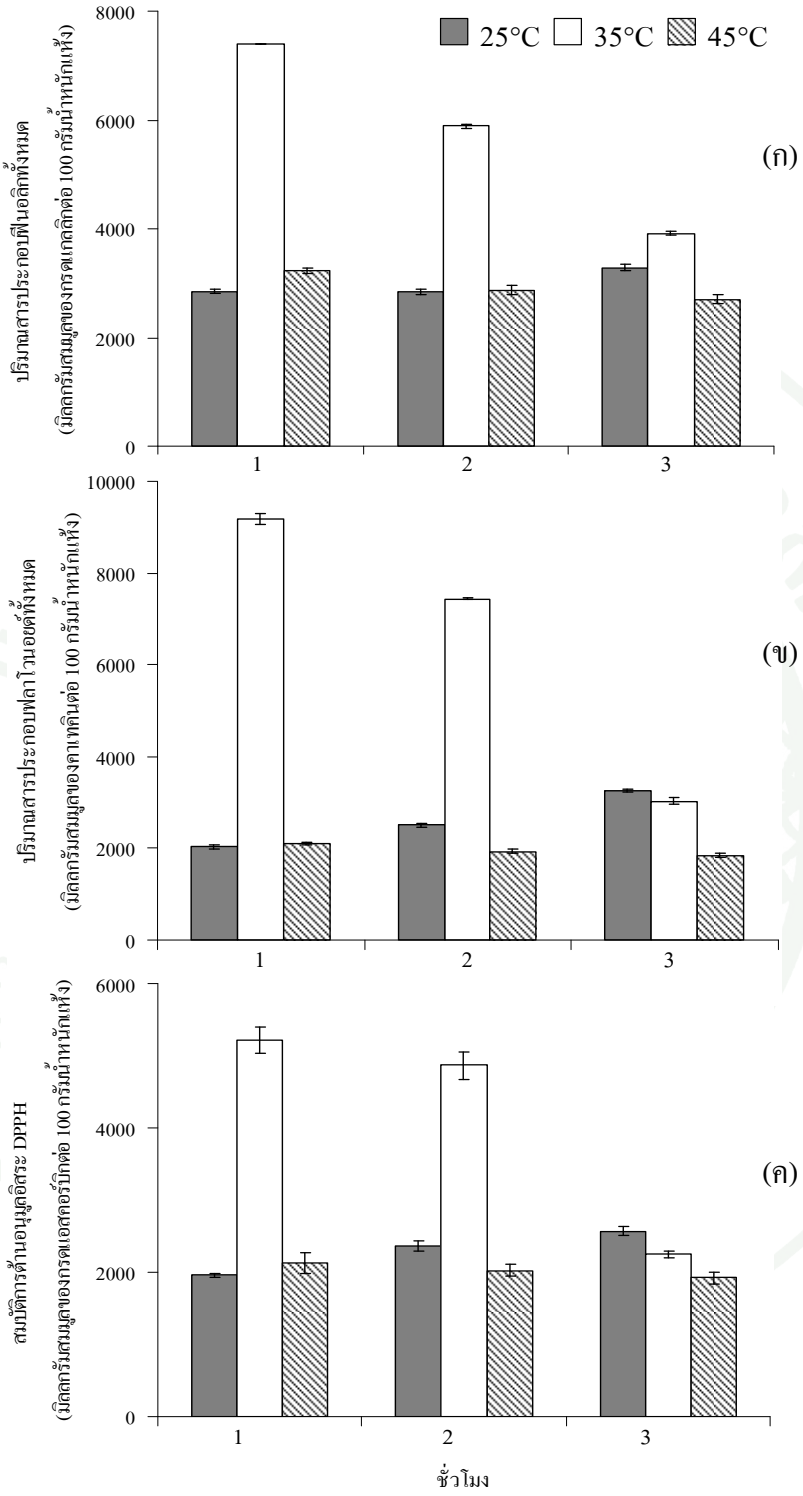
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประมาณ 6-13 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแห้ง 100 กรัม ซึ่งสายพันธุ์ Shiraz มีปริมาณของสาร oleuropein มากที่สุด และจากการศึกษาของ Scognamiglio *et al.* (2012) ยังพบว่า ใบมะกอกโอลีฟ 6 สายพันธุ์ (Frantoio, Pisciottana, Salella, Biancolilla, Rotondella และ FS-17) ที่เจริญเติบโตในอิตาลีมีปริมาณสารโพลีฟีนอลที่แตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ Frantoio มีปริมาณสาร luteolin 7-*O*-glucoside มากที่สุด สายพันธุ์ Biancolilla มีปริมาณสาร luteolin 4′-*O*-glucoside มากที่สุด ส่วนสายพันธุ์ Pisciottana มีปริมาณสาร luteolin มากที่สุด และจากการศึกษาของ Malik and Bradford (2006) พบว่า สาร oleuropein จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในเกสรตัวเมียที่พร้อมจะผสมพันธุ์ แต่จะค่อยๆ ลดลงอย่างชัดเจนในผลสุกของมะกอกโอลีฟ ส่วนในใบมะกอกโอลีฟจะมีปริมาณสาร oleuropein มากในใบอ่อนและจะค่อยๆ ลดลงในใบแก่เต็มที่ นอกจากนี้ ในปี 2011 จากผลการศึกษาของ Pandino *et al.* ยังพบว่า ใบอาติโชกที่แตกต่างกันแต่ละสายพันธุ์มีสารกลุ่มฟลาโวนเป็นสารประกอบหลักที่แตกต่างกันด้วย ได้แก่ luteolin, luteolin derivatives, apigenin และ apigenin derivatives

3. ผลการศึกษากระบวนการผลิตชาต่อสารประกอบฟีนอลิกและความสามารถต้านออกซิเดชันในใบมะกอกโอลีฟ

จากการศึกษากระบวนการผลิตชาดำใบมะกอกโอลีฟพบว่า ในระหว่างขั้นตอนการหมักของการผลิตชาดำใบมะกอกโอลีฟมีการเปลี่ยนแปลงปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และความสามารถต้านออกซิเดชันด้วยการวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของ DPPH โดยขั้นตอนการหมักจะใช้อุณหภูมิและระยะเวลาแตกต่างกัน คือ อุณหภูมิ 25, 35 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 1, 2 และ 3 ชั่วโมง ซึ่งพบว่า ชาดำใบมะกอกโอลีฟที่หมักที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมงมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุด (7397.8±2.0 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกในน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง 100 กรัม) สารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดมากที่สุด (9164.3±125.4 มิลลิกรัมสมมูลของคาเทคินในน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง 100 กรัม) และความสามารถต้านออกซิเดชันด้วยการวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของ DPPH มากที่สุด (5216.7±180.2 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแอสคอร์บิกในน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง 100 กรัม) ดังแสดงในภาพที่ 19 และตารางภาคผนวกที่ ค1-ค3

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



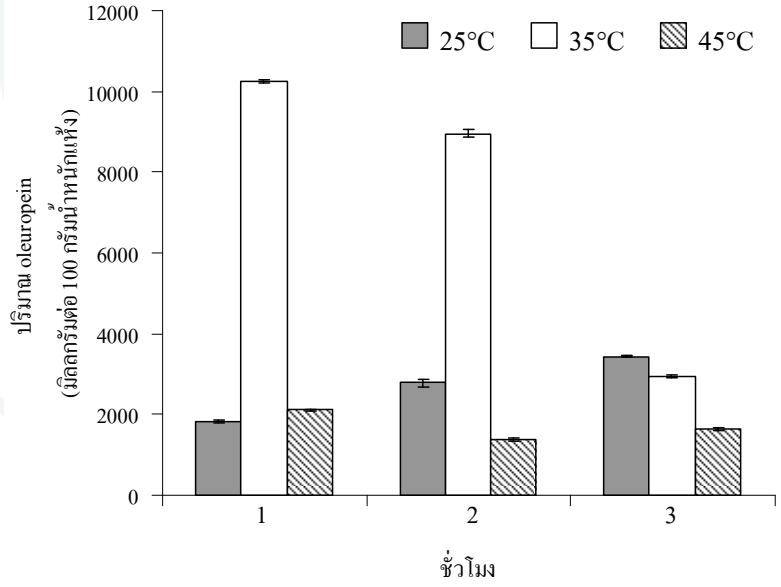
ภาพที่ 19 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (ก) สารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (ข) และความสามารถต้านออกซิเดชันด้วยการวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของ DPPH (ค) ของชาดำใบมะกอกโอลีฟที่หมักอุณหภูมิและระยะเวลาต่างกัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จากกระบวนการผลิตชาดำใบมะกอกโอลีฟในขั้นตอนการหมักที่ใช้อุณหภูมิและระยะเวลาแตกต่างกัน มีผลทำให้ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของ DPPH เพิ่มขึ้นและลดลงแตกต่างกัน เนื่องจากการเพิ่มอุณหภูมิจะส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์ เมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นในตอนแรกจะทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นเพราะมีการเพิ่มความเข้มข้นของสารที่เปลี่ยนสภาพ แต่ถ้าเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นไปอีกจะทำให้เอนไซม์เสียสภาพธรรมชาติไป โดยทั่วไป เอนไซม์จะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการทำปฏิกิริยาซึ่งอยู่ระหว่าง 30-40 องศาเซลเซียส ถ้าอุณหภูมิสูงขึ้นเป็น 45-50 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะเสียสภาพธรรมชาติและไม่สามารถทำงานได้ ทำให้กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ลดลงหรือสูญเสียการทำงานไป แต่อย่างไรก็ตามการทำงานของเอนไซม์ยังขึ้นอยู่กับระยะเวลาอีกด้วย โดยการใช้อุณหภูมิสูงจะใช้ระยเวลาสั้น ส่วนการใช้อุณหภูมิต่ำจะใช้ระยเวลานานขึ้น (พัชรา, 2543; ทนง, 2522) นอกจากนี้ ในกระบวนการผลิตชาดำยังมีขั้นตอนการคั่วนวด และการทำแห้ง ซึ่งขั้นตอนการคั่วนวดมีผลทำให้ผนังเซลล์ฉีกขาดมากขึ้นและเกิดการเปลี่ยนแปลงทั้งจากปฏิกิริยาทางเคมีและเอนไซม์ จึงทำให้ความสามารถในการต้านออกซิเดชันมากขึ้น ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวขึ้นอยู่กับชนิดและความสามารถในการต้านออกซิเดชัน รวมทั้งชนิดและปริมาณเอนไซม์ต่างๆ เช่น polyphenol oxidase ที่เป็นองค์ประกอบในพืชแต่ละชนิด (วริพัสย์ และนภดล, 2549) ส่วนขั้นตอนการทำแห้งนั้นเป็นอีกหนึ่งขั้นตอนที่มีการให้ความร้อน โดยความร้อนจะทำให้เกิดกลิ่นรสที่ต้องการ ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ใหม่ที่มีสมบัติในการทำลายอนุมูลอิสระ และจากผลของการเร่งปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลที่ทำให้เกิดสารตัวกลาง (intermediates) หลายชนิดที่มีสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ (Morales and Jimenez-Perez, 2001) และจากการศึกษาของ Cheigh *et al.* (1995) ที่ศึกษาคุณสมบัติของสารตัวกลางที่เกิดจากปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลในสารละลายที่มีคาเทคินเป็นองค์ประกอบ พบว่า สารตัวกลางเหล่านี้มีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้น สมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างที่ผ่านการให้ความร้อนอาจไม่ใช่สารพฤกษเคมีที่เป็นองค์ประกอบในพืช แต่เป็นสมบัติของสารประกอบที่เกิดในระหว่างกระบวนการแปรรูป

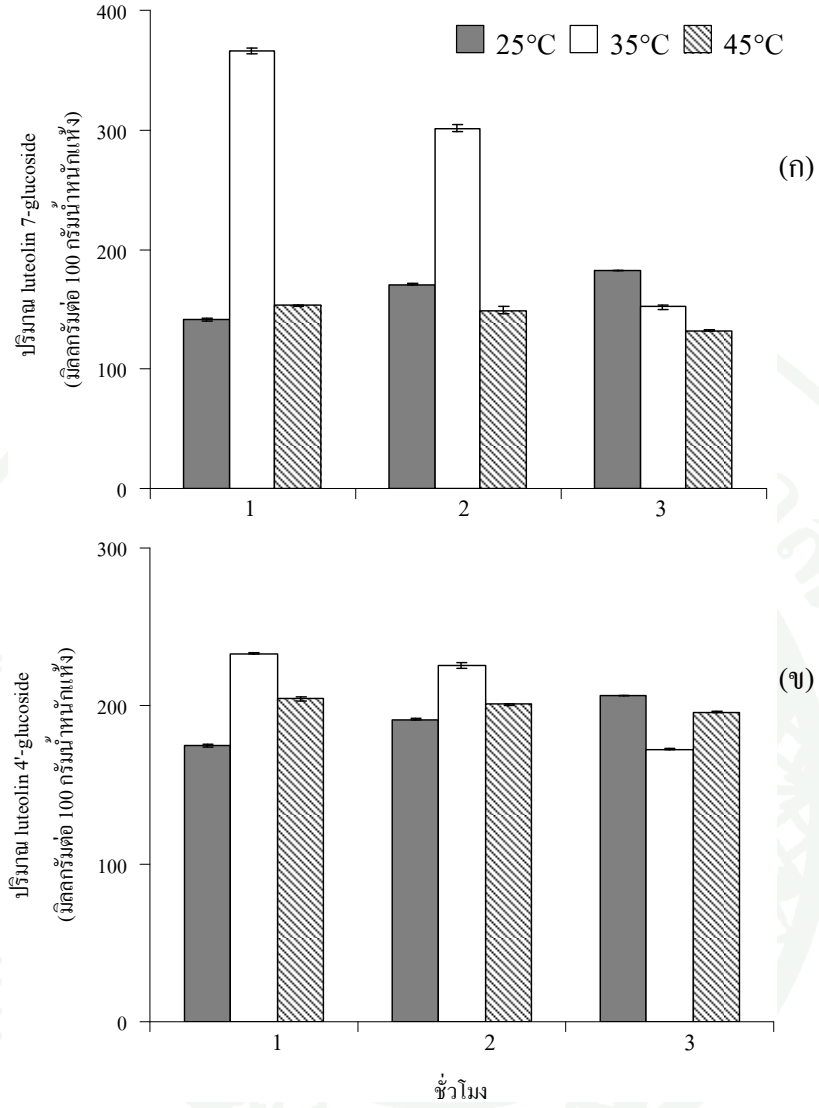
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เมื่อศึกษาผลของกระบวนการผลิตชาดำใบมะกอกโอลีฟในขั้นตอนการหมักที่ใช้อุณหภูมิและระยะเวลาแตกต่างกันที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกชนิดหลัก คือ สาร oleuropein, luteolin 7-glucoside, luteolin 4′-glucoside และ luteolin พบว่า ชาดำใบมะกอกโอลีฟที่หมักที่อุณหภูมิและระยะเวลาแตกต่างกันมีผลทำให้ปริมาณของสาร oleuropein, luteolin 7-glucoside, luteolin 4′-glucoside และ luteolin แตกต่างกัน โดยชาดำใบมะกอกโอลีฟที่หมักที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง มีปริมาณสาร oleuropein มากที่สุด (10,255.9±30.2 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแห้ง 100 กรัมของชาดำใบมะกอกโอลีฟ) สาร luteolin 7-glucoside มากที่สุด (366.0±2.6 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแห้ง 100 กรัมของชาดำใบมะกอกโอลีฟ) และสาร luteolin 4′-glucoside มากที่สุด (233.3±0.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแห้ง 100 กรัมของชาดำใบมะกอกโอลีฟ) (ภาพที่ 20-21 และตารางภาคผนวกที่ ข1-ข3) ส่วนสาร luteolin ตรวจไม่พบในชาดำใบมะกอกโอลีฟ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสาร luteolin เป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ซึ่งสามารถที่จะเกิดการ glycosylation ได้ โดย glycosylation เป็นกระบวนการเติมน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวในหมู่ไฮดรอกซิล ซึ่งจะเกิดที่ตำแหน่ง 3, 5, 7 และ 4′ (Markham, 1982)



ภาพที่ 20 ปริมาณสาร oleuropein ของชาดำใบมะกอกโอลีฟที่หมักอุณหภูมิและระยะเวลาต่างกัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 21 ปริมาณสาร luteolin 7-glucoside (ก) และ luteolin 4′-glucoside (ข) ของชาดำใบมะกอกโอลีฟที่หมักอุณหภูมิและระยะเวลาต่างกัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

โดยการผลทดลองข้างต้นสอดคล้องกับการศึกษาของ วริพัสย์ และนราพร (2550) ที่พบว่าปริมาณสารประกอบคาเทคินมีการลดลงอย่างรวดเร็วพบในช่วงระยะเวลาการหมัก 0 ถึง 40 นาที จากนั้นจึงค่อยๆ ลดลงอย่างช้าๆ และการสูญเสียปริมาณอีพิแกลโลคาเทคินในชาเบ็ญจขันธ์จะสูงกว่าสารประกอบคาเทคินอื่นๆ เนื่องจากระยะเวลาการหมักมีผลต่อการลดปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลอย่างมีนัยสำคัญ และจากการฉีกขาดของผนังเซลล์พืชจะส่งผลให้เอนไซม์ต่างๆ สามารถเข้าทำปฏิกิริยาออกซิเดชันและปฏิกิริยาโพลีเมอไรเซชัน ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารประกอบโพลีฟีนอล หรือเกิดปฏิกิริยาเคมีอื่นๆ ที่ส่งผลต่อปริมาณโพลีฟีนอลที่ลดลง (Tufekci and Guner, 1997) และในปี 2001 จากการศึกษาของ Oband *et. al* พบว่า อุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียสและระยะเวลาในการหมักที่เพิ่มมากขึ้นทำให้ปริมาณสาร theaflavin ลดลงแต่ปริมาณสาร thearubigin จะเพิ่มมากขึ้น ขณะที่ Muthumani and Kumar (2007) พบว่า ระยะเวลาการหมักมีผลต่อสาร theaflavin และ thearubigin เช่นกัน เนื่องจากในระหว่างการกระบวนหมักสารคาเทคินและสารประกอบคาเทคินตัวอื่นๆ เช่น epicatechin (EC), epicatechin gallate (ECG), epigallocatechin (EGC) และ epigallocatechin gallate (EGCG) จะถูกออกซิไดซ์ไปเป็นสาร theaflavin และ thearubigin ด้วยเอนไซม์ที่สามารถทำปฏิกิริยาออกซิไดซ์ได้คือ โพลีฟีนอลออกซิเดสและเพอร์ออกซิเดส และเมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มมากขึ้น สาร theaflavin จะลดลงเปลี่ยนเป็นสาร thearubigin ทำให้สาร thearubigin มีปริมาณเพิ่มมากขึ้นเมื่อระยะเวลาการหมักมากขึ้น ซึ่งจะมีผลต่อการเกิดสีน้ำตาลและกลิ่นรสของชาดำด้วย อีกทั้งอุณหภูมิที่ใช้ในการหมักยังส่งผลต่อสารประกอบฟีนอลิก เนื่องจากการเพิ่มอุณหภูมิจะส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์ เมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นในตอนแรกจะทำให้อัตราร็วของปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นเพราะมีการเพิ่มความเข้มข้นของสารที่สภาพเปลี่ยน แต่ถ้าเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นไปอีกจะทำให้เอนไซม์เสียสภาพธรรมชาติไป เอนไซม์ที่สามารถทำงานได้จึงมีปริมาณลดลง (พัชรา, 2543) ดังนั้นขั้นตอนการหมักจึงเป็นขั้นตอนหนึ่งที่สำคัญต่อกระบวนการผลิตชาดำ โดยจะต้องควบคุมอุณหภูมิและระยะเวลาการหมักให้มีความเหมาะสม เพื่อคงคุณภาพและปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกที่สำคัญในใบชาได้

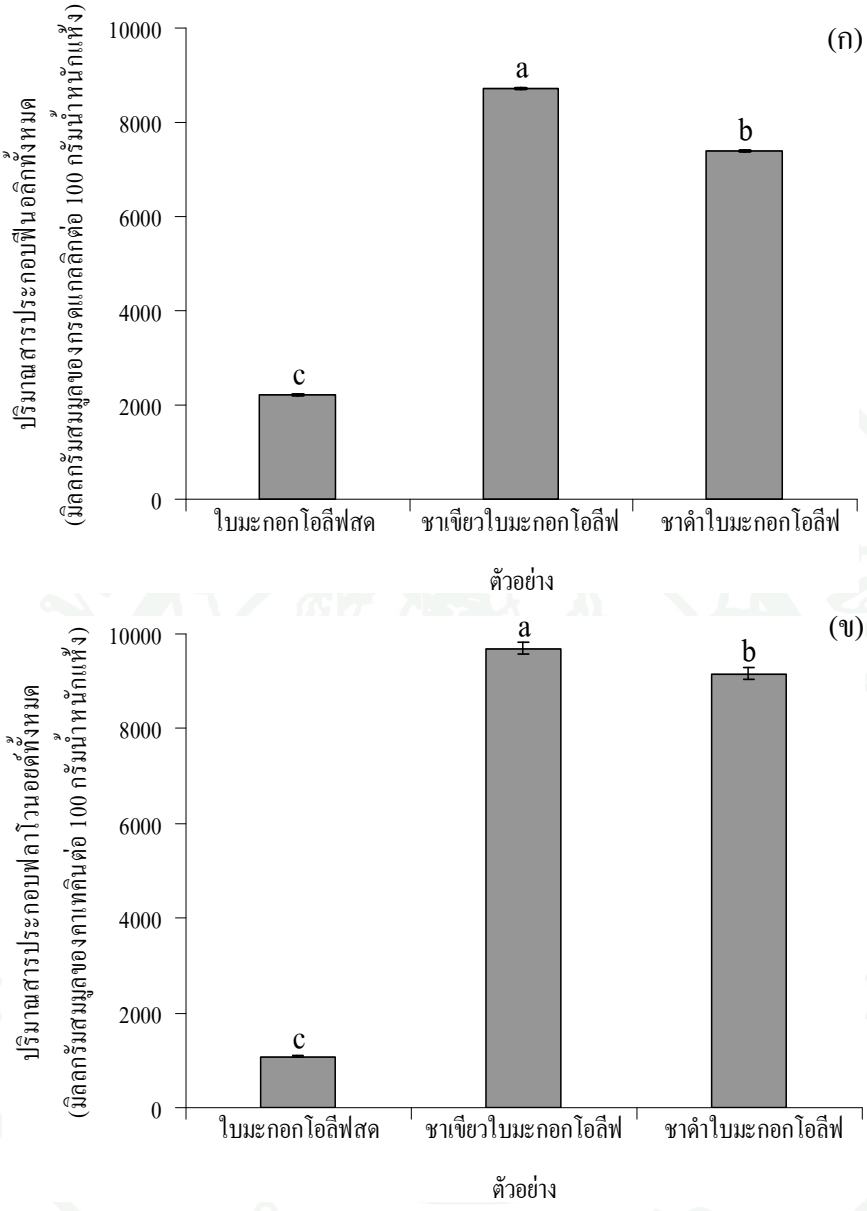
นอกจากนี้ อุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอนการทำแห้งอาจเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ทำให้สารประกอบฟีนอลิกชนิดหลักในใบมะกอกโอลีฟมีปริมาณเพิ่มขึ้นหรือลดลง ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Shuichi (2004) ที่พบว่า อุณหภูมิในการทำแห้งมีผลต่อปริมาณสาร oleuropein ในใบมะกอกโอลีฟ โดยการทำแห้งใบมะกอกโอลีฟที่อุณหภูมิ 65-80 องศาเซลเซียส จะทำให้สาร oleuropein เสื่อมสลายจากกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ แต่การการทำแห้งใบมะกอกโอลีฟที่อุณหภูมิมากกว่า 80 องศาเซลเซียส จะทำให้เอนไซม์ถูกทำลายซึ่งเป็นการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ทำให้สาร oleuropein เสื่อมสลายน้อยลง ต่อมาในปี 2008 จากการศึกษาของ Malik and Bradford พบว่า การทำแห้งใบมะกอกโอลีฟที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส ทำให้คงของสาร oleuropein ไว้ได้ อาจเนื่องมาจากการเสื่อมสลายของเอนไซม์ที่ทำให้การปรับเปลี่ยนโครงสร้างทางโมเลกุลเดิมของสาร oleuropein เมื่อมีอุณหภูมิที่สูง แต่จะทำให้สาร luteolin 7-glucoside และ luteolin 4′-glucoside เสื่อมสลายไป และจากการศึกษาของ Ahmad-Qasem *et al.* (2011) ยังพบว่า การทำแห้งใบมะกอกโอลีฟที่อุณหภูมิ 70 และ 120 องศาเซลเซียส เป็นวิธีการที่ทำให้มีสาร oleuropein ในปริมาณที่มาก โดยการทำแห้งใบมะกอกโอลีฟที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นวิธีการที่ทำให้มีสาร oleuropein ในปริมาณมากที่สุดอีกด้วย

จากการศึกษากระบวนการผลิตชา 2 ประเภท คือ กระบวนการผลิตชาเขียวใบมะกอกโอลีฟ และชาดำใบมะกอกโอลีฟ ที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และความสามารถต้านออกซิเดชันด้วยการวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของ DPPH พบว่า ชาเขียวใบมะกอกโอลีฟมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุด (8,719.8±7.2 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกในน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง 100 กรัม) รองลงมาคือ ชาดำใบมะกอกโอลีฟ (7,397.8±2.0 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกในน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง 100 กรัม) และใบมะกอกโอลีฟสด (2,228.3 ± 0.2 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกในน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง 100 กรัม) ตามลำดับ อีกทั้งชาเขียวใบมะกอกโอลีฟยังมีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดมากที่สุด (9,694.9±133.6 มิลลิกรัมสมมูลของคาเทคินในน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง 100 กรัม) รองลงมาคือ ชาดำใบมะกอกโอลีฟ (9,164.3±125.4 มิลลิกรัมสมมูลของคาเทคินในน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง 100 กรัม) และใบมะกอกโอลีฟสด (1,075.7±16.9 มิลลิกรัมสมมูลของคาเทคินในน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง 100 กรัม) ตามลำดับ (ภาพที่ 22) ส่วนความสามารถต้านออกซิเดชันด้วยการวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของ DPPH ก็พบว่า ชาเขียวใบมะกอกโอลีฟมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของ DPPH มากที่สุด (6,769.1±132.1 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแอสคอร์บิกในน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง 100 กรัม) รองลงมาคือ ชาดำใบมะกอกโอลีฟ (5,216.7±180.2 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแอสคอร์บิกในน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง 100 กรัม) และใบมะกอกโอลีฟสด (2,793.1± 81.2 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแอสคอร์บิกในน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง 100 กรัม) ตามลำดับ (ภาพที่ 23)

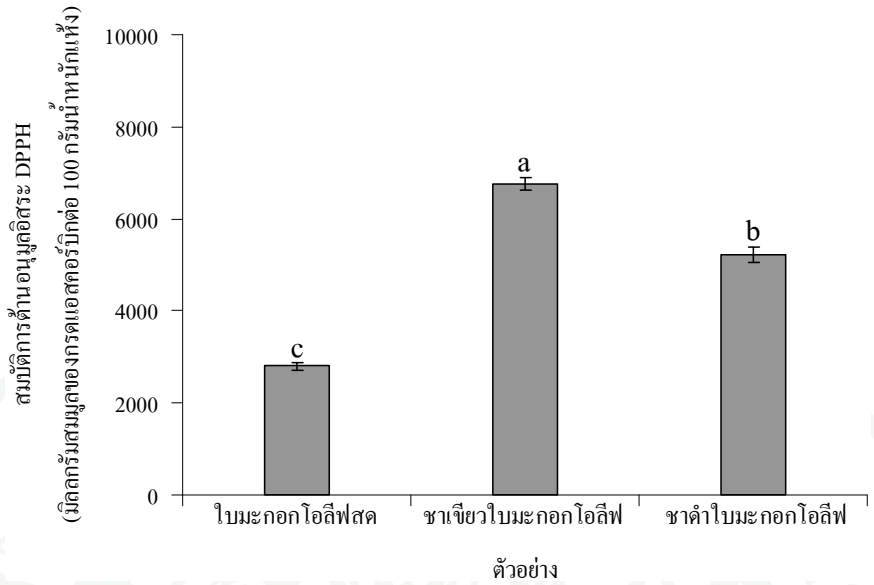
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 22 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (ก) และสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (ข) ของใบมะกอกโอลีฟสดและชาใบมะกอกโอลีฟ

หมายเหตุ ตัวอักษร a-c ที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ชาดำใบมะกอกโอลีฟ หมายถึง ชาดำใบมะกอกโอลีฟที่หมักที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 23 ความสามารถต้านออกซิเดชันด้วยการวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของ DPPH ของใบมะกอกโอลีฟสดและชาใบมะกอกโอลีฟ

หมายเหตุ ตัวอักษร a-c ที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)
ชาดำใบมะกอกโอลีฟ หมายถึง ชาดำใบมะกอกโอลีฟที่หมักที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

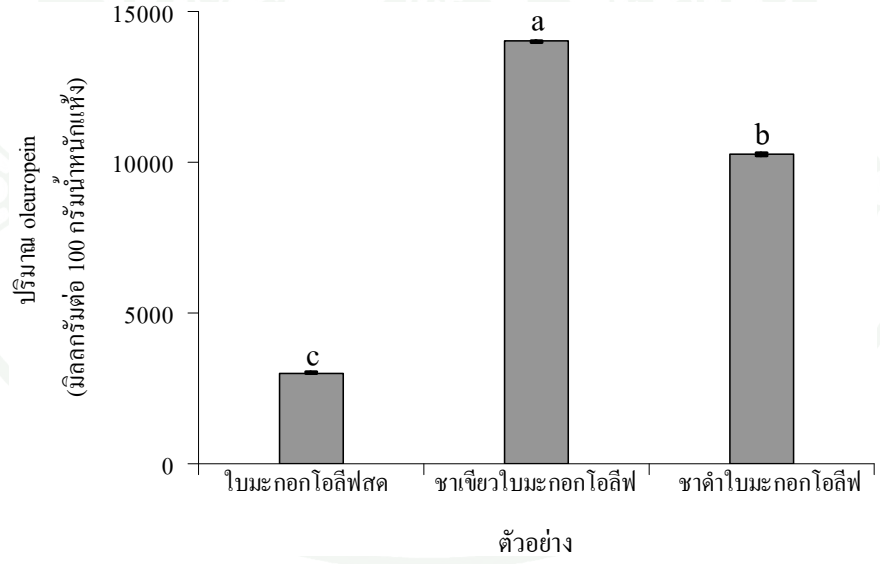
เมื่อเปรียบเทียบปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของ DPPH ในชาเขียวใบมะกอกโอลีฟและชาดำใบมะกอกโอลีฟกับใบมะกอกโอลีฟสด พบว่า ชาเขียวใบมะกอกโอลีฟและชาดำใบมะกอกโอลีฟมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมากกว่าใบมะกอกโอลีฟสดเท่ากับ 3.9 และ 3.3 เท่า ตามลำดับ ขณะที่มีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในชาเขียวใบมะกอกโอลีฟและชาดำใบมะกอกโอลีฟมากกว่าใบมะกอกโอลีฟสดเท่ากับ 9.0 และ 8.5 เท่า ตามลำดับ ส่วนความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของ DPPH ในชาเขียวใบมะกอกโอลีฟและชาดำใบมะกอกโอลีฟมีมากกว่าใบมะกอกโอลีฟสดเท่ากับ 2.4 และ 1.9 เท่า ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากกระบวนการผลิตชาเขียวใบมะกอกโอลีฟมีขั้นตอนการลวกเป็นขั้นตอนเริ่มต้นของการให้ความร้อนที่สามารถยับยั้งเอนไซม์และปฏิกิริยาเคมีต่างๆ ที่จะเกิดขึ้นกับสารโพลีฟีนอลในใบสดได้ โดยความร้อนที่อุณหภูมิสูงจะไปทำให้เอนไซม์เสียสภาพไม่สามารถไปเปลี่ยนแปลงสารในกลุ่มสารโพลีฟีนอลให้กลายเป็นสารเคมีชนิดอื่น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

(Cabrera *et al.*, 2006) จึงทำให้มีปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารประกอบฟลาโว-นอยด์ทั้งหมด และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของ DPPH มากกว่าชาดำใบมะกอกโอลีฟและใบมะกอกโอลีฟสด อีกทั้งกระบวนการผลิตชาทั้ง 2 ประเภทนี้ยังมีขั้นตอนการคั่วนวดและการทำแห้ง ส่วนกระบวนการผลิตชาดำจะมีขั้นตอนการหมักก่อนขั้นตอนการทำแห้ง โดยในขั้นตอนการคั่วนวดจะทำให้เซลล์ของใบแตกออกโดยที่ใบไม่แตกหัก การที่เซลล์แตกออกนั้นจะทำให้เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสสามารถซึมผ่านผนังเซลล์ไปทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นซึ่งอยู่ที่ส่วนอื่นได้ (สิริ, 2545) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ วริพัสย์ และนภดล (2549) ที่พบว่า ชาสมุนไพรปู่เฒ่าลืมไม้เท้ามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของ DPPH มากกว่าใบสด เป็นเพราะใบสดของสมุนไพรปู่เฒ่าลืมไม้เท้ามีลักษณะแข็งและหนา ทำให้ในการบดละเอียดเพียงอย่างเดียวไม่สามารถทำลายผนังโครงสร้างของใบได้ทั้งหมด จึงทำให้ไม่สามารถสกัดสารโพลีฟีนอลได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นในขั้นตอนการคั่วนวดและการหมักจะทำให้ผนังเซลล์ของพืชฉีกขาดมากขึ้น ทำให้สามารถสกัดสารประกอบโพลีฟีนอลได้ดีขึ้น และยังส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทั้งจากปฏิกิริยาทางเคมีและเอนไซม์ จึงทำให้ความสามารถในการต้านออกซิเดชันมากขึ้น ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวขึ้นอยู่กับชนิดและความสามารถในการต้านออกซิเดชัน รวมทั้งชนิดและปริมาณเอนไซม์ต่างๆ เช่น เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสที่เป็นองค์ประกอบในสมุนไพรสด ส่วนขั้นตอนการทำแห้งเป็นขั้นตอนที่มีการให้ความร้อนสูงขั้นตอนหนึ่งซึ่งจะเร่งปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาล ทำให้เกิดสารประกอบที่มีศักยภาพในการต้านออกซิเดชัน เนื่องจากสมบัติของสารตัวกลางที่เกิดจากปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลมีความสามารถในการต้านออกซิเดชัน ดังนั้นความสามารถในการต้านออกซิเดชันของชาใบมะกอกโอลีฟที่ผ่านการให้ความร้อนอาจไม่ใช่สารพฤกษเคมีที่เป็นองค์ประกอบในพืชตามธรรมชาติ แต่เป็นสมบัติของสารประกอบที่เกิดในระหว่างกระบวนการแปรรูป (Nicoli *et. al.,* 1997) อีกทั้งการที่พบว่าปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในชาใบมะกอกโอลีฟมีมากกว่าในใบมะกอกโอลีฟสด เนื่องมาจากสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดใช้หลักการทดสอบด้วยรีเอเจนต์ folin ciocalteu ซึ่งเป็นการทดสอบความสามารถในการให้อิเล็กตรอนแก่สาร molybdenum ดังนั้นสารประกอบอื่นๆ ที่ไม่ใช่สารประกอบฟีนอลก็สามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาดังกล่าวได้ ด้วยเหตุนี้ในการทดสอบด้วยวิธี folin ciocalteu reagent อาจไม่ใช่เป็นการทดสอบสารประกอบฟีนอลเพียงอย่างเดียว แต่เป็นการทดสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชันอื่นๆ ที่มีอยู่ในธรรมชาติ หรือสารประกอบอื่นๆ ที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการผลิต (Haung *et al.*, 2005)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

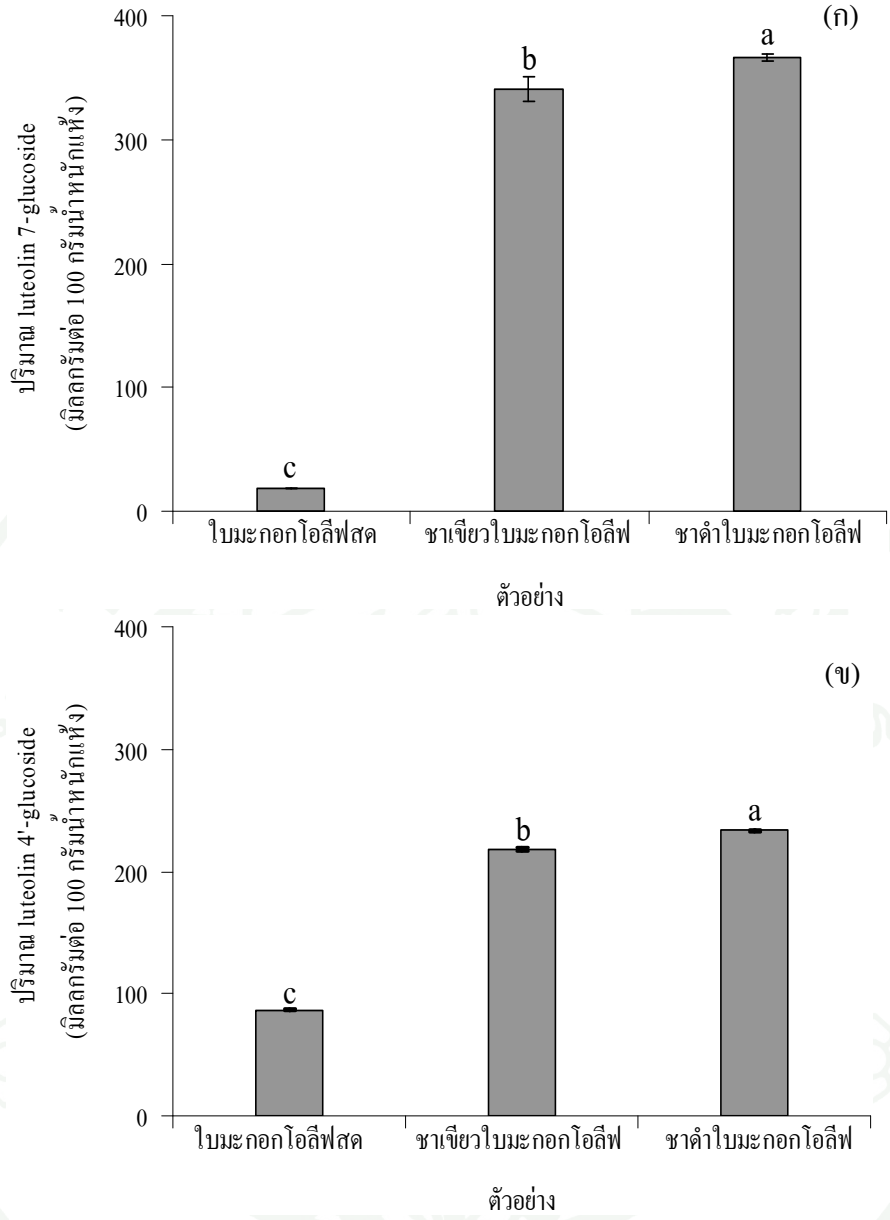
เมื่อศึกษาผลของกระบวนการผลิตชาเขียวใบมะกอกโอลีฟและชาดำใบมะกอกโอลีฟต่อปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกชนิดหลัก คือ สาร oleuropein, luteolin 7-glucoside, luteolin 4′-glucoside และ luteolin พบว่า ชาเขียวใบมะกอกโอลีฟมีปริมาณสาร oleuropein มากที่สุด (14,012.0±31.7 มิลลิกรัมในน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง 100 กรัม) รองลงมาคือ ชาดำใบมะกอกโอลีฟ (10,255.9±30.2 มิลลิกรัมในน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง 100 กรัม) และใบมะกอกโอลีฟสด (2,997.0±21.0 มิลลิกรัมในน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง 100 กรัม) ตามลำดับ (ภาพที่ 24) ในขณะที่ชาดำใบมะกอกโอลีฟมีปริมาณสาร luteolin 7-glucoside และ luteolin 4′-glucoside มากที่สุด (366.0±2.6 และ233.3±0.5 มิลลิกรัมในน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง 100 กรัม) รองลงมาคือ ชาเขียวใบมะกอกโอลีฟ (340.4±10.1 และ 217.8±1.5 มิลลิกรัมในน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง 100 กรัม) และใบมะกอกโอลีฟสด (164.5±4.3 และ 194.5±3.5 มิลลิกรัมในน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง 100 กรัม) ตามลำดับ (ภาพที่ 25) และโครมาโทแกรมของสารประกอบฟีนอลิกชนิดหลักในชาเขียวใบมะกอกโอลีฟและชาดำใบมะกอกโอลีฟแสดงในภาพผนวกที่ ข9-ข12 ส่วนสาร luteolin ตรวจไม่พบทั้งในชาเขียวใบมะกอกโอลีฟและชาดำใบมะกอกโอลีฟ



ภาพที่ 24 ปริมาณสาร oleuropein ของใบมะกอกโอลีฟสดและชาใบมะกอกโอลีฟ

หมายเหตุ ตัวอักษร a-c ที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)
ชาดำใบมะกอกโอลีฟ หมายถึง ชาดำใบมะกอกโอลีฟที่หมักที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 25 ปริมาณสาร luteolin 7-glucoside (ก) และ luteolin 4′-glucoside (ข) ของใบมะกอกโอลีฟสดและชาใบมะกอกโอลีฟ

หมายเหตุ ตัวอักษร a-c ที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)
ชาดำใบมะกอกโอลีฟ หมายถึง ชาดำใบมะกอกโอลีฟที่หมักที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกชนิดหลักในชาเขียวใบมะกอกโอลีฟและชาดำใบมะกอกโอลีฟกับใบมะกอกโอลีฟสด พบว่า ชาเขียวใบมะกอกโอลีฟและชาดำใบมะกอกโอลีฟมีปริมาณสาร oleuropein มากกว่าใบมะกอกโอลีฟสดเท่ากับ 4.7 และ 3.4 เท่า ตามลำดับ ขณะที่มีปริมาณสาร luteolin 7-glucoside ในชาดำใบมะกอกโอลีฟและชาเขียวใบมะกอกโอลีฟมากกว่าใบมะกอกโอลีฟสดเท่ากับ 2.2 และ 2.1 เท่า ตามลำดับ และมีปริมาณสาร luteolin 4′-glucoside ในชาดำใบมะกอกโอลีฟและชาเขียวใบมะกอกโอลีฟมากกว่าใบมะกอกโอลีฟสดเท่ากับ 1.2 และ 1.1 เท่า ตามลำดับ ส่วนสาร luteolin ตรวจไม่พบทั้งในชาเขียวใบมะกอกโอลีฟและชาดำใบมะกอกโอลีฟ ทั้งนี้ เนื่องจากกระบวนการผลิตชาเขียวใบมะกอกโอลีฟและชาดำใบมะกอกโอลีฟมีขั้นตอนการคั่วนวดซึ่งจะทำให้เซลล์ของใบแตกออกโดยที่ใบไม่แตกหัก การที่เซลล์แตกออกนั้นจะทำให้สามารถสกัดสารประกอบฟีนอลิกที่อยู่ภายในใบมะกอกโอลีฟได้มากขึ้น (วริพัสย์และนภดล, 2549) อีกทั้งขั้นตอนการลวกและการทำแห้ง ซึ่งเป็นขั้นตอนที่มีการให้ความร้อนสูงที่อุณหภูมิมากกว่า 80 องศาเซลเซียส จะทำให้เอนไซม์ถูกทำลายซึ่งเป็นการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ทำให้สาร oleuropein เสื่อมสลายน้อยลง (Shuichi, 2004) ส่วนการตรวจไม่พบสาร luteolin ในชาเขียวใบมะกอกโอลีฟและชาดำใบมะกอกโอลีฟ อาจเนื่องมาจากสาร luteolin เป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ซึ่งสามารถที่จะเกิดการ glycosylation ได้ โดย glycosylation เป็นกระบวนการเติมน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวในหมู่ไฮดรอกซิลซึ่งจะเกิดที่ตำแหน่ง 3, 5, 7 และ 4′ (Markham, 1982) แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาผลของความร้อนต่อการเกิด glycosylation ของสาร luteolin ในพืชยังคงไม่มีปรากฏแน่ชัด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. การสกัดใบมะกอกโอลีฟด้วยชนิดและความเข้มข้นที่แตกต่างกันของตัวทำละลายมีผลต่อปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และความสามารถต้านออกซิเดชัน โดยพบว่า ตัวทำละลาย 80% เอทานอลสามารถสกัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และความสามารถในการต้านออกซิเดชันในใบมะกอกโอลีฟสายพันธุ์ Hojiblanca ได้มากที่สุด

2. ความแตกต่างทางสายพันธุ์ของใบมะกอกโอลีฟมีผลต่อปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกชนิดหลัก สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และความสามารถต้านออกซิเดชัน โดยพบว่า สายพันธุ์ Manzanillo มีปริมาณสาร oleuropein และ luteolin 4′-glucoside มากที่สุด ขณะที่สายพันธุ์ Manzanillo และ Arbequina มีปริมาณสาร luteolin 7-glucoside มากที่สุด ส่วนสายพันธุ์ Arbequina มีปริมาณสาร luteolin มากที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่าสายพันธุ์ Hojiblanca มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และความสามารถในการต้านออกซิเดชันมากที่สุด

3. สารประกอบฟีนอลิกชนิดหลักที่พบในใบมะกอกโอลีฟ คือ สาร oleuropein, luteolin, luteolin 7-glucoside และ luteolin 4′-glucoside โดยใช้เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมกับเครื่องตรวจวัด Photodiode Array และร่วมกับเครื่องแมสสเปกโทรเมตรี

4. กระบวนการผลิตชามีผลต่อสารประกอบฟีนอลิกและความสามารถต้านออกซิเดชันในใบมะกอกโอลีฟ โดยกระบวนการผลิตชาเขียวและชาดำใบมะกอกโอลีฟมีผลทำให้สาร luteolin เสื่อมสลาย แต่สาร oleuropein, luteolin 7-glucoside และ luteolin 4′-glucoside มีปริมาณเพิ่มขึ้น อีกทั้งยังมีผลทำให้ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และความสามารถในการต้านออกซิเดชันเพิ่มขึ้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ข้อเสนอแนะ

1. ในการเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสม เพื่อให้สามารถสกัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกให้ได้มากที่สุดแล้ว ยังต้องคำนึงความปลอดภัย ราคา และการนำไปใช้ประโยชน์อื่นๆ ด้วย เช่น การสกัดเพื่อนำไปใช้ในการบริโภคหรือเป็นส่วนประกอบของเครื่องสำอาง ดังนั้น จึงควรเลือกใช้ตัวทำละลาย 80% เอทานอลในการสกัดซึ่งเป็นตัวทำละลายที่มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค

2. ควรมีศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและความสามารถในการต้านออกซิเดชันของชาใบมะกอกโอลีฟในระหว่างกระบวนการผลิตแต่ละขั้นตอน รวมทั้งควรมีการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดต่างๆ ในระหว่างกระบวนการผลิตแต่ละขั้นตอนของชาใบมะกอกโอลีฟด้วย เพื่อให้ทราบผลชัดเจนยิ่งขึ้นว่าขั้นตอนใดที่มีผลต่อการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ความสามารถในการต้านออกซิเดชัน และกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดต่างๆในชาใบมะกอกโอลีฟ ซึ่งจะนำไปสู่การปรับปรุงกระบวนการผลิตที่ทำให้ลดการสูญเสียของสารประกอบฟีนอลิกที่สำคัญชนิดต่างๆในใบมะกอกโอลีฟให้ได้มากที่สุด โดยไม่มีผลต่อลักษณะทางประสาทสัมผัสและสามารถควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ได้ เพื่อให้ผู้บริโภคได้รับประโยชน์อย่างสูงสุดซึ่งจะส่งผลที่ดีต่อสุขภาพ อีกทั้งยังเป็นการช่วยเพิ่มมูลค่าและเป็นแนวทางในการแปรรูปใบมะกอกโอลีฟเป็นผลิตภัณฑ์อาหารรวมทั้งเป็นการเพิ่มทางเลือกใหม่ให้กับผู้บริโภคอีกด้วย

3. ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับชนิดและปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกชนิดหลักอื่นๆ และความสามารถในการต้านออกซิเดชันของใบมะกอกโอลีฟที่เก็บเกี่ยวในฤดูกาล วิธีการเพาะปลูก หรือสถานที่เพาะปลูกที่แตกต่างกัน เพื่อให้ทราบถึงการเปลี่ยนแปลงของชนิดและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกชนิดหลักและความสามารถในการต้านออกซิเดชันในใบมะกอกโอลีฟ ซึ่งจะเป็นข้อมูลสำคัญที่มีประโยชน์และเป็นแนวทางในการศึกษาต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรมส่งเสริมอุตสาหกรรม. 2549. **พันธุ์ไม้ย้อมสีธรรมชาติ.** แหล่งที่มา: http://library.dip.go.th/multim6/edoc/16067.pdf, 21 พฤศจิกายน 2552.

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (โครงการทดลองปลูกพืชพรรณ). 2544. **มะกอกโอลีฟ.** แหล่งที่มา: http://www.rspg.or.th/experimental_project/olive/olive.htm, 21 พฤศจิกายน 2552.

จุลสารสวนพฤกษศาสตร์โรงเรียน. 2547. **มะกอกโอลีฟ (ตอนที่ 3)**. แหล่งที่มา: http://www.rspg.org/newslet/9_3.pdf, 21 พฤศจิกายน 2552.

ทนง ภัครัชพันธุ์. 2522. **เอนไซม์ในอุตสาหกรรมอาหาร**. ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นันทวัฒน์ ธัญญโกเศศสุข. 2551. **การศึกษาพารามิเตอร์ที่เหมาะสมในการสกัดสารเซซามินจากกากงา (*Sesamum indicum* Linn.) ในระบบตัวทำละลายร่วมน้ำและเอทานอล.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

นิรนาม. 2009. **อาหารเสริม (สารสกัดจากใบมะกอก)**. แหล่งที่มา: http://www.quest.net/products/nutrition/ol%C3%A9/introduction/th/, 2 มกราคม 2553.

ปราณี อ่านเปรื่อง. 2547. **เอนไซม์ทางอาหาร.** พิมพ์ครั้งที่ 4. สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

พัชรา วีระกะลัส. 2543. **เอนไซม์**. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

ไพโจน์ พงศ์ศุภสมินทร์. 2532. **เทคโนโลยีการผลิตชา**. ศูนย์ส่งเสริมอุตสาหกรรมภาคเหนือ กรมส่งเสริมอุตสาหกรรมเกษตร กระทรวงอุตสาหกรรม, กรุงเทพฯ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ไพโรจน์ วิริยจารี. 2535. **เครื่องดื่ม**. ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

มลศิริ วีโรทัย. 2540. ส่วนประกอบของอาหารเพื่อสุขภาพชนิดใหม่. **วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ**. 13 (2): 69-75.

วริพัสย์ อารีกุล และ นพดล เมตตาเมธา. 2549. ผลของกระบวนการผลิตต่อปริมาณโพลีฟีนอลและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดชาสมุนไพร. *ใน* **เอกสารประกอบการประชุมสัมมนาวิชาการอุตสาหกรรมการเกษตร ครั้งที่ 8 (นวัตกรรมทางอาหาร).** จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์, กรุงเทพฯ.

วัฒน์ระวี (นามแฝง). 2549. **ชาเขียว น้ำผึ้งหรือยาพิษ.** สำนักพิมพ์แสงดาว, กรุงเทพฯ.

วิวัฒน์ หวังเจริญ. 2545. บทบาทของสารประกอบฟีนอลต่อสุขภาพ. **วารสารอาหาร**. 32 (4): 245-253.

ศิริพร บุญชู. 2546. **ชาใบหม่อน.** กรมส่งเสริมการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศ กองบัญชาการตำรวจตระเวนชายแดน. 2550. **โครงการปลูกต้นมะกอกโอลีฟ (*Olea europaea* L.).** แหล่งที่มา: http://www.bpp.go.th/project/project_6.html, 21 พฤศจิกายน 2552.

สมใจ ขจรชีพพันธุ์งาม. 2549. อิทธิพลของอุณหภูมิ เวลา และตัวทำละลายที่มีต่อการสกัดสารเคอร์คูมินจากขมิ้นชัน. **วิศวกรรมสาร มหาวิทยาลัยขอนแก่น**. 33 (3): 225-236.

สิรี ชัยเสรี. 2545. **ชา กาแฟ โกโก้ และผลิตภัณฑ์.** เอกสารประกอบการสอนชุดวิชาวิทยาศาสตร์การอาหารเบื้องต้น. มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช.

อัญชนา เจนวิถีสุข. 2544. **การตรวจหาและบ่งชี้ชนิดสารต้านอนุมูลอิสระจากผักพื้นบ้านและสมุนไพรไทย**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

โอภา วัชระคุปต์. 2550. ภาวะถูกออกซิไดส์เกินสมดุลโดยอนุมูลอิสระและดัชนีชี้วัด, น. 71-104. *ใน* โอภา วัชระคุปต์, บรรณาธิการ. **สารต้านอนุมูลอิสระ.** นิวไทยมิตรการพิมพ์, กรุงเทพฯ.

Ahmad-Qasem, M.H., J. Cánovas, E. Barrajón-Catalán, J.E. Carreres, J.A. Cárcel and J.V. García-Pérez. 2011. Effect of drying method on some bioactive properties of olive leaves (var. Serrana) extracts. *In* **European Drying Conference – EuroDrying 2011.** 26-28 October 2011**,** Balearic Island, Spain.

Amic, D., D. Davidovic, D. Beslo and N. Trinajstic. 2003. Structure radical scavenging activity relationships of flavonoids. **Croatia Chemica Acta**. 76: 55-61.

Ansari, M., M. Kazemipourb and S. Fathib. 2011. Development of a simple green extraction procedure and HPLC method for determination of oleuropein in olive leaf extract applied to a multi-source comparative study. **Journal of the Iranian Chemical Society**. 8: 38-47.

AOAC. 2000. **Official Method of Analysis of AOAC International**. 17th ed. Horwitz, Willium: Association of Offcial Analytical Chemistry Inc.

Benavente-GarcõÂa, O., J. Castillo, J. Lorente, A. OrtunÄ and J.A. Del Rio. 2000. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves**. Journal of Food Chemistry**. 68: 457-462.

Bisignano, G., A. Tomaino, R.L. Cascio, G. Crisafi, N. Uccella and A. Saija. 1999. On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. 51 (8): 971-974.

Bouaziz, M., H. Hammami, Z. Bouallagui, H. Jemai and S. Sayadi. 2008. Production of antioxidants from olive processing by-products. **Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry**. 7 (8): 3231-3236.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Boudhrioua, N., N. Bahloul, I.B. Slimen and N. Kechaou. 2009. Comparison on the total phenol contents and the color of fresh and infrared dried olive leaves. **Industrial Crops and Products**. 29 (2-3): 412-419.

Briante, R., F.L. Cara, F. Febbraio, M. Patumi and R. Nucci. 2002. Bioactive derivatives from oleuropein by a biotransformation on *Olea europaea* leaf extracts. **Journal of Biotechnology**. 93: 109–119.

Bunker, M.M. 1999. Olives, pp. 273-277. In D.I. Jackson and N.E. Looney, eds. **Temperate and Subtropical Fruit Production**. Wallingford, Oxon.

Cabrera, C., R. Artacho and R. Gime´nez. 2006. Beneficial effects of green tea. **Journal of the American College of Nutrition**. 25 (2): 79–99.

Cheigh, H.S., S.H. Um and C.Y. Lee. 1995. Antioixdant characteristicsof melanin-relatedproducts from enzymatic browning reaction of catechinina model system. *In* **Enzymatic browning and its prevention**. American ChemicalSociety, Washington DC.

Erbay, Z. and F. Icier. 2009. Optimization of hot air drying of olive leaves using response surface methodology. **Journal of Food Engineering**. 91: 533-541.

Fu, S., D. Arráez-Roman, A. Segura-Carretero, J.A. Menéndez, M.P. Menéndez-Gutiérrez, V. Micol and A. Fernández-Gutiérrez. 2010. Qualitative screening of phenolic compounds in olive leaf extracts by hyphenated liquid chromatography and preliminary evaluation of cytotoxic activity against human breast cancer cells. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. 397: 643-654.

Goulas, V., V.T. Papoti, V. Exarchou, M.Z. Tsimidou and I. P. Gerothanassis. 2010. Contribution of flavonoids to the overall radical scavenging activity of olive (*Olea europaea* L.) leaf polar extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 58: 3303-3308.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Huang, D., B. OU and R.L. Prior. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 53: 1841-1856.

Japón-Luján R., J.M. Luque-Rodríguez and M.D. Luque de Castro. 2006. Multivariate optimisation of the microwave-assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. 385: 753-759.

Jung, Ch.H., H.M. Seog, I.W. Choi, M.W. Park and H.Y. Cho. 2006. Antioxidant properties of various solvent extracts from wild ginseng leaves. **Food Science and Technology**. 39: 266-274.

Kim, D.O., K.W. Lee, H.J. Lee and C.Y. Lee. 2002. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 50: 3713-3717.

Kim, D.O., S.W. Jeong and C.Y. Lee. 2003. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. **Food Chemistry**. 81: 321-326.

Kim, T.J., J.H. Kim, Y.R. Jin and Y.P. Yun. 2006. The inhibitory effect and mechanism of luteolin 7-glucoside on rat aortic vascular smooth muscle cell proliferation. **Archives of Pharmacal Research**. 29 (1): 67-72.

Kontogianni, V.G. and I.P. Gerothanassis. 2012. Phenolic compounds and antioxidant activity of olive leaf extracts. **Natural Product Research**. 26: 186-189.

Leonardis, A.D. and V. Macciola. 2008. The hydroxytyrosol recovered from oil mill by-products as a possible food antioxidant. **Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry**. 7 (8): 3310-3314.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Lim, Y.Y. and E.P.L. Quah. 2007. Antioxidant properties of different cultivars of *Portulaca oleracea*. **Food Chemistry**. 103: 734-740.

López-Lázaro, M. 2009. Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**. 9: 31-59.

Maisuthisakul, P. 2008. Phenolic antioxidants from betel leaf (*Piper betel* Linn.) extract obtained with different solvents and extraction time. **University of the Thai Chamber of Commerce Journal**. 28 (2): 52-64.

Malik, N.S.A. and J.M. Bradford. 2006. Changes in oleuropein levels during differentiation and development of floral buds in 'Arbequina' olives. **Scientia Horticulturae**. 110: 274-278.

_____ and _____. 2008. Recovery and stability of oleuropein and other phenolic compounds during extraction and processing of olive (*Olea europaea* L.) leaves. **Journal of Food Agriculture & Environment**. 6(2): 8-13.

Markham, K.R. 1982. **Techniques of flavonoid identification**. Academic Press, London.

Martens, S. and A. Mithofer. 2005. Flavones and flavone synthases. **Phytochemistry**. 66: 2399-2407.

Meirinhos, J., B.M. Silva, P. Valenta˜o, R.M. Seabra, J.A. Pereira, A. Dias, P.B. Anarade and F. Ferreres. 2005. Analysis and quantification of flavonoidic compounds from Portuguese olive (*Olea europaea* L.) leaf cultivars. **Natural Product Research**. 19 (2): 189-195.

Morales, F.J. and S. Jimenez-Perez. 2001. Free radical scavenging capacity of maillard reaction products as related to colour and fluorescence. **Food Chemistry**. 72 (1): 119-125.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Muthumani, T. and R.S. Kumar. 2007. Influence of fermentation time on the development of compounds responsible for quality in black tea. **Food Chemistry**. 101: 98-102.

Mylonaki, S., E. Kiassos and D.P. Makris. 2008. Optimisation of the extraction olive (*Olea europaea*) leaf phenolics using water/ethanol-based solvent systems and response surface methodology. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. 392 (5): 977-985.

Nicoli, M.C., M. Anese, L. Parpinel, S. Franceschi and C.R. Lerici. 1997. Loss and /or formation of antioxidants during food processing and storage. **Cancer Letters**. 114: 71-74.

Obanda, M., P. Okinda Owuor and R. Mang'okab. 2001. Changes in the chemical and sensory quality parameters of black tea due to variations of fermentation time and temperature. **Food Chemistry**. 75: 395-404.

Oliveira, I., V. Coelho, R. Baltasar, J.A. Pereira and P. Baptista. 2009. Scavenging capacity of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaves on free radicals. **Food and Chemical Toxicology**. 47: 1507-1511.

Omar, S.H. 2010. Oleuropein in olive and its pharmacological effects. **Scientia Phamaceutica**. 78: 133-154.

Pandino, G., S. Lombardo, G. Mauromicale and G. Williamson. 2011. Phenolic acids and flavonoids in leaf and floral stem of cultivated and wild *Cynara cardunculus* L. genotypes. **Food Chemistry**. 126: 417-422.

Papoti, V.T. and M.Z. Tsimidou. 2009. Impact of sampling parameters on the radical scavenging potential of olive (*Olea europaea* L.) leaves. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 57: 3470-3477.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Patil, C.S., V.P. Singh, P.S.V. Satyanarayan, N.K. Jain, A. Singh and S.K. Kulkarni. 2003. Protective effect of flavonoids against aging and lipopolysaccharide-induced cognitive impairment in mice. **Pharmacology**. 69: 59-67.

Pereira, A.P., I.C.F.R. Ferreira, F. Marcelino, P. Valentão, P.B. Andrade, R. Seabra, L. Estevinho , A. Bento and J.A. Pereira. 2007. Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea* L. *Cv.* Cobrançosa) leaves. **Molecules.** 12: 1153-1162.

Pereira, J.A., I. Oliveira, A. Sousa, P. Valenta˜o, P.B. Andrade, I. Ferreira, F. Ferreres, A. Bento, R. Seabra and L. Estevinho. 2007. Walnut (*Juglans regia* L.) leaves: Phenolic compounds, antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars. **Food and Chemical Toxicology**. 45: 2287-2295.

Perugini, P., M. Vettor, C. Rona, L. Troisi, L. Villanova, I. Genta, B. Conti and F. Pavanetto. 2008. Efficacy of oleuropein against UVB irradiation: preliminary evaluation. **International Journal of Cosmetic Science.** 30: 113-120.

Pietta, P.G. 2000. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**. 63: 1035-1042.

Premanath, R. and N. Lakshmidevi. 2010. Studies on anti-oxidant activity of *Tinospora cordifolia* (Miers.). **Journal of American Science**. 6 (10): 736-743.

Prior, R.L., X. Wu and K. Schaich. 2005. Standardized methods for the detemination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplement. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 53: 4290-4302.

Qiusheng, Z., Z. Yuntao, Z. Rongliang, G. Dean and L. Changling. 2005. Effects of verbascoside and luteolin on oxidative damage in brain of heroin treated mice. **Pharmacie**. 60 (7): 539-543.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Rice-Evans, C.A. and N.J. Miller. 1996. Antioxidant acitivities of flavonoids as bioactive compounds of foods. **Biochemical Society Transactions**. 24 (3): 790-795.

Sanchez-Moreno, C., A. Jimenez-Escria and J. Saura-Calixto. 2000. Study of low density lipoprotein oxidizability indexes to measure the antioxidant activity of dietary polyphenols. **Nutrition Research**. 20: 941-953.

Santoro, A., G. Bianco, P. Picerno, R.P. Aquino, G. Autore, S. Marzocco, P. Gazzerro, M.B. Lioi, and M. Bifulco. 2008. Verminoside and verbascoside-induced genotoxicity on human lymphocytes: involvement of PARP-1 and p53 proteins. **Toxicology Letters**. 178: 71-76.

Scognamiglio, M., B. D'Abrosca, S. Pacifico, V. Fiumano, P.F. De Luca, P. Monaco and A. Fiorentino. 2012. Polyphenol characterization and antioxidant evaluation of *Olea europaea* varieties cultivated in Cilento National Park (Italy). **Food Research International**. 46: 294–303.

Shuichi, H. 2004. Effect of drying temperature on the oleuropein content of olive (*Olea europea* L.) leaves. **Food Preservation Science**. 30 (4): 191-193.

Silva, S., L. Gomes, F. Leitao, A.V. Coelho and B.L. Vilas. 2006. Phenolic compounds and antioxidant activity of *Olea europaea* L. fruits and leaves. **Food Science and Technology International**. 12: 385-395.

Singh, I., M. Mok, A.M. Christensen, A.H. Turner and J.A. Hawley**.** 2008. The effects of polyphenols in olive leaves on platelet function. **Nutrition Metabolism and Cardiovascular Diseases**. 2: 127-132.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Singh, R.P., M. Chaidamdara and G.K. Jayaprakasha. 2002. Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro models. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 50: 81-86.

Stanojevic, L., M. Stankovic, V. Nikolic, L. Nikolic, D. Ristic, J. Canadanovic-Brunet and V. Tumbas. 2009. Antioxidant activity and total phenolic and flavonoid contents of *Hieracium pilosella* L. extracts. **Sensors.** 9: 5702-5714.

Tufekci, M. and S. Guner. 1997. The determination of optimum fermentation time in Turkish black tea manufacture. **Food Chemistry**. 60: 53-56.

Uematsu, K., K. Matsui, H. Shibazaki, S. Hayakawa and M. Ogawa. 2011. **Method for producing olive leaf extract containing polyphenol in high concentration and having masked bitter taste and bitter taste**. Japanese Patent JP2011125301

Visioli, F. and C. Galli. 1994. Oleuropein protects low density lipoprotein from oxidation. **Life Sciences**. 55 (24): 1965-1971.

Xu, W., L. Liu, B. Hua, Y. Sun, H. Ye, D. Mab and X. Zeng. 2010. TPC in the leaves of 116 sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) varieties and Pushu 53 leaf extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**. 23: 599-604.

Zhao, B. and C.A. Hall. 2008. Composition and antioxidant activity of raisin extracts obtained from various solvents. **Food Chemistry**. 108: 511-518.

Zheng, Q.S., X.L. Sun, B. Xu, G. Li and M. Song. 2005. Mechanisms of apigenin-7-glucoside as a hepatoprotective agent. **Biomedical and environmental science**. 18: 65-70.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ก

การวิเคราะห์ทางเคมี

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การวิเคราะห์ทางเคมี

1. การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น (AOAC, 2000)

1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

1.1.1 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
1.1.2 ตู้อบลมไฟฟ้า
1.1.3 ถ้วยอะลูมิเนียม
1.1.4 โถดูดความชื้น

1.2 วิธีการวิเคราะห์

อบถ้วยอะลูมิเนียมพร้อมฝาที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น นำมาชั่งน้ำหนักที่แน่นอนของถ้วยอะลูมิเนียม จากนั้นชั่งใบมะกอกโอลีฟที่แห้งและบดละเอียดลงในถ้วยอะลูมิเนียมหนัก 2.000 กรัม นำไปอบในตู้อบลมไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วนำไปชั่งน้ำหนัก และนำไปอบต่อในตู้อบลมไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้นแล้วนำไปชั่งน้ำหนักจนน้ำหนักคงที่

1.3 วิธีการคำนวณปริมาณความชื้น

ปริมาณความชื้น (%) = (A-B/A) x 100

เมื่อ A คือ น้ำหนักของตัวอย่างที่ใช้ก่อบอบ (กรัม)
B คือ น้ำหนักของตัวอย่างที่ใช้หลังอบ (กรัม)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ข1 ปริมาณสาร luteolin 7-glucoside ในชาดำใบมะกอกโอลีฟที่หมักที่อุณหภูมิและระยะเวลาที่แตกต่างกัน

ชาดำใบมะกอกโอลีฟ	ปริมาณสาร luteolin 7-glucoside* (มิลลิกรัม/ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง)		
	หมักที่อุณหภูมิ 25°ซ	หมักที่อุณหภูมิ 35°ซ	หมักที่อุณหภูมิ 45°ซ
หมักนาน 1 ชั่วโมง	141.96±1.22^{cC}	365.97±2.55^{aA}	153.12±0.87^{bA}
หมักนาน 2 ชั่วโมง	170.87±0.29^{bB}	301.02±2.94^{aB}	149.22±2.90^{cA}
หมักนาน 3 ชั่วโมง	182.87±0.01^{aA}	151.77±1.82^{bC}	132.20±0.59^{cB}

หมายเหตุ *ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตัวอักษร a-c ที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตัวอักษร A-C ที่แตกต่างกันในแนวดิ่งหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ข2 ปริมาณสาร luteolin 4′-glucoside ในชาดำใบมะกอกโอลีฟที่หมักที่อุณหภูมิและระยะเวลาที่แตกต่างกัน

ชาดำใบมะกอกโอลีฟ	ปริมาณสาร luteolin 4′-glucoside* (มิลลิกรัม/ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง)		
	หมักที่อุณหภูมิ 25°ซ	หมักที่อุณหภูมิ 35°ซ	หมักที่อุณหภูมิ 45°ซ
หมักนาน 1 ชั่วโมง	175.15±0.82^{cC}	233.34±0.53^{aA}	204.53±1.21^{bA}
หมักนาน 2 ชั่วโมง	191.65±0.66^{cB}	225.90±1.75^{aB}	200.94±0.48^{bB}
หมักนาน 3 ชั่วโมง	206.77±0.01^{aA}	172.55±0.30^{cC}	196.11±0.44^{bC}

หมายเหตุ *ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตัวอักษร a-c ที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตัวอักษร A-C ที่แตกต่างกันในแนวดิ่งหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ข3 ปริมาณสาร oleuropein ในชาดำใบมะกอกโอลีฟที่หมักที่อุณหภูมิและระยะเวลาที่แตกต่างกัน

ชาดำใบมะกอกโอลีฟ	ปริมาณสาร oleuropein* (มิลลิกรัม/ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง)		
	หมักที่อุณหภูมิ 25°ซ	หมักที่อุณหภูมิ 35°ซ	หมักที่อุณหภูมิ 45°ซ
หมักนาน 1 ชั่วโมง	1815.51±46.92^{cC}	10255.89±30.16^{aA}	2114.63±10.10^{bA}
หมักนาน 2 ชั่วโมง	2787.10±57.56^{bB}	8959.18±86.09^{aB}	1376.58±50.55^{cC}
หมักนาน 3 ชั่วโมง	3447.19±23.78^{aA}	2944.96±27.48^{bC}	1635.84±45.42^{cB}

หมายเหตุ *ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตัวอักษร a-c ที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตัวอักษร A-C ที่แตกต่างกันในแนวดิ่งหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกด้วยเทคนิค HPLC

1.1 วิธีการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกด้วยเทคนิค HPLC

1.1.1 นำสารสกัดใบมะกอกโอลีฟปริมาตร 2 มิลลิลิตรกรองด้วยตัวกรองขนาด 0.45 μm cellulose ใส่ขวดสีชา

1.1.2 ฉีดสารสกัดใบมะกอกโอลีฟและสารมาตรฐาน luteolin, luteolin 7-glucoside, luteolin 4′-glucoside และ oleuropein เข้าสู่เครื่อง HPLC ตามตารางที่ 3

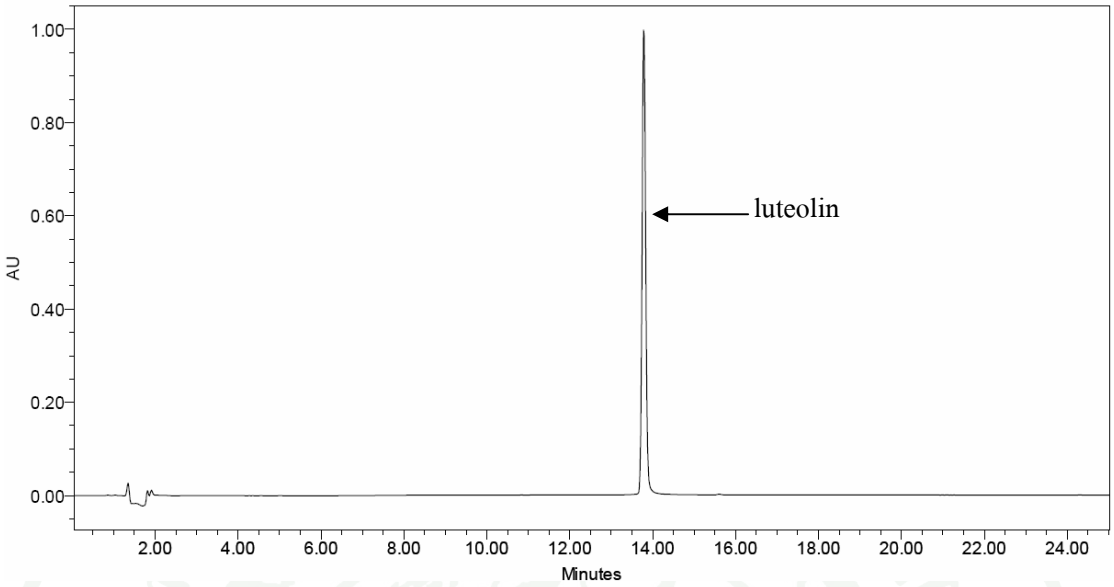
1.1.3 นำพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐานมาสร้างกราฟมาตรฐาน luteolin, luteolin 7-glucoside, luteolin 4′-glucoside และ oleuropein ดังแสดงในภาพผนวกที่ ข5-ข8 ส่วนตัวอย่างของสารมาตรฐาน ดังแสดงในภาพผนวกที่ ข1-ข4

1.2 วิธีการคำนวณ

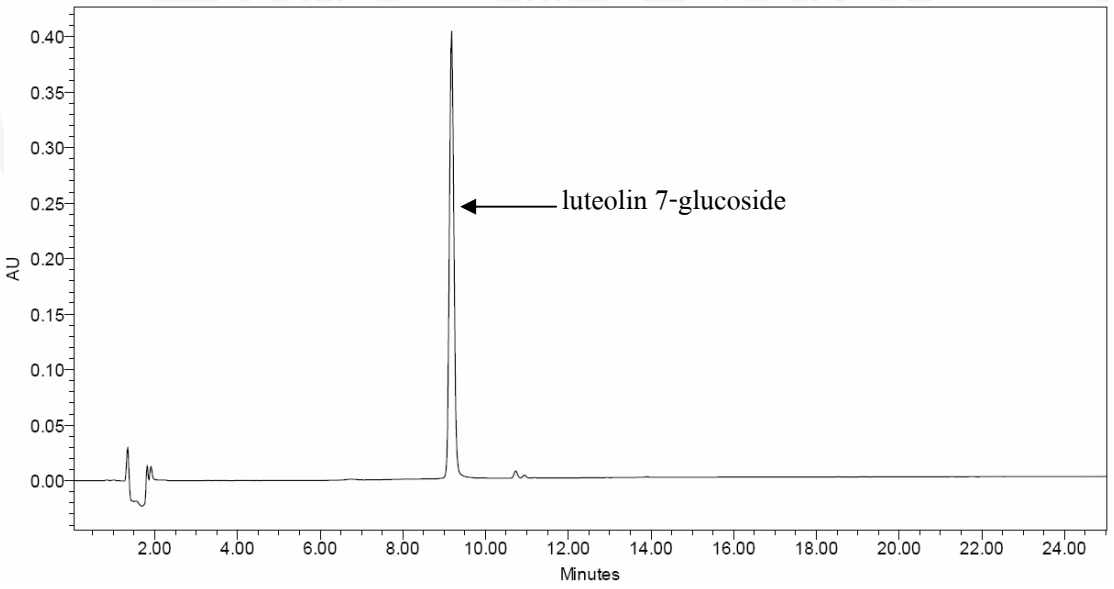
1.2.1 อ่านค่าพื้นที่ใต้พีคของสารที่ retention time ตรงกับ retention time ของสารมาตรฐาน luteolin, luteolin 7-glucoside และ luteolin 4′-glucoside โดยตรวจสอบที่ความยาวคลื่น 350 นาโนเมตร ส่วนสารมาตรฐาน oleuropein ตรวจสอบที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

1.2.2 ปริมาณสารในตัวอย่าง คำนวณหาปริมาณโดยการแทนพื้นที่ใต้พีคลงในสมการของกราฟสารมาตรฐาน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

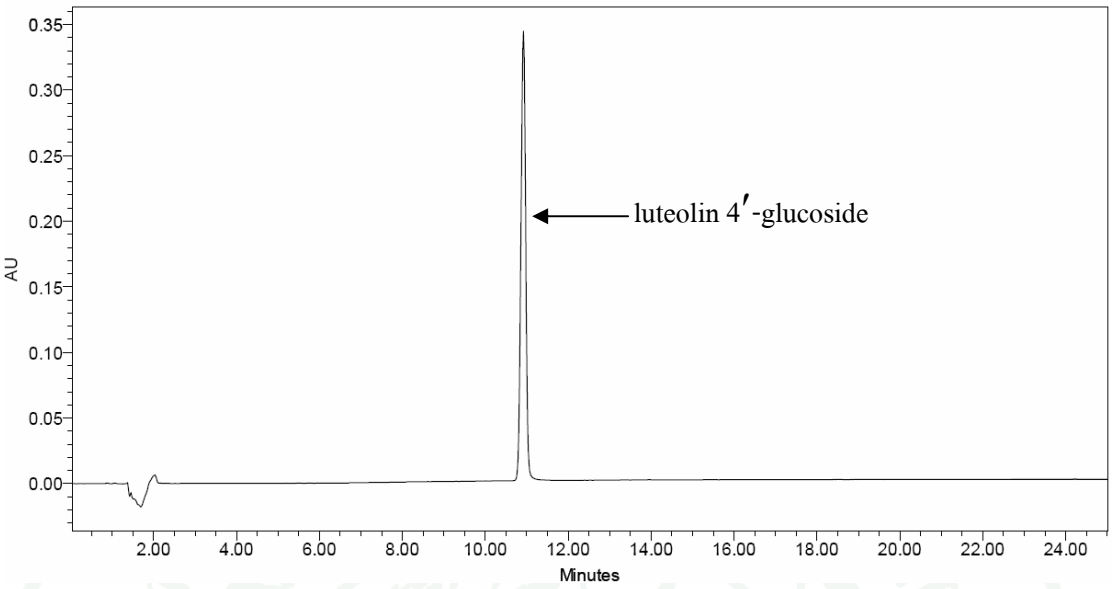


ภาพผนวกที่ ข1 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน luteolin ที่ความเข้มข้น 60 ppm

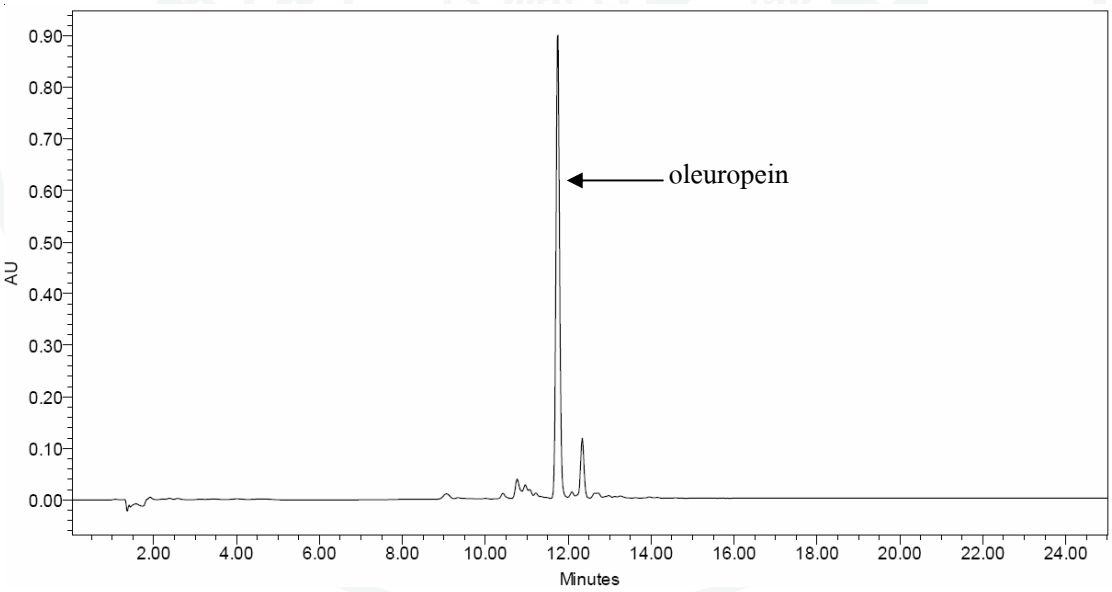


ภาพผนวกที่ ข2 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน luteolin 7-glucoside ที่ความเข้มข้น 60 ppm

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

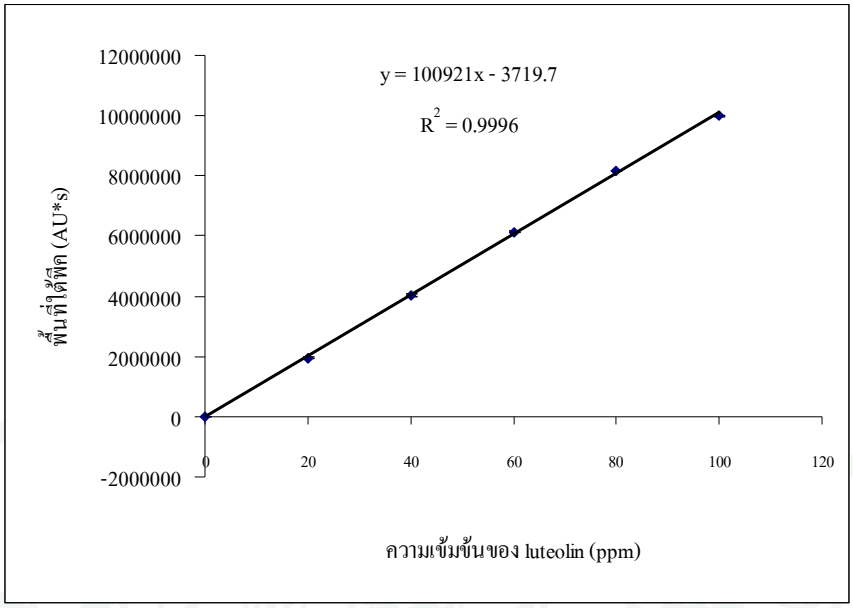


ภาพผนวกที่ ข3 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน luteolin 4′-glucoside ที่ความเข้มข้น 60 ppm

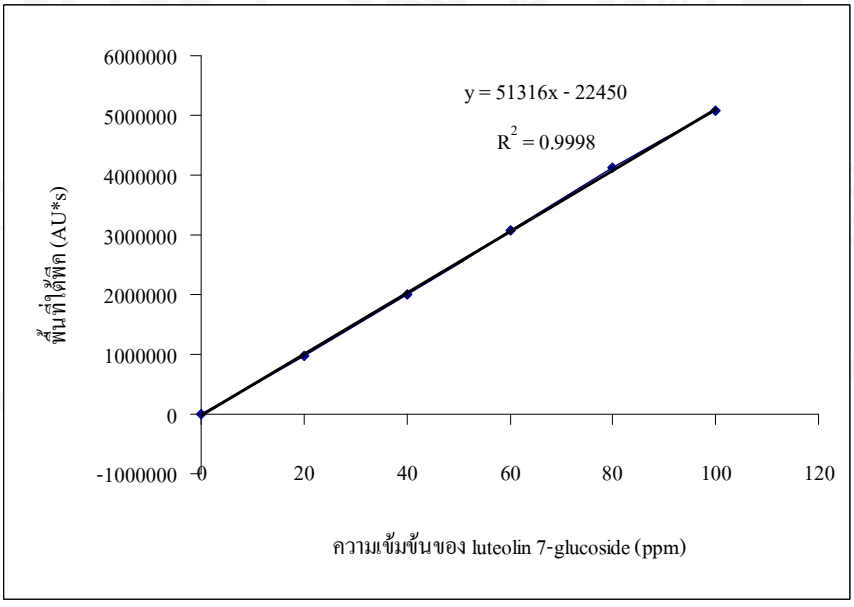


ภาพผนวกที่ ข4 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน oleuropein ที่ความเข้มข้น 1000 ppm

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

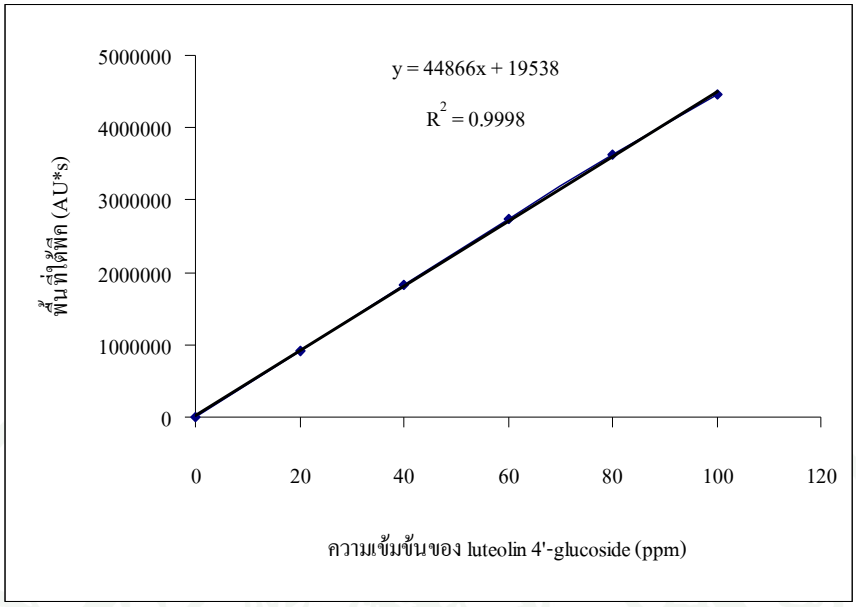


ภาพผนวกที่ ข5 กราฟมาตรฐาน luteolin

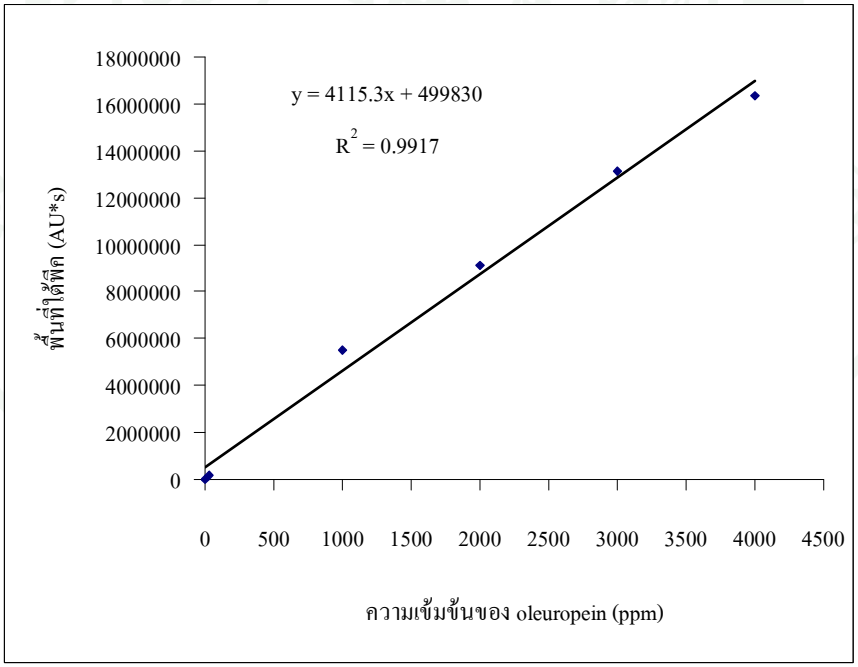


ภาพผนวกที่ ข6 กราฟมาตรฐาน luteolin 7-glucoside

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

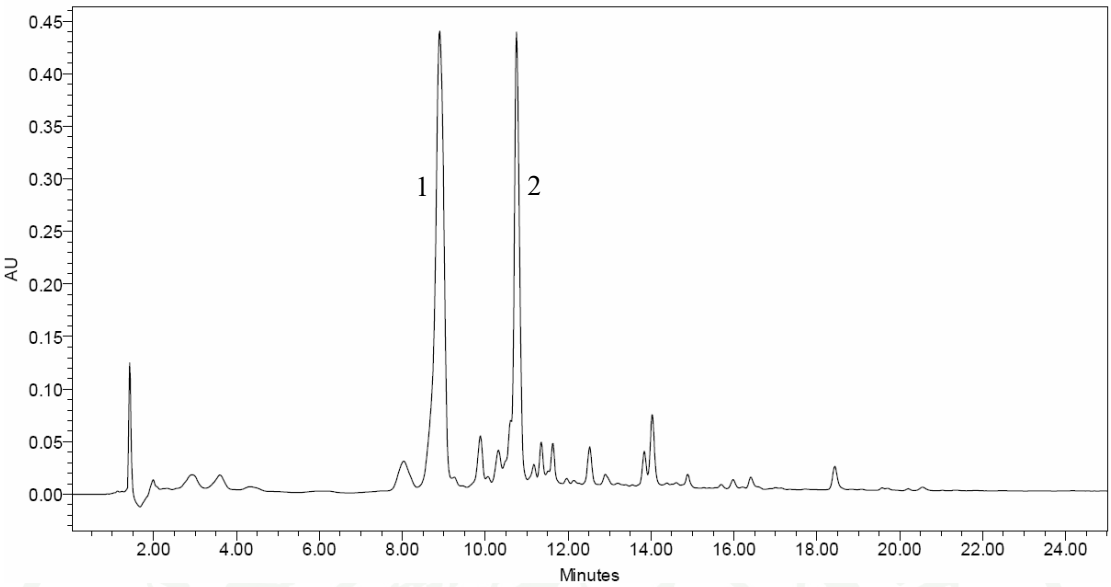


ภาพผนวกที่ ข7 กราฟมาตรฐาน luteolin 4′-glucoside

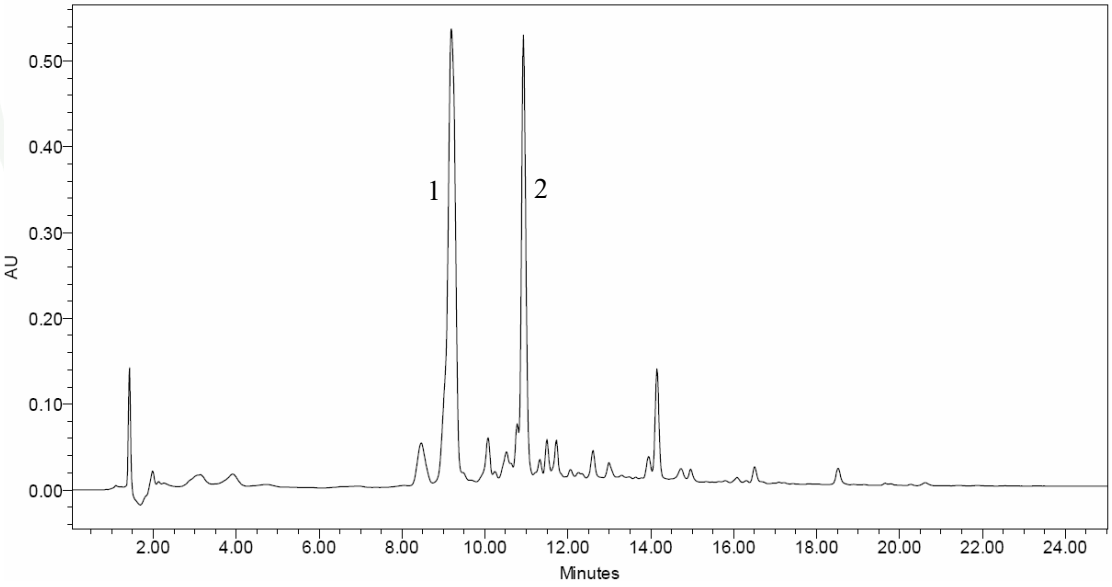


ภาพผนวกที่ ข8 กราฟมาตรฐาน oleuropein

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

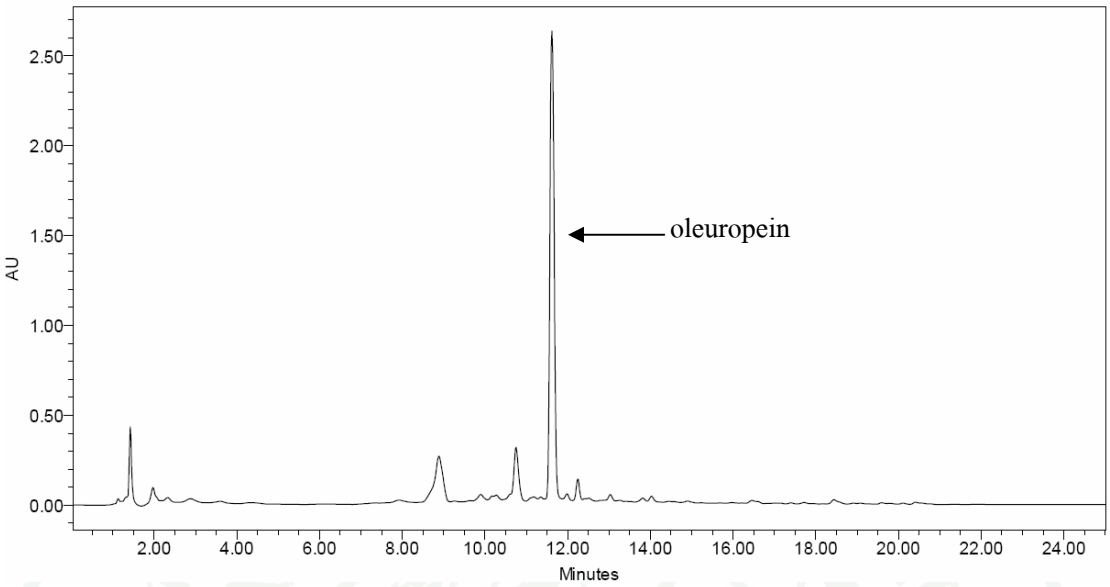


ภาพผนวกที่ ข9 โครมาโทแกรมของชาเขียวใบมะกอกโอลีฟที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ที่ความยาวคลื่น 350 นาโนเมตร (1: luteolin 7-glucoside; 2: luteolin 4′-glucoside)

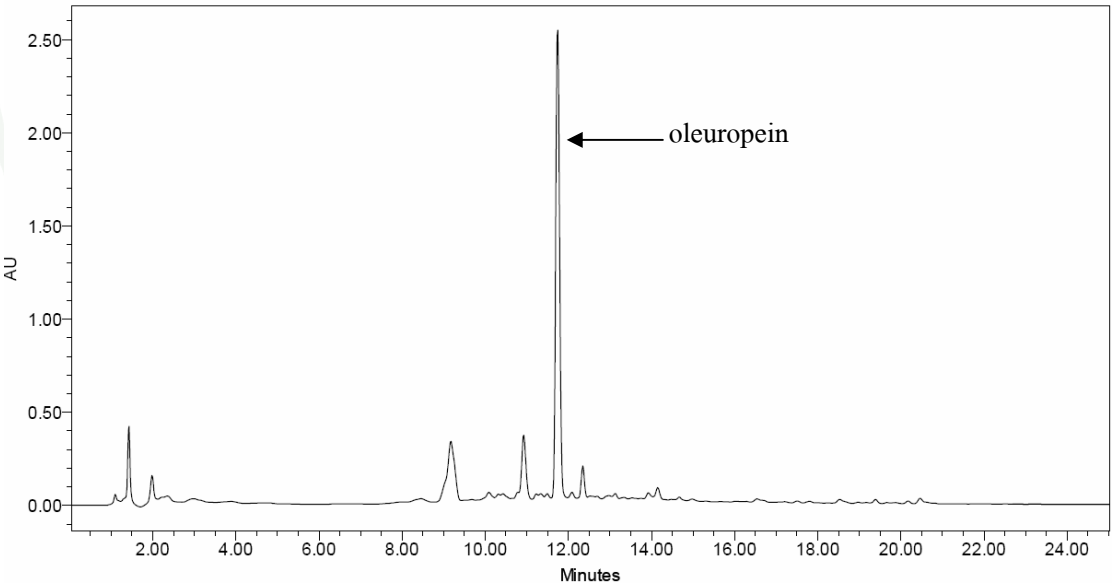


ภาพผนวกที่ ข10 โครมาโทแกรมของชาดำใบมะกอกโอลีฟที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ที่ความยาวคลื่น 350 นาโนเมตร (1: luteolin 7-glucoside; 2: luteolin 4′-glucoside)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพผนวกที่ ข11 โครมาโทแกรมของ oleuropein ในชาเขียวใบมะกอกโอลีฟที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร



ภาพผนวกที่ ข12 โครมาโทแกรมของ oleuropein ในชาดำใบมะกอกโอลีฟที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และสมบัติการต้านออกซิเดชัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในชาดำใบมะกอกโอลีฟที่หมักที่อุณหภูมิและระยะเวลาที่แตกต่างกัน

ชาดำใบมะกอกโอลีฟ	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด* (มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก/ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง)		
	หมักที่อุณหภูมิ 25°ซ	หมักที่อุณหภูมิ 35°ซ	หมักที่อุณหภูมิ 45°ซ
หมักนาน 1 ชั่วโมง	2844.09 ± 43.05^{cB}	7397.77 ± 2.40^{aA}	3216.41 ± 50.73^{bA}
หมักนาน 2 ชั่วโมง	2842.77 ± 46.83^{bB}	5885.31 ± 36.85^{aB}	2861.67 ± 83.99^{bB}
หมักนาน 3 ชั่วโมง	3280.25 ± 62.20^{bA}	3911.67 ± 32.27^{cC}	2699.08 ± 84.87^{cB}

หมายเหตุ *ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตัวอักษร a-c ที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตัวอักษร A-C ที่แตกต่างกันในแนวดิ่งหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค2 ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในชาดำใบมะกอกโอลีฟที่หมักที่อุณหภูมิและระยะเวลาที่แตกต่างกัน

ชาดำใบมะกอกโอลีฟ	ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด* (มิลลิกรัมสมมูลของคาเทคิน/ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง)		
	หมักที่อุณหภูมิ 25°ซ	หมักที่อุณหภูมิ 35°ซ	หมักที่อุณหภูมิ 45°ซ
หมักนาน 1 ชั่วโมง	2029.55 ± 37.61^{cC}	9164.32 ± 125.40^{aA}	2093.83 ± 33.12^{bA}
หมักนาน 2 ชั่วโมง	2504.64 ± 43.62^{bB}	7436.44 ± 19.06^{aB}	1931.48 ± 36.05^{cB}
หมักนาน 3 ชั่วโมง	3251.35 ± 32.15^{aA}	3022.24 ± 71.96^{bC}	1843.50 ± 39.65^{cB}

หมายเหตุ *ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตัวอักษร a-c ที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq0.05$)

ตัวอักษร A-C ที่แตกต่างกันในแนวดิ่งหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค3 สมบัติการต้านอนุมูลอิสระของ DPPH ในชาดำใบมะกอกโอลีฟที่หมักที่อุณหภูมิและระยะเวลาที่แตกต่างกัน

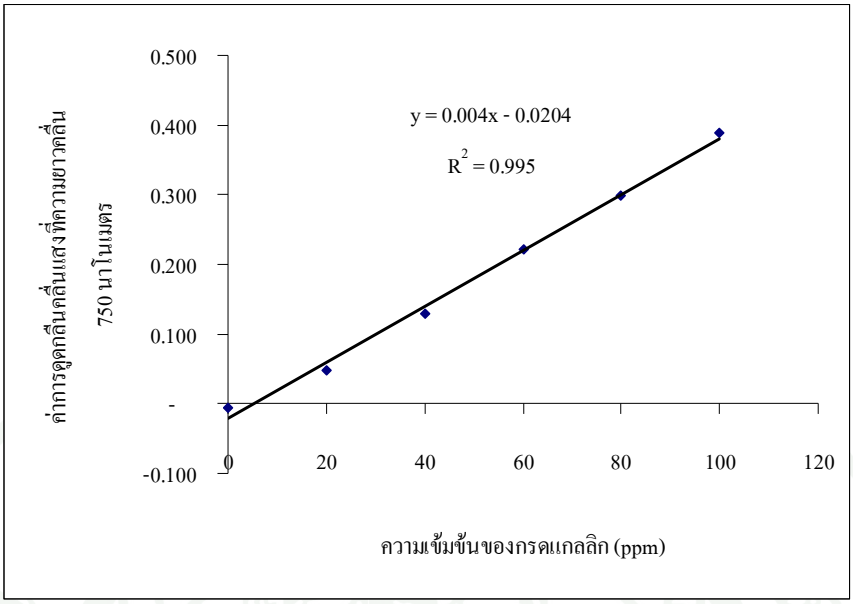
ชาดำใบมะกอกโอลีฟ	สมบัติการต้านอนุมูลอิสระของ DPPH* (มิลลิกรัมสมมูลของกรดแอสคอร์บิก/ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง)		
	หมักที่อุณหภูมิ 25°ซ	หมักที่อุณหภูมิ 35°ซ	หมักที่อุณหภูมิ 45°ซ
หมักนาน 1 ชั่วโมง	1955.61±23.21^{bC}	5216.74±180.24^{aA}	2133.44±145.24^{bA}
หมักนาน 2 ชั่วโมง	2361.41±71.76^{bB}	4866.59±188.5^{aA}	2026.94±76.97^{bA}
หมักนาน 3 ชั่วโมง	2565.35±64.86^{aA}	2251.35±43.50^{bB}	1918.76±83.44^{cA}

หมายเหตุ *ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

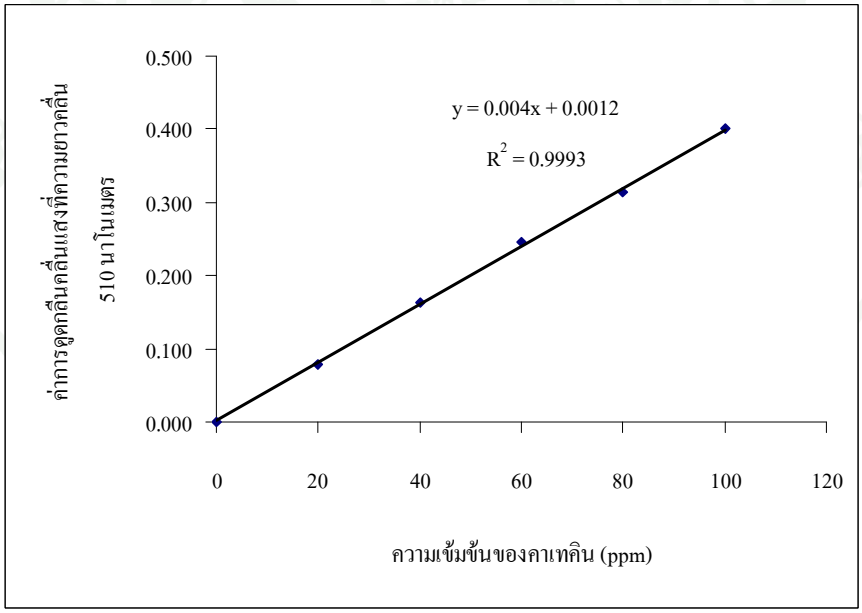
ตัวอักษร a-c ที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตัวอักษร A-C ที่แตกต่างกันในแนวดิ่งหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

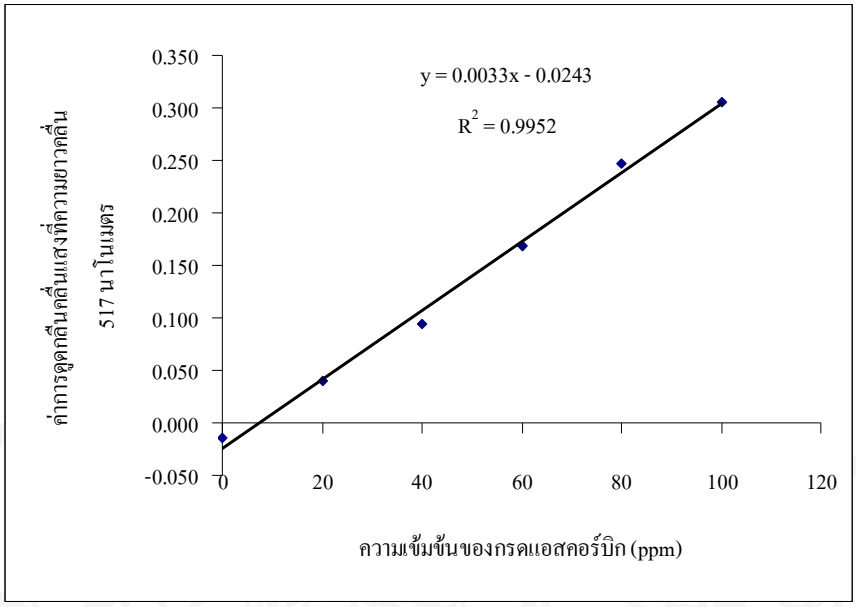


ภาพผนวกที่ ค1 กราฟมาตรฐานกรดแกลลิกสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในใบมะกอกโอลีฟ



ภาพผนวกที่ ค2 กราฟมาตรฐานคาเทคินสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในใบมะกอกโอลีฟ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพผนวกที่ ค3 กราฟมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกสำหรับการวิเคราะห์สมบัติต้านออกซิเดชัน DPPH ในใบมะกอกโอลีฟ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ง

การคำนวณค่า Recovery rate ของวิธีการสกัดตัวอย่าง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การคำนวณค่า Recovery rate ของวิธีการสกัดตัวอย่าง

สูตรที่ใช้ในการคำนวณค่า Recovery rate

$$\text{Recovery rate (\%)} = (A_{SE}/A_S) \times 100$$

โดยที่ A_S คือ พื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐานนารินจินที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน

A_{SE} คือ พื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐานนารินจินที่ได้จริงหลังผ่านการสกัด

ตัวอย่างการคำนวณค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานนารินจินในสารสกัด

การคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานนารินจิน เพื่อใช้ในการคำนวณหาค่า Recovery rate ของวิธีการสกัดตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์นารินจิน สามารถคำนวณดังนี้

เนื่องจากในการหาค่า Recovery rate ของวิธีการสกัดตัวอย่าง ต้องทำการเติมสารละลายมาตรฐานนารินจินความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตรลงในสารสกัดก่อนผ่านการสกัดตัวอย่าง

ดังนั้น ปริมาณสารมาตรฐานนารินจินในสารสกัด = 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร x 5 มิลลิลิตร

= 5000 ไมโครกรัม

ปริมาตรสุดท้ายของสารสกัดที่ได้หลังผ่านการสกัดตัวอย่างเท่ากับ 25 มิลลิลิตร

ทำให้ ความเข้มข้นสุดท้ายของสารมาตรฐานนารินจิน = 5000 ไมโครกรัม/25 มิลลิลิตร

= 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ดังนั้น ความเข้มข้นสุดท้ายของสารมาตรฐานเมลาโทนินหลังผ่านการสกัดตัวอย่าง เมื่อค่ามีค่าความเข้มข้นสุดท้ายของสารมาตรฐานนารินจินเท่ากับ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตัวอย่างการคำนวณค่า Recovery rate ของวิธีการสกัดตัวอย่าง

สูตรการคำนวณ

$$\text{Recovery rate (\%)} = (A_{SE}/A_S) \times 100$$

ค่า A_S เท่ากับ 6660385 AU*s

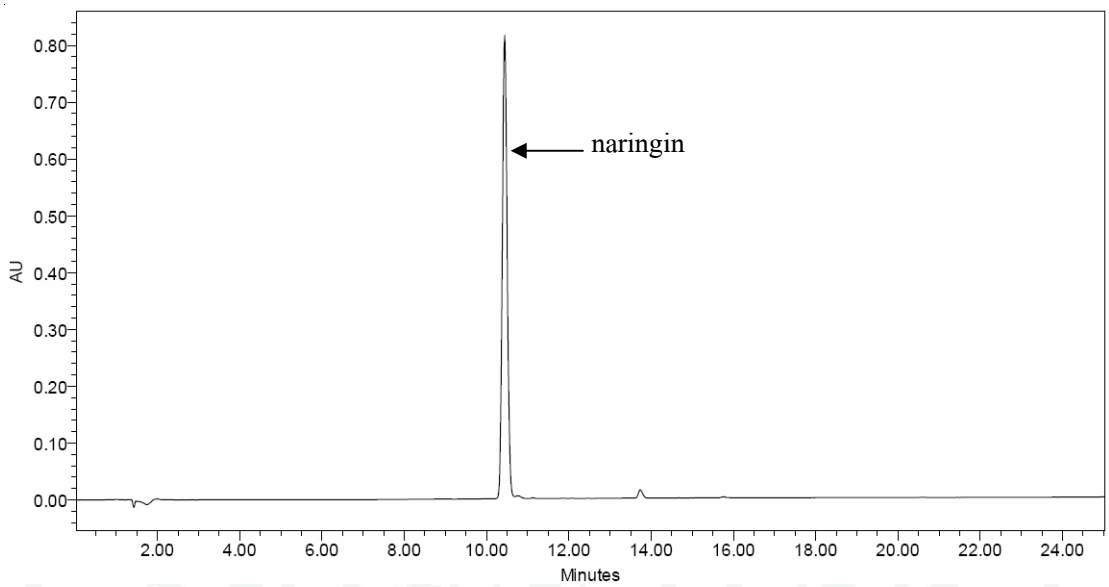
ค่า A_{SE} เท่ากับ 6608747 AU*s

แทนค่าต่างๆ ในสูตรการคำนวณค่า Recovery rate ได้ดังนี้

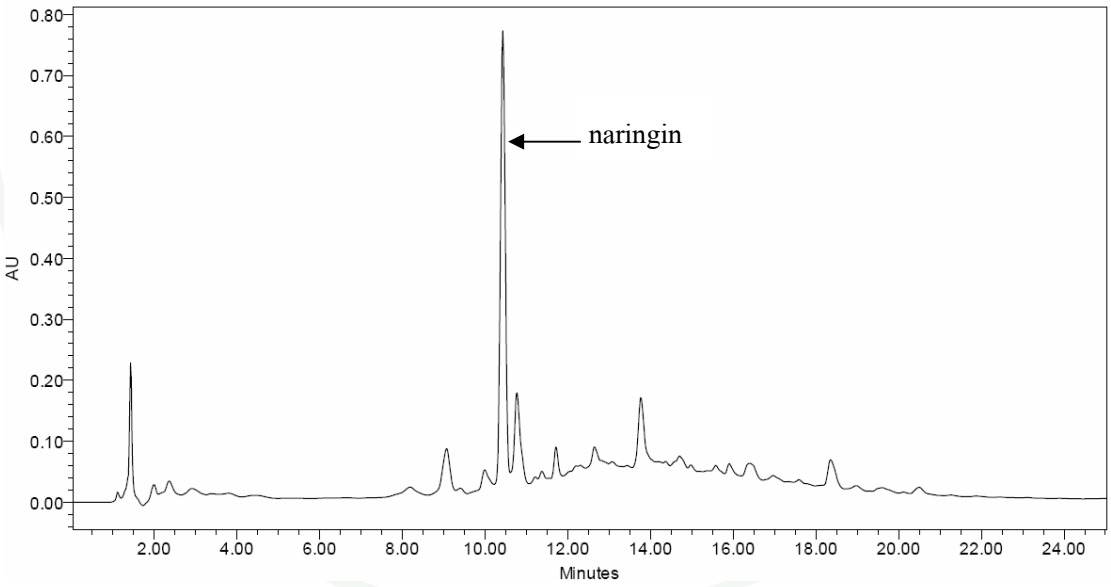
$$\text{Recovery rate} = (6608747/6660385) \times 100 = 99.2\%$$

ดังนั้น ค่า Recovery rate ของวิธีการสกัดตัวอย่างมีค่าเท่ากับ 99.2%

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพผนวกที่ ง1 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน naringin ที่ไม่ผ่านวิธีการสกัดตัวอย่าง



ภาพผนวกที่ ง2 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน naringin หลังผ่านวิธีการสกัดตัวอย่าง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก จ

ตัวอย่างใบมะกอกโอลีฟ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพผนวกที่ จ1 ยอดและใบมะกอกโอลีฟสายพันธุ์ Hojiblanca

ภาพผนวกที่ จ2 ยอดและใบมะกอกโอลีฟสายพันธุ์ Arbequina

ภาพผนวกที่ จ3 ยอดและใบมะกอกโอลีฟสายพันธุ์ Manzanillo

ภาพผนวกที่ จ4 ยอดและใบมะกอกโอลีฟสายพันธุ์ Picual

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ฉ

ภาพแสดงกระบวนการผลิตชาใบมะกอกโอลีฟ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพผนวกที่ ฉ1 ใบมะกอกโอลีฟสายพันธุ์ Hojiblanca สำหรับผลิตชาใบมะกอกโอลีฟ

ภาพผนวกที่ ฉ2 การล้าง คัดแยก และผึ่งให้แห้ง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

(ก) (ข)

ภาพผนวกที่ ฉ3 การลวกใบมะกอกโอลีฟ (ก) และแช่ใบมะกอกโอลีฟในน้ำเย็นทันทีหลังการลวก (ข) สำหรับการผลิตชาเขียวใบมะกอกโอลีฟ

ภาพผนวกที่ ฉ4 การคั่วนวดใบมะกอกโอลีฟในกระทะด้วยไฟอ่อนสำหรับการผลิตชาเขียวใบมะกอกโอลีฟ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพผนวกที่ ฉ5 การคั่วนวดใบมะกอกโอลีฟในกระทะด้วยไฟอ่อนสำหรับการผลิตชาดำใบมะกอกโอลีฟ

ภาพผนวกที่ ฉ6 การหมักใบมะกอกโอลีฟที่ควบคุมอุณหภูมิและระยะเวลา สำหรับการผลิตชาดำใบมะกอกโอลีฟ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพผนวกที่ ฉ7 การอบใบมะกอกโอลีฟที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง สำหรับการผลิตชาเขียวใบมะกอกโอลีฟและชาดำใบมะกอกโอลีฟ

(ก) (ข)

ภาพผนวกที่ ฉ8 ผลิตภัณฑ์ชาเขียวใบมะกอกโอลีฟ (ก) และชาดำใบมะกอกโอลีฟ (ข)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวนันทิชา สายสุทธิ์
วัน เดือน ปี ที่เกิด	2 กุมภาพันธ์ 2529
สถานที่เกิด	เขตบางกอกน้อย จังหวัดกรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
ผลงานวิจัย	งานวิจัยเรื่องผลของสายพันธุ์และตัวทำละลายต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และความสามารถต้านออกซิเดชันในใบมะกอกโอลีฟ (*Olea europaea* L.) นำเสนอผลงานทางวิชาการภาคโปสเตอร์ ในการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 49 (พ.ศ. 2554)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์