การวิเคราะห์ปริมาณของแคทเทชินในน้ำมันเมล็ดชา จากต้นคาเมลเลียโอเลเฟรา เอเบล

จิรดา สิงขรรัตน์[1,*] และ นุชนาฏ เสือเล็ก[2]

บทคัดย่อ

การใช้เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) เป็นเทคนิคที่ง่าย เชื่อถือได้ และทำซ้ำได้ ซึ่งในการวิจัยนี้ ได้นำมาพัฒนาเพื่อศึกษาการตรวจสอบความถูกต้องของการหาปริมาณแคทเทชินในสารสกัดน้ำมันเมล็ดชาจากต้นคาเมลเลียโอเลเฟรา เอเบล การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมโดยใช้คอลัมน์ชนิด ACE (C_{18} ขนาด 150 × 4.6 มม.) ด้วยเมทานอลในน้ำที่มีกรดอะซิติก 2 % มีสัดส่วนโดยปริมาตร 11 ต่อ 89 เป็นตัวทำละลายเคลื่อนที่ ใช้อัตราการไหลที่ 1 มิลลิลิตรต่อนาที ในระบบ แบบเดี่ยว (isocratic system) และวัดความยาวคลื่นที่ 280 nm แล้วพบว่าความถูกต้องของการใช้แคทเทชินเป็นสารมาตรฐานแสดงด้วย ความเป็นเส้นตรงของวิธีการนี้ (R^2 = 0.999) ความแม่นยำของวิธีการ (RSD <4%) สำหรับความเข้มข้นช่วง 20-100 ppm โดยมีกรดกัลลิกเป็นสารมาตรฐานเทียบภายใน การวิเคราะห์ขีดจำกัดต่ำสุดของการทดสอบเชิงคุณภาพ คือ 1.061 ppm และความเข้มข้นต่ำสุดที่วิธีวิเคราะห์สามารถวิเคราะห์เชิงปริมาณได้คือ 3.54 ppm วิธีการนี้สามารถใช้ตรวจวิเคราะห์หาแคทเทชินที่สกัดจากน้ำมันเมล็ดชาที่ขายทั่วไปด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิดอย่างต่อเนื่อง โดยงานวิจัยนี้พบว่า ความเข้มข้นเฉลี่ยของน้ำมันเมล็ดชาตัวอย่างที่ขายตามท้องตลาดที่สกัดแล้วอยู่ที่ 4.27 ± 0.0908 ppm (n=3) ผลงานวิจัยนี้สามารถใช้ในการควบคุมคุณภาพและเป็นประโยชน์อ้างอิงสำหรับการใช้พัฒนาเป็นอาหารเสริมและอุตสาหกรรมการทางยาต่อไป

คำสำคัญ : แคทเทชิน, พอลิฟีนอล, น้ำมันเมล็ดชา, เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง, คาเมลเลียโอเลเฟรา เอเบล

[1] ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี 12120

[2] คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี 12120

[*] ผู้ติดต่อ, อีเมล์: jirada@tu.ac.th รับเมื่อ 28 กุมภพันธ์ 2555 ตอบรับเมื่อ 6 สิงหาคม 2555

Quantification of Catechin in Tea Seed Oil from *Camellia oleifera* Abel.

Jirada Singkhonrat [1*] and Nuchanart Suealek [2]

Abstract

A high performance liquid chromatographic (HPLC) method was developed and validated for quantitative determination of polyphenols (catechin) in extracts of *Camellia oleifera* Abel. The analysis was carried out on ACE-HPLC Column (C_{18} with 150 × 4.6 mm) using methanol-water containing 2%acetic acid (11:89 v/v) as mobile phase under isocratic system. The flow rate was 1.0 mL/min and the detection was at 280 nm. The validation using catechin as standard demonstrated that the method presented linearity (linear correlation coefficient = 0.999), precision (relative standard deviation <4%) in the concentration range 20-100 ppm with gallic acid as internal standard. The limit of detection (LOD) was 1.061 ppm and the limit of quantification was 3.54 ppm. This method allowed the identification of catechin in the ethyl acetate extracts obtained from the commercial tea oil. The average concentrations of **(+)-**Catechin in the commercial tea seed oil was 4.27 ± 0.0908 ppm (*n*=3). Results obtained in this study will serve as quality control and useful reference for supplement development and pharmaceutical industry.

Keywords : : **(+)-**Catechin, Polyphenols, Camellia oil, HPLC, *Camellia oleifera* Abel

[1] Department of Chemistry, Faculty of Science and technology, Thammasat University.

[2] Faculty of Medicine, Thammasat University.

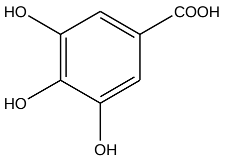
[*] Corresponding author, E-mail: jirada@tu.ac.th Received 28 February 2012, Accepted 6 August 2012

1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

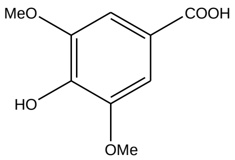
สารต้านออกซิเดชันหรือสารต้านอนุมูลอิสระ เป็นสารที่ทำหน้าที่ป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระ หรือต้านฤทธิ์ของอนุมูลอิสระ จึงช่วยป้องกันและลดความเสียหายที่เกิดจากอนุมูลอิสระได้ โดยเฉพาะในร่างกาย สารต้านอนุมูลอิสระช่วยลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคที่มีความสัมพันธ์กับอนุมูลอิสระได้[1] สารต้านออกซิเดชัน มักพบในผัก ผลไม้ชนิดต่างๆ ได้แก่ วิตามินซี (vitamin C) ที่พบใน ฝรั่ง ส้ม และมะขามป้อม หรือ วิตามินอี (vitamin E) ที่พบในน้ำมันพืชชนิดต่างๆ เป็นต้น โดยวิตามินซีและวิตามินอี มีบทบาทเป็นสารต้านออกซิเดชันที่มีประสิทธิภาพ ช่วยลดการเกิดการอุดตันของหลอดเลือดแดงและหลอดเลือดแดงแข็ง (atherosclerosis) ซึ่งเป็นโรคหัวใจร่วมหลอดเลือด ที่มีมูลเหตุจากอนุมูลอิสระที่พบบ่อย [2] นอกจากนี้ ยังมีสารอีกหลายชนิดที่ไม่ใช่วิตามิน ที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (antioxidant activity) ได้แก่ สารพอลิฟีนอล (polyphenols) เป็นต้น จากการสืบค้นพบว่าในชาโดยเฉพาะชาเขียว มีปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกอยู่มาก โดยเฉพาะแคทเทชิน ซึ่งมีรายงานว่าแคทเทชินของชาเขียวมีผลการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพสูงกว่า วิตามินซีและวิตามินอีหลายเท่า รวมถึงการใช้แคทเทชินของชาเขียวโรคพาร์คินสัน (Parkinson's disease) โรคมะเร็ง (cancer) และโรคหัวใจร่วมหลอดเลือด (cardiovascular disease) เป็นต้น [3]

ในปี 2551 สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี มีพระราชดำริให้สำนักงานมูลนิธิชัยพัฒนา ดำเนินการศึกษาและทดลองปลูกชาน้ำมันจากประเทศจีน พร้อมทั้งจัดตั้งศูนย์วิจัยและพัฒนาชาน้ำมันและพืชน้ำมัน เพื่อเป็นโรงงานผลิตน้ำมันจากเมล็ดชาและพืชน้ำมัน ที่สามารถผลิตน้ำมันคุณภาพสูงสำหรับการบริโภคและทำผลิตภัณฑ์ต่อเนื่อง อื่นๆ เช่น เครื่องสำอางค์ เป็นต้น งานวิจัยนี้จึงสนใจ ศึกษาวิจัยประโยชน์อื่นๆ ของต้นชาน้ำมัน เพื่อเพิ่มมูลค่าผลิตภัณฑ์ ไม่นานมานี้ มีเอกสารในประเทศหลายฉบับ กล่าวอ้างถึงสารพอลิฟีนอลในน้ำมันที่สกัดจากเมล็ดชาหรือที่เรียกกันแพร่หลายว่า “น้ำมันเมล็ดชา” หรือ “น้ำมันชา” ถึงฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชัน และยังกล่าวถึงสรรพคุณของน้ำมันเมล็ดชาว่า มีคุณสมบัติที่ดีใกล้เคียงกับน้ำมันมะกอก น้ำมันเมล็ดชา ได้มาจากเมล็ดของต้นชาน้ำมัน (*Camellia oleifera* Abel.) ซึ่งอยู่ในวงศ์ Theaceae มีชื่อเรียกต่างๆ กัน อาทิ เมี่ยงอีอาม (Miang i am) บริเวณภาคเหนือ, เมี่ยงดอง (Miang dong) ที่ จ. เชียงใหม่, เหมือดหมี (Mueat mi) ที่ จ. เลย นอกจากนี้ ยังมีชื่อเรียกอื่นๆ อาทิ คันโคกต้น (Khan khok ton) เมี่ยงหลวง (Miang luang) เมี่ยงอาม (Miang am) และ เหมือดเม็ก (Mueat mek) เป็นต้น [4a] สำหรับการรายงานผลทางเคมีจากต้นชาน้ำมัน (*Camellia oleifera* Abel.) พบสารสำคัญที่ถูกรายงานได้แก่ เซซามินและอนุพันธ์ (sesamin and derivative) [4b] จากน้ำมันเมล็ดชา, อนุพันธ์ของคาแอมป์เฟอรัล (kaempferol derivatives)[4c] จากสารสกัดของเมล็ดชาและอนุพันธ์ของฟีนิลอีแทน (phenylethane derivatives) [4d] จากสารสกัดของใบชา ทั้งยังพบซาโปนิน (camelliasaponin, theasaponin E1 และ theasaponin E2)ในกากเมล็ดชาอีกด้วย (defatted seed meal) [4e] ยังไม่มีรายงานสารพอลิฟีนอล ซึ่งพบมากในน้ำมันเมล็ดชาชนิดอื่นๆ[4f] จึงเป็นที่มาของงานวิจัยในครั้งนี้ ที่ต้องการวิเคราะห์หาสารที่ออกฤทธิ์สำคัญในน้ำมันเพื่อการบริโภคที่หาได้ง่าย ราคาถูกสำหรับผู้คนในพื้นที่เอเชีย

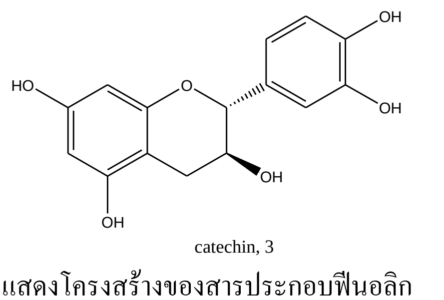
สารสำคัญที่มีรายงานการออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิก (รูปที่ 1) เป็นกลุ่มเคมีอินทรีย์ซึ่งประกอบด้วยหมู่ฟังก์ชันไฮดรอกซิล (hydroxyl group) ต่ออยู่กับวงอะโรมาติก (aromatic ring) โดยสารประกอบฟีนอลิก แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ กรดฟีนอลิก และพอลีฟีนอล



gallic acid, 1



syringic acid, 2



catechin, 3

รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิก

1.1 กรดฟีนอลิก

กรดฟีนอลิก เป็นสารที่มีวงแหวนฟีนอล (phenol ring) อยู่กับโครงสร้างของหมู่ฟังก์ชันคาร์บอกซีลิก (carboxylic group) พบได้ในมังคุด ผลบลูเบอร์รี่ คะน้า เป็นต้น[5] ซึ่งสามารถแบ่งตามลักษณะโครงสร้างได้ 3 กลุ่ม คือ อนุพันธ์ของกรดไฮดรอกซี่เบนโซอิก (hydroxybenzoic acid derivatives, HBA) และอนุพันธ์ของกรดไฮดรอกซี่ซินนามิก (hydroxycinnamic acid derivatives, HCA) และกรดฟีนอลิกชนิดอื่น ซึ่งสารทั้ง 3 กลุ่มนี้ สามารถอยู่ในรูปแบบ 2 ชนิด คือ กรดฟีนอลิกอิสระ และอนุพันธ์ของกรดฟีนอลิก ซึ่งอนุพันธ์ของกรดฟีนอลิก แบ่งตามการเกิดพันธะระหว่างกรดฟีนอลิกกับสารชนิดนั้นๆ คือ ถ้าโมเลกุลของน้ำตาล เข้ามาสร้างพันธะ เรียกโมเลกุลชนิดนี้ว่า ไกลโคไซด์ (glycoside) โดยใช้พันธะไกลโคซิดิก (glycosidic bond) ในการเชื่อม แต่ถ้าเป็นโมเลกุลของแอลกอออล์ที่เข้ามาสร้างพันธะ เรียกโมเลกุลชนิดนี้ว่า เอสเตอร์ (ester) กรดฟีนอลิกอิสระ และอนุพันธ์ของกรดฟีนอลิกนั้น สามารถสกัดแยกได้จากขั้นตอนการสกัดที่แตกต่างกัน ซึ่งการสกัดนี้อาศัยคุณสมบัติความแตกต่างของโมเลกุล เพื่อแยกและวิเคราะห์หาโครงสร้างของโมเลกุลต่อไป

การศึกษาองค์ประกอบของสารสำคัญของสารสกัดจากพืชต่างๆ นิยมใช้สารประกอบกรดฟีนอลิก เป็นสารมาตรฐานเทียบภายใน (internal standard) เพื่อประยุกต์ใช้กับเทคนิค HPLC โดยทั่วไปสามารถเลือกใช้สารมาตรฐาน เช่น *p*-hydroxy-phenylacetic acid, ursolic acid, vanillin, *p*-hydroxy-phenyl-propanoic acid, *p*-coumaric acid, 3,4-dihydroxy-phenyl-acetic acid, o-coumaric acid, gallic acid ***1***, syringic acid ***2***, sinapic acid, vanillic acid เป็นต้น ซึ่งทั้งหมดจัดเป็นสารอยู่ในกลุ่มของ hydroxybenzoic acid derivatives (HBA) และ gallic acid ***1*** จัดเป็นสารได้รับความนิยมในการใช้เป็นสารมาตรฐานเทียบภายใน จึงถูกใช้ในงานวิจัยในครั้งนี้

1.2 พอลีฟีนอล

สารพอลีฟีนอล เป็นสารที่มีวงแหวนฟีนอล อยู่ในโครงสร้างโมเลกุลมากกว่าหนึ่งวงแหวนฟีนอลสารพอลีฟีนอลพบได้ในพืชหลายชนิด อาทิ ผลบลูเบอร์รี่ และน้ำมันมะกอก เป็นต้น[6] มีรายงานพบว่าสารพอลีฟีนอลในผลเบอร์รี่ มีฤทธิ์ลดการเกิด reactive oxygen species ในเม็ดเลือดแดงของหนูขาว [7a] นอกจากนี้ สารพอลีฟีนอลในน้ำมันมะกอก ที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ได้แก่ oleuropein และ hydroxytyrosol[7,8] ซึ่งสารทั้งสองชนิดนี้ มีฤทธิ์ลดการเกิดหลอดเลือดแดงแข็งได้ อย่างไรก็ตาม ในประเทศไทยน้ำมันมะกอกเป็นน้ำมันที่มีราคาแพง เนื่องจากต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ขณะที่เมล็ดชาได้ถูกรณรงค์การเพาะปลูกโดยมูลนิธิไทยพัฒน์ ตั้งแต่ปี 2547 เป็นต้นมา การให้ข้อมูลเชิงวิชาการเพื่อการบริโภคมีความสำคัญ อีกทั้งน้ำมันเมล็ดชามีข้อดีที่เหนือกว่าคือ ราคาถูกกว่าน้ำมันมะกอก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาแนวโน้มการพบสารกลุ่มพอลีฟีนอลโดยเฉพาะแคททาซิน (Catechin, ***3***) ในน้ำมันเมล็ดชา และใช้น้ำมันมะกอกเป็นตัวเทียบ โดยใช้วิธีการสกัดด้วยตัวทำละลาย (solvent extraction หรือ liquid-liquid extraction) รวมไปถึงการวิเคราะห์และหาปริมาณสารพอลิฟีนอลด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography, HPLC) โดยมีสารมาตรฐานคือ กรดกัลลิก (internal standard) และแคทเทชิน (external standard)

2. อุปกรณ์และวิธีการทดสอบ

2.1 อุปกรณ์

เครื่องมือ HPLC ที่ใช้เป็นเครื่อง shimadzu รุ่น 20AT มี UV-VIS Detector ใช้คอลัมน์เป็น ACE C18–AR (ขนาด 150 mm x 4.6 mm i.d. 5 μm) และวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม Microsoft Excel.

2.2 สารเคมีและตัวทำละลาย

ตัวทำละลายที่ใช้เป็นเกรดของ HPLC จาก Merck Co. Ltd. (Thailand) สารเคมีอื่นๆที่ใช้เป็นเกรดในห้องปฏิบัติการ (laboratory grade) จาก Carlo และ Fluka สารละลายในน้ำทั้งหมดใช้น้ำกลั่นผ่านระบบที่ปราศจากไอออน (deionized water) สารทุกชนิดที่ต้องใช้กับเครื่อง HPLC ต้องกรองผ่านเมมเบรน กรองชนิดไนลอนขนาด 0.45 μm (Nylon membrane filter, Millipore)

2.3 การเตรียมตัวอย่าง

นำน้ำมันเมล็ดชา (tea seed oil) และน้ำมันมะกอก (olive oil – ชนิด Extra vergin) ที่มีจำหน่ายจากห้างสรรพสินค้า มาสกัดด้วยตัวทำละลาย (solvent extraction หรือ liquid-liquid extraction) 3 ชนิดอย่างต่อเนื่อง โดยใช้เมทานอล (methanol) ปิโตรเลียมอีเทอร์ (petroleum ether) และเอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) ตามลำดับ[9] แล้วได้สารสกัดหยาบ 50$\pm$ 9.52 มิลลิกรัมต่อน้ำมันเมล็ดชาหนึ่งลิตรออกมา การทดลองเตรียมสารตัวอย่างสารสกัดของน้ำมันทั้งสองด้วยความเข้มข้น 50,000 ppm กรองผ่านเมมเบรน กรองชนิดไนลอนขนาด 0.45 μm แล้ว ฉีดเข้าเครื่อง HPLC

2.4 การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับ HPLC

การหาสภาวะของตัวทำละลายแบบเคลื่อนที่ (mobile phase) สำหรับการวิเคราะห์แบบเดี่ยว (isocratic mode) ที่เหมาะสม สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณ catechin ในน้ำมันเมล็ดชาด้วยเทคนิค HPLC โดยอาศัยการปรับเปลี่ยนความมีขั้วของตัวทำละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) เป็นเมทานอลกับ 2% ของสารละลายอะซิติก และอัตราการไหลที่ 0.7 และ 1 mL/min โดยใช้ปริมาตรการฉีดสาร (Inject volume) ที่ 20 μL และเป็นระบบแบบเดี่ยวในการนำตัวทำละลายเคลื่อนที่เข้าระบบ (isocratic system) สารมาตรฐานที่ใช้ได้แก่ gallic acid (internal standard) และแคทเทชิน (external standard) เวลาที่ใช้ทดลอง 20 นาทีต่อตัวอย่างที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร[9]

2.4.1 การหาสัดส่วนที่เหมาะสมของตัวทำละลายเคลื่อนที่

การเตรียมตัวทำละลายเคลื่อนที่ เพื่อใช้หา สภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ในครั้งนี้ อาศัยสารมาตรฐานแคทเทชินที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยการเปลี่ยนสัดส่วนของเมทานอลกับสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 2 เปอร์เซนต์ โดยเลือกความเข้มข้นของตัวทำละลายจากความมีขั้วน้อยไปหามาก (ร้อยละ 60 จนถึง ร้อยละ 8 ของเมทานอล)

2.4.2 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค HPLC

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน 2 ชนิด คือ gallic acid มีความเข้มข้น 40 ppm และ catechin ให้มีความเข้มข้น 20 40 60 80 และ 100 ppm ตามลำดับ เพื่อใช้สร้างกราฟมาตรฐาน

2.5.ตรวจสอบความถูกต้องและความแม่นยำของวิธีการ

สร้างกราฟมาตรฐานเพื่อหาค่าความเป็นเส้นตรง คำนวณความแม่นยำ

Linearity หมายถึง ความสามารถของวิธีการวิเคราะห์ที่จะทำให้วิเคราะห์แล้วได้ผลการวิเคราะห์ที่เป็นสัดสวนกับความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ในชวงความเขมข้นที่กำหนด ส่วน range หมายถึง ช่วงความเข้มข้นของสารที่จะวัดตั้งแต่ความเข้มข้นต่ำสุดถึงความเข้มข้นสูงสุดที่วัดแล้วมี accuracy precision และ linearity อยู่ในระดับที่มีความถูกต้องยอมรับได้ตามข้อกำหนด

คำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) เกณฑ์การยอมรับได้โดยทั่วไปค่า r จะต้องมีค่าอยู่ระหว่าง 0.995 – 1.000

คำนวณค่า Limit of detection (LOD) และ คำนวณค่า Limit of quantification (LOQ) ซึ่งคำนวณได้จาก LOD = $3\sigma/S$ และ LOQ = $10\sigma/S$ โดย σ คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของสารที่สนใจ และ S คือ ค่าความชันของเส้นมาตรฐาน

LOD (limit of detection) หมายถึงคาความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ในตัวอยางที่สามารถตรวจวัดได้ และ LOQ (limit of quantification) หมายถึง ค่าความข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ในตัวอย่างที่สามารถหาปริมาณ หรือรายงานผลโดยมี accuracy และ precision ที่ยอมรับได้

คำนวณหาค่า repeatability หมายถึง ความแม่นยำที่เกิดจากการวิเคราะหซ้ำในสภาวะเดียวกันโดยใชวิธีเดียวกัน ใน ห้องปฏิบัติการเดียวกัน เครื่องมือชุดเดียวกันและผู้วิเคราะห์คนเดียวกัน คำนวณหาระดับความแม่นยำโดยหาค่า %RSD (relative standard deviation = (SD/mean) x 100)

3. ผลการทดลองและการวิจารณ์ผล

3.1. ผลการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับ HPLC

ตัวแปรที่ใช้คือสภาวะความมีขั้วที่เพิ่มขึ้นของตัวทำละลายเคลื่อนที่ ถึงแม้จะมีข้อจำกัดของเครื่องด้วยระบบ isocratic นั้น พบว่าสารสามารถแสดงผลได้ในเวลาที่สั้น ผู้วิจัยได้ศึกษาโดยคงค่าอัตราเร็วของตัวละลายทำเคลื่อนที่ 1

มิลลิลิตรต่อนาที แต่เปลี่ยนสัดส่วนของเมทานอลกับน้ำที่มี 2 % ของกรดอะซิติกต่างๆ เริ่มที่ร้อยละ 60 ของเมทานอล พบว่าแคทเทชิน แสดงที่เวลา 2 นาที จัดว่าเร็วไป อีกทั้งเป็นบริเวณที่สารต่างๆที่มีขั้วสูงจะแสดง ผู้วิจัยจึงเพิ่มความมีขั้วขึ้น พบว่าเมื่อมีปริมาณของเมทานอลลดลง เป็นร้อยละ 30 ของเมทานอล พบว่า แคทเทชินแสดงเป็นโครมาโทแกรมด้วยพีคให้เห็นได้ชัด โดยปรากฏที่เวลามากกว่า 2.5 นาที ขณะที่เมื่อเพิ่มขั้วของตัวทำละลายเคลื่อนที่เป็นร้อยละ 15 ของเมทานอล แคทเทชินปรากฏเป็นพีคให้เห็นได้ในช่วงที่กว้าง 5.0-9.8 นาที และเมื่อเพิ่มความมีขั้วเป็นร้อยละ 10 ของเมทานอล แคทเทชินแสดงเป็นพีคให้เห็นได้ในช่วงที่กว้างขึ้นเป็น 7.0-14.5 นาที ซึ่งพบว่าช่วงกว้างกว่าเดิม และหากเพิ่มความมีขั้วของตัวทำละลายเคลื่อนที่เป็นร้อยละ 8 ของเมทานอล แคทเทชินแสดงเป็นพีคให้เห็นได้ในช่วงที่กว้างขึ้นเป็น 7.0-16.0 นาที ด้วยสัดส่วนที่ยังแสดงช่วงที่กว้าง เราจึงสนใจพีคที่ชัดเจนของแคทเทชิน ณ ระยะเวลาเคลื่อนผ่าน (retention time, T_r) เท่ากับ 12.5 นาที และได้ทดลองด้วยร้อยละ 11 ของเมทานอล พบแคทเทชินปรากฏเป็นพีคให้เห็นด้วย peak width ในช่วงระยะเวลาเคลื่อนผ่านที่เราสนใจ อยู่ในช่วงที่แคบที่สุดคือ 12.5-13.0 นาที เท่านั้น

อย่างไรก็ตามเมื่อทดสอบการเปลี่ยนแปลงของค่าอัตราเร็วของระยะเวลาเคลื่อนผ่านที่ มิลลิลิตรต่อนาที เป็นค่าอัตราเร็วที่ 0.7 มิลลิลิตรต่อนาที สำหรับระยะเวลาเคลื่อนผ่านด้วยร้อยละ 10 ของเมทานอล พบว่าความกว้างของช่วงเพิ่มขึ้นเป็น 11-20 นาที ผู้วิจัยจึงคงค่า อัตราเร็วที่ 1 มิลลิลิตรต่อนาที พร้อมทดสอบความเข้มข้นของตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน (spike) ด้วยกรดกัลลิก (gallic acid) 40 ppm แสดงพีคที่ค่า retention time 2.5-3.5 นาที

3.2 กราฟมาตรฐานของสารละลายแคทเทชิน

จากการทดลองพบว่าสภาวะที่เหมาะสม จะเห็นได้ว่าสัดส่วนของตัวทำละลายเคลื่อนที่ ของสารละลายเมทานอล (CH_3OH) 11 % ใน 2% acetic acid มีความเหมาะสมที่สุดในการสร้างเป็นกราฟมาตรฐาน โดยรายงานด้วยระดับความเข้มข้นที่ใช้คือ 20 -100 ppm มีค่าความชันที่ 157500 ค่าตัดที่ -570539 ด้วยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ (correlation coefficient) เท่ากับ 0.999 (Y = 157500X – 570539 ; R^2 = 0.999) ที่แต่ละความเข้มข้น พบว่า ค่าความแม่นยำสำหรับการทดลองซ้ำอยู่ที่ ช่วง 0.33-3.25% ซึ่งพบว่าเป็นค่าที่น่าพอใจยิ่งสำหรับการหาค่าสารสำคัญในพืช ที่ควรมีค่า R.S.D. ต่ำกว่า 6%[10]

ตารางที่ 1: การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์สารแคททาชินด้วยการเปลี่ยนสัดส่วนของ %เมทานอลกับ 2 % ของกรดอะซิติกในน้ำ

ลำดับ	สัดส่วนของ %CH_3OH: 2 % ของกรดอะซิติก	การวิเคราะห์ปริมาณสารมาตรฐาน catechin (ppm) ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	T_r (min.)
1.	60:40	10000	1000	-	2
2.	30:70	10000	1000	100	2.5
3.	15:85	100	60	20	5-9.8
4.	11:89	100	80	20	12.5-13
5.	10:90	100	40	20	7-14.5
6.	10:90*	100	-	-	11-20
7.	8:92	100	60	-	7-16.5

<u>หมายเหตุ</u> ทุกตัวอย่างใช้ อัตราการไหลสารละลายที่1 mL/min ยกเว้น *อัตราการไหลสารละลายที่ใช้ เท่ากับ 0.7 mL/min

ค่า LOD เท่ากับ 1.061 ppm นั้นคือความเข้มข้นต่ำที่สุดในสารตัวอย่างที่สามารถวิเคราะห์ได้ และ ค่า LOQ เท่ากับ 3.54 ppm นั้นคือความเข้มข้นต่ำที่สุดในสารตัวอย่างที่สามารถยอมรับการวิเคราะห์ด้วยวิธีการที่เลือกใช้ในการทดลองครั้งนี้ ซึ่งถือว่ายอมรับและเชื่อถือได้ว่าดี เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยใกล้เคียงกันที่ผ่านมาดังเช่นในปี 2548 มีการรายงานผลการวิเคราะห์หาแคททาชินในผลไม้รวม 15 ชนิด ในประเทศบูลกาเรีย ด้วยเทคนิค HPLC ที่อาศัยตัววัดเป็นฟลูออเรเซนซ์ที่ความยาวคลื่น (fluorescence detection) 280 นาโนเมตรตัวทำละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) เป็น 9% ของอะซิโตไนไตรล์กับ 2% ของสารละลายอะซิติก และอัตราการไหลที่ 1 mL/min มีช่วงความเข้มข้นของการทดลองที่ 0.2 – 15 μg/mL และรายงานค่า LOD เท่ากับ 0.1 mg/kg ของผลสดและค่า LOQ เท่ากับ 0.3 mg/kg ของผลสด [10a]

ตารางที่ 2: ข้อมูลการสร้างกราฟมาตรฐาน

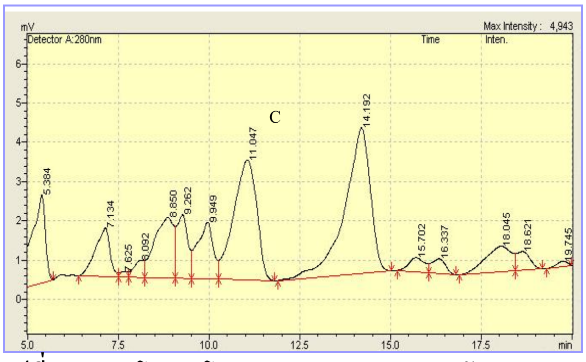
ลำดับ	ความเข้มข้นของ catechin standard (ppm)	การวิเคราะห์ปริมาณ catechin ด้วยเทคนิค HPLC (peak area)			ค่าเฉลี่ย	% RSD
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
1.	20	2638306	2654715	2664666	2652562	0.50
2.	40	5889719	5569768	5569768	5676418	3.25
3.	60	8759335	8505670	8831382	8698796	1.97
4.	80	12248562	12202774	12321561	12257632	0.49
5.	100	15054055	15141934	15139966	15111985	0.33

ปี 2549 มีการรายงานผลการวิเคราะห์หาแคททาชินในพืชรวม 5 ชนิด ในประเทศกรีซ ด้วยเทคนิค HPLC ที่อาศัยตัววัดเป็นยูวีที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรตัวทำละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) เป็น 65% ของอะซิโตไนไตรล์กับ 1-6% ของสารละลายอะซิติก แบบตัวทำละลายเคลื่อนที่ผสม (gradient mode) และอัตราการไหลที่ 0.5 mL/min มีช่วงความเข้มข้นของการทดลองที่ 0.5 – 25 mg/L และรายงานค่า LOD เท่ากับ 1.65 mg/L [10b]

ในปี 2554 มีการรายงานผลการวิเคราะห์หาแคททาชินในน้ำมะพร้าวสด ด้วยเทคนิค LCMS มีช่วงความเข้มข้นของการทดลองที่ 15.6 – 250 μg/mL โดยรายงานค่า LOD เท่ากับ 7.8 μg/mL และค่า LOQ เท่ากับ 15.6 μg/mL [10c]

3.3 ผลการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค HPLC fingerprint ของแคทเทชินในน้ำมันตัวอย่าง

การวิเคราะห์ด้วย HPLC ได้พัฒนาขึ้นเพื่อศึกษาปริมาณของแคทเทชินในน้ำมันมะกอกและน้ำมันเมล็ดชา โดยวิธีการที่ทำการทดลองนี้ ได้ให้ผลความใช้ได้ของวิธีการทดสอบที่น่าพอใจ ด้วยกราฟมาตรฐาน ที่มีค่าความเป็นเส้นตรงที่สูงถึง R^2 = 0.999 วิธีการวิเคราะห์ทั้งหมดสามารถใช้กับข้อกำหนดสำหรับการวิเคราะห์แคทเทชินในระดับอุตสาหกรรมการผลิตได้



รูปที่ 2: แสดงโครมาโตแกรม HPLC จากสารสกัดของ *Camellia oleifera* Abel ที่ 280 nm (พีคแสดง: C = Catechin)

จากการวิเคราะห์หาปริมาณแคทเทชินในตัวอย่างน้ำมันมะกอกและน้ำมันเมล็ดชา โดยสร้างกราฟมาตรฐานจากสารมาตรฐานแคทเทชินจะได้สมการ คือ

$$Y = 157500X - 570539$$

นำมาคำนวณหาปริมาณแคทเทชินของสารตัวอย่างน้ำมันเมล็ดชาและสารตัวอย่างน้ำมันมะกอกพบว่าสารตัวอย่างน้ำมันเมล็ดชา 105.30 ± 3.86 mg มีปริมาณของแคทเทชินเท่ากับ 0.0090 ± 0.0006 mg (n=3) และสารตัวอย่างน้ำมันมะกอก 103.81 ± 2.68 mg มีปริมาณของแคทเทชินเท่ากับ 0.01048 ± 0.0002 mg (n=3) หรือคิดเป็น สารตัวอย่างน้ำมันเมล็ดชา 1 กรัมจะมีปริมาณของแคทเทชินเท่ากับ 0.0855 ± 0.0018 mg (85.5± 1.82 μg/mg) และสาร

ตัวอย่างน้ำมันมะกอก 1 กรัมมีปริมาณของแคทเทชินเท่ากับ 0.1039 ± 0.0022 mg (103.9 ± 2.15 μg/mg)

สำหรับรายงานการศึกษาหาปริมาณแคททาชินในครั้งนี้ แสดงปริมาณมากกว่าที่เคยรายงานโดย Wang และคณะ [11] ถึงเกือบ 3 เท่า ทั้งนี้ ขึ้นกับตัวอย่างและแหล่งที่มาของเมล็ดชา การศึกษาผลงานวิจัยที่ผ่านมายังไม่พบการรายงานปริมาณของแคททาชินในน้ำมันมะกอก มีเพียงการรายงานปริมาณแคททาชินจากกากของมะกอก หลังจากการหีบแล้วเท่านั้น [12]

4. บทสรุปผลวิจัย

"น้ำมันเมล็ดชา" เป็นน้ำมันที่ได้รับสมญาว่าเป็น "น้ำมันมะกอกแห่งตะวันออก" แต่ยังไม่เป็นที่รู้จักและแพร่หลายมากนัก งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยแรกที่รายงานการพบสารแคทเทชินในน้ำมันเมล็ดชาจากต้นคาเมลเลียโอเลเฟราเอเบล นอกจากนี้ ยังแสดงปริมาณสารแคทเทชินในสารสกัดที่มีสัดส่วนใกล้เคียงกับในน้ำมันมะกอก ทั้งยังมีราคาถูกกว่า จึงสามารถให้คุณประโยชน์ที่จะช่วยลดความเสี่ยงในการเกิดโรคร้ายและช่วยเสริมสุขภาพ

เนื่องจากการทดลองในครั้งนี้เรามีข้อจำกัดของเครื่อง HPLC ด้วยการใช้ได้เฉพาะระบบการเคลื่อนที่ของตัวทำละลายแบบเดี่ยวหรือไอโซเครติก (Isocratic system) เท่านั้น อย่างไรก็ดี งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าสามารถวิเคราะห์แคทเทชินในระบบนี้ได้ โดยพบความเข้มข้นเฉลี่ยของน้ำมันมะกอกและน้ำมันเมล็ดชาตัวอย่างที่ขายตามท้องตลาดที่สกัดแล้ว อยู่ที่ 85.5 ± 1.816 และ 103.9 ± 2.152 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ ดังนั้น ความเข้มข้นเฉลี่ยของแคทเทชินในน้ำมันเมล็ดชาเท่ากับ 4.275 ± 0.0908 ppm (n=3) ผลงานวิจัยนี้ ได้รายงานผลการวิเคราะห์ปริมาณของแคททาชินในน้ำมันมะกอกและน้ำมันเมล็ดชาที่หาซื้อได้ตามแหล่งการค้าทั่วไป ทำให้ผู้บริโภคใช้เป็นทางเลือกในการรับประทานน้ำมันเพื่อการบริโภคได้อีกทางหนึ่ง อีกทั้งเทคนิคที่พัฒนาขึ้นนี้ สามารถใช้ในการควบคุมคุณภาพและเป็นประโยชน์อ้างอิงสำหรับการใช้พัฒนาเป็นอาหารเสริมและอุตสาหกรรมทางยาต่อไป

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัย จากกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ และขอขอบคุณ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ สำหรับเครื่องมือและอุปกรณ์ที่จำเป็นต่อการวิจัย และนางสาวจิตราพร อาจวิชัย ผู้ดำเนินการวิจัยและเก็บข้อมูลอย่างเต็มที่

6. เอกสารอ้างอิง

[1] Elejalde Guerra JI. Oxidative stress, diseases and antioxidant treatment. *An Med Interna.* 18(6), 2001, pp. 326-35.

[2] [2a] M.J Thomson, V. Puntmann and J.C. Kaski, Atherosclerosis and oxidant stress: the end of the road for antioxidant vitamin treatment? *Cardiovasc Drugs Ther*. 21(3), 2007, pp. 195-210.

[2b] Riccioni ,G. Bucciarelli, T. Mancini, B. Di Ilio, C. Capra, V. D'Orazio, N. The role of the antioxidant vitamin supplementation in the prevention of cardiovascular diseases. *Expert Opin Investig Drugs*. 16(1), 2007, pp. 25-32.

[3] N.T. Zaveri, Green tea and its polyphenolic catechins: medicinal uses in cancer and noncancer applications. *Life Sci*. 78(18), 2006, pp. 2073-80.

[4] [4a] T. Smithinuntn, Botanic names in Thailand. Edited Edition. Bangkok: Forest Education office, Botanic forest department. 2544. pp. 101

[4b] C.P Lee and G.Y. Yen, Antioxidant activity and bioactive compounds of tea seed (*Camellia oleifera* Abel.) oil. *J Agri and Food Chem.* 54, 2006, pp. 779-784.

[4c] L.C. Du,B.L. Wu and J.M Chen, Flavonoid triglycosides from the seeds of *Camellia oleifera* Abel. *Chinese Chem Lett*. 19, 2008, pp. 1315-1318.

[4d] Y. Chen, L. Tang, B. Feng,L. Shi, H. Wang and Y. Wang, New bibenzyl glycosides from leaves of *Camellia oleifera* Abel. with cytotoxic activities. *Fitoterapia*. 82, 2011, pp. 481-484.

[4e] C. Chaicharoenponga and A. Petsoma , Quantitative Thin Layer Chromatographic Analysis of the Saponins in Tea Seed Meal. *Phytochem. Anal.* 20, 2009, pp. 253–255.

[4f] F. Luo, X.Q. Fei,X.Z. Fang, Y.P. Wang and J.Y. Wang, Determination of phenols in Camellia oil by High-performance liquid chromatography with solid-phase extraction. *J. Instrumental Analysis.* 30(6), 2011, pp. 696-700.

[5] R.J.Robbins and S.R Bean, Development of a quantitative high-performance liquid chromatography-photodiode array detection measurement system for phenolic acids. *J Chromatogr A.* 1038(1-2), 2004, pp. 97-105.

[6] M. Naczk and F. Shahidi, Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis. *J Pharm Biomed Anal*. 41(5), 2006, pp. 1523-1542.

[7] [7a] K.A. Youdim, B. Shukitt-Hale, S. MacKinnon, W. Kalt and J.A Joseph, Polyphenolics enhance red blood cell resistance to oxidative stress: in vitro and in vivo. *Biochim Biophys Acta.* 1523(1), 2000, pp. 117-122.

[7b]C. Manna, P. Galletti, V. Cucciolla, O. Moltedo, A. Leone and V. Zappia, The protective effect of the olive oil polyphenol (3,4-dihydroxyphenyl)-ethanol counteracts reactive oxygen metabolite-induced cytotoxicity in Caco-2 cells. *J Nutr.* 127(2), 1997, pp. 286-292.

[7c] C. Manna, P. Galletti, V. Cucciolla, G. Montedoro and V. Zappi, Olive oil hydroxytyrosol protects human erythrocytes against oxidative damages. *J. Nutr Biochem.* 10(3), 1999, pp. 159-165.

[7d] S.C. Edgecombe, G.L. Stretch and P.J.Hayball, Oleuropein, an antioxidant polyphenol from olive oil, is poorly absorbed from isolated perfused rat intestine. *J. Nutr*. 130(12), 2000, pp. 2996-3002.

[9] K. Yagi, K. Goto and F. Nanjo, Identification of a major polyphenol and polyphenolic composition in leaves of Camellia irrawadiensis. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 57(11), 2009, pp. 1284-1288.

[10] [10a] S. Tsanova-Savova, F. Ribarova and M. Gerova, (+)-Catechin and (−)-epicatechin in Bulgarian fruits. J Food Compos Anal., 18 (7), 2005, pp 691-698.

[10b] C. Proestos, D. Sereli and M. Komaitis, Determination of phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC and GC-MS. *Food Chemistry,* 95(1), 2006, pp 44-52.

[10c] C.L. Chang and R.T. Wu Quantification of (+)-catechin and (−)-epicatechin in coconut water by LC–MS. *Food Chemistry*, 126 (2), 2011, pp 710-717.

[11] F. LUO, X.Q. FEI, X.Z. FANG,Y.P. WANG and J.Y. WANG, Determination of Phenols in Camellia Oil by High-performance Liquid Chromatography with Solid-phase Extraction. *Journal of Instrumental Analysis*, 6, 2011, pp 696-700.

[12] F. Visioli, F.F. Vincieri and C. Galli, Waste waters from olive oil production are rich in natural antioxidants. *Experientia*, 51, 1995, 32–34.