สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การตรวจวัดหาปริมาณสารคาเทชินในเครื่องดื่มชาเขียวสำเร็จรูปด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบเฟสย้อนกลับ

T107807

นางสาวดวงกมล สังข์เดช

นายวิวัฒน์ พงษ์พันธุ์จันทรา

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เลขหมู่ 107807
เลขทะเบียน
วัน,เดือน,ปี 14 พ.ค. 2553

b 12212234
i

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต

สาขาวิชาเคมีอุตสาหกรรม - เครื่องมือวิเคราะห์

ภาควิชาเคมี

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2549

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Determination of catechins in green tea beverage by reversed-phase high performance liquid chromatography

Miss Duangamon Sungdath

Mister Wiwat Pongpunjuntar

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement for the Degree of

Bachelor of Science

Department of Chemistry

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2006

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง การตรวจหาปริมาณสารคาเทชินในตัวอย่างชาเขียวสำเร็จรูปพร้อมดื่มโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบเฟสย้อนกลับ

นักศึกษา นางสาวดวงกมล สังข์เดช นักศึกษาชั้นปีที่ 4 รหัส 46050782

นายวิวัฒน์ พงษ์พันธุ์จันทรา นักศึกษาชั้นปีที่ 4 รหัส 46050794

ภาควิชา เคมี

สาขาวิชา เคมีอุตสาหกรรม-เครื่องมือวิเคราะห์

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.คณิตา ตังคณานุรักษ์

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผศ.นงนุช ศิวะภิญโญยศ

ภาควิชา เคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ		ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ	รศ.อรุณี คงศักดิ์ไพศาล	.....
กรรมการ	อ. สุจินต์ ตันติพิสิฐกุล	.....
กรรมการ	ผศ.คณิตา ตังคณานุรักษ์	.....

.....

(ผศ.ดร.ประยงค์ ดวงดี)

หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การตรวจหาปริมาณสารคาเทชินในตัวอย่างชาเขียวสำเร็จรูปพร้อมดื่มโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบเฟสย้อนกลับ

นักศึกษา 1. นางสาววงกมล สังข์เดช
2. นายวิวัฒน์ พงษ์พันธุ์จันทรา
ภาควิชา เคมี คณะวิทยาศาสตร์
สาขาวิชา เคมีอุตสาหกรรม-เครื่องมือวิเคราะห์
ปีการศึกษา 2549
อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.คณิตา ตังคณานุรักษ์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผศ.นงนุช ศิวะภิญโญยศ

บทคัดย่อ

ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) เป็นสารประกอบอินทรีย์จำพวกโพลีฟีนอล (polyphenols) พบได้ในเครื่องดื่มบางชนิด เช่น ชา กาแฟ เบียร์ น้ำผลไม้และไวน์ งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการตรวจวัดหาปริมาณ ฟลาโวนอยด์ที่สำคัญคือ คาเทชิน (catechin)ในตัวอย่างเครื่องดื่มชาเขียวสำเร็จรูป 4 ยี่ห้อ ซึ่งเครื่องดื่มชาเขียวสำเร็จรูปแต่ละยี่ห้อจะถูกนำมาระเหยแห้งด้วยความเย็นจนกลายเป็นผง จากนั้นนำผงชาที่ได้มาละลายด้วยเฟสเคลื่อนที่ แล้วทำการตรวจวัดด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบเฟสย้อนกลับ (RP-HPLC) เฟสเคลื่อนที่ที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์เป็นของผสมระหว่าง กรดฟอสฟอริก 85%, เมทานอล และน้ำกลั่นปราศจากไอออนในอัตราส่วน 85:15:0.1 ตามลำดับ อัตราการไหลเท่ากับ 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที ตัวตรวจวัดที่ใช้เป็นตัวตรวจวัดยูวี ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร เทคนิคนี้สามารถตรวจสอบความถูกต้องได้โดยใช้สารละลายมาตรฐานคาเทชินและ spiked sample พบว่ากราฟมาตรฐานมีค่ามีสัมประสิทธิสหพันธ์เท่ากับ 0.9994 ค่าความถูกต้องแสดงในเทอมของร้อยละการคืนกลับมีค่าอยู่ในช่วง 1-5 % ชาเขียวพร้อมดื่ม 4 ยี่ห้อ มีค่าเฉลี่ยของปริมาณคาเทชินดังนี้ ยี่ห้อโออิชิเท่ากับ4.3863 ± 0.1920 ppm, ยี่ห้อแจแปนกรีนทีเท่ากับ 3.7892 ± 0.2549 ppm, ยี่ห้อนามาชะเท่ากับ3.4389 ± 0.2554 ppm, ยี่ห้อยูนิฟเท่ากับ 1.5701 ± 0.1872 ppm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Determination of catechin in instant greentea beverages by high performance liquid chromatography
Name	Miss Duangamon Sungdath Mister Wiwat Pongpunjuntar
Department	Chemistry Faculty science
Program	Industrial Chemistry-Analytical Instrumentation
Academic Year	2006
Special Project Advisor	Assoc.Prof Kanita Tangkananurak
Special Project co-advisor	Assoc.Prof Nongnuch Siwapinyoyot

ABSTRACT

The flavonoids were polyphenolic compounds which were also present in beverages such as tea, coffee, beer, juice and wine. The objective of this research was to determine the concentration of major catechin in instant green tea beverages four brands. Instant green tea beverages were extracted and evaporated to tea powder then, dissolved with mobile phase and detected by HPLC. The mobile phase used in the analytical work was mix solution of Deionization water, methanol and 85% phosphoric acid in ratio 85:15:0.1 respectively. Use flow rate at 1.2 ml/min and the detector was UV detector at 280 nm. The analytical method was validated by employing the standard solution and spiked sample. The correlation coefficient (R^2) of catechin standard curve found was 0.9994. Accuracy expressed in term of recoveries was in the range of 99-125 %. Four brands of instant green tea beverages were determined. The mean values of the quantity of catechin obtained were 4.3863 ± 0.1920 ppm for Oishi brand, 3.7892 ± 0.2549 ppm for Japan green tea brand, 3.4389 ± 0.2554 ppm for Namasha brand and 1.5701 ± 0.1872 ppm for Unif brand.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงได้อย่างดีด้วยคำแนะนำของอาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ผศ.คณิตา ตังคณานุรักษ์ ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความอนุเคราะห์ของท่าน และขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบคุณนักวิทยาศาสตร์ ภาคเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่คอยให้ความช่วยเหลือในการทำโครงงานพิเศษจนสำเร็จลุล่วงเป็นอย่างดี

ขอขอบคุณนักวิทยาศาสตร์ ภาควิชาวิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่คอยให้ความช่วยเหลือในการทำโครงงานพิเศษจนสำเร็จลุล่วงเป็นอย่างดี

ขอขอบคุณนักวิทยาศาสตร์ ภาควิศวกรรมอาหาร คณะวิศวกรรม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่คอยให้ความช่วยเหลือในการทำโครงงานพิเศษจนสำเร็จลุล่วงเป็นอย่างดี

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา บุคคลในครอบครัวและเพื่อนๆเป็นอย่างสูงที่คอยให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจอย่างดีตลอดมาจนสำเร็จการศึกษา

นางสาวดวงกมล สังข์เดช

นายวิวัฒน์ พงษ์พันธุ์จันทรา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข
กิตติกรรมประกาศ ..... ค
สารบัญ ..... ง
สารบัญตาราง ..... ฉ
สารบัญรูป ..... ฌ
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ที่มาและความสำคัญของโครงงานพิเศษ 1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ 2
1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ 2
1.4 ขั้นตอนการวิจัย และวิธีการดำเนินงาน 2
1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ 3
บทที่2 หลักการและทฤษฎี 4
2.1 ปฏิกิริยาออกซิเดชั่นและการเกิดอนุมูลอิสระ 4
2.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของชา 5
2.3 ประเภทของชา 7
2.4 พอลิฟีนอล (polyphenol) สารอาหารที่มีประโยชน์สูงต่อสุขภาพ 8
2.5 คาเทชิน 10
2.6 สารอาหารอื่นๆ ที่พบในชามีดังนี้ 11
2.7 ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของชาเขียว 12
2.8 การตรวจสอบความใช้ได้ (Method validation) 13
2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 18
บทที่3 วิธีดำเนินการวิจัย
3.1 สารเคมี 19
3.2 เครื่องมือ และอุปกรณ์ 19
3.3 วิธีดำเนินการทดลอง 20
3.3.1 การเตรียมสารละลาย 20
3.3.2 การเตรียมตัวอย่าง 21
3.3.3 สภาวะเครื่องโครมาโทกราฟฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูง 22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผล 24
4.1 การเตรียมกราฟมาตรฐานคาเทชิน 24
4.2 การตรวจวัดปริมาณคาเทชินในเครื่องดื่มเขียว 4 ยี่ห้อ 25
4.3 การศึกษาความเที่ยง 26
4.4 การตรวจวัดปริมาณคาเทชินใน spiked sample 27
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ 28
5.1 สรุปผลการทดลอง 28
5.2 ข้อเสนอแนะ 28
บรรณานุกรม 29
ภาคผนวก 31
ภาคผนวก ก 32
หลักการของโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง 32
ภาคผนวก ข 36
วิธีการคำนวณค่าสารคาเทชินในตัวอย่างชาเขียวสำเร็จพร้อมดื่ม 36
ภาคผนวก ค 37
กราฟโครมาโทแกรมสารมาตรฐานคาเทชิน 37
ภาคผนวก ง 42
กราฟความเข้มข้นสารคาเทชินในชาเขียวพร้อมดื่ม 4 ยี่ห้อและคำนวณค่า $\overline{X}$, SD, %RSD 42
ภาคผนวก จ 50
กราฟ Spiked สารมาตรฐานคาเทชินลงในตัวอย่างชาเขียวพร้อมดื่ม 4 ยี่ห้อ 50
ภาคผนวก ฉ 58
ข้อมูลเกี่ยวกับการประเมินทางสถิติ 58

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ 4.1 ความเข้มข้นของคาเทชินในเครื่องดื่มชาเขียว 4 ยี่ห้อ 25
ตารางที่ 4.2 ตารางแสดงค่าเฉลี่ย ($\overline{X}$), ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD), ค่าร้อยละ 26
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% Relative Standard, RSD)
ตารางที่ 4.3 ความเข้มข้นของคาเทชินใน spiked sample 27
ตารางแสดง ตัววัดสัญญาณที่ปรับความยาวคลื่นได้ 35
ตาราง ค-1 ค่าพื้นที่พีคแต่ละค่าความเข้มข้นต่างๆของสารมาตรฐาน 41
ตาราง ง -1 ความเข้มข้นสารคาเทชินที่มีในชาเขียวนามาชะ 43
ตาราง ง -2ความเข้มข้นสารคาเทชินที่มีในชาเขียวโออิชิ 45
ตาราง ง -3 ความเข้มข้นสารคาเทชินที่มีในชาเขียวยูนิฟ 47
ตาราง ง -4 ความเข้มข้นสารคาเทชินที่มีในชาเขียวเจแปนกรีนที 49
ตาราง จ -1 ความเข้มข้นสารคาเทชินที่มีในชาเขียวนามาชะ 51
ตาราง จ -2 ความเข้มข้นสารคาเทชินที่มีในชาเขียวโออิชิหลังจากการspiked
สารมาตรฐานคาเทชินลงไป 53
ตาราง จ -3 ความเข้มข้นสารคาเทชินที่มีในชาเขียวยูนิฟหลังจากการspiked
สารมาตรฐานคาเทชินลงไป 55
ตาราง จ -4 ความเข้มข้นสารคาเทชินที่มีในชาเขียวเจแปนกรีนทีหลังจากการspiked
สารมาตรฐานคาเทชินลงไป 57
ตาราง ฉ-1 แสดงผลการทดลองการประเมินผลทางสถิติเพื่อการหาความถูกต้อง 58
และความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์คาเทชินในชาเขียวพร้อมดื่ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ 2.1 ต้นชามีชื่อทางพฤกษาศาสตร์ว่า คาเมลเลีย ไซเนนซิส (CamelliaSinensis) 5
รูปที่ 2.2 การเก็บเกี่ยวใบชา 6
รูปที่ 2.3 ชาเขียว (green tea) 7
ชาดำ (Black tea) 7
ชาแดงหรือชาอูหลง (Red tea or Oolong) 7
รูปที่ 2.4 แสดงสูตรโครงสร้างของสารคาเทชินที่มีอยู่ในชาเขียว 10
รูปที่ 2.5 แสดงสูตรโครงสร้างของสารคาเทชินที่สำคัญ 4 ชนิดที่มีอยู่ในชาเขียวคือ 11
(-)-epicatechin (EC), (-)-epicatechin-3-gallate (ECG), (-)-epigallocatechin (EGC),
(-)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG)
รูปที่ 3.1 (ก) เครื่อง Water Division of MILLIPORE Milford 20
(ข) เครื่อง Cavitator Ultrasonic Cleaner สำหรับไล่อากาศ
รูปที่ 3.2 ชาเขียวสำเร็จรูปพร้อมดื่ม4 ยี่ห้อคือ Oishi, Japan Greentea, Namasha, Unif 21
รูปที่ 3.3 เครื่องเตรียมแช่แข็ง (cooling bath) อุณหภูมิ -47 °C 21
รูปที่ 3.4 (ก) เครื่อง freeze-drier, (ข) รูปสารตัวอย่างเมื่อกลายเป็นผง 22
รูปที่ 4.1 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานคาเทชินเข้มข้น 150 ppm 24
รูปที่ 4.2 กราฟมาตรฐานสารละลายคาเทชิน 25
รูปที่ ก-2 ส่วนประกอบของเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) 32
รูปที่ ก-1 เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) 33
รูป ค-1 กราฟโครมาโทแกรมสารมาตรฐานคาเทชินความเข้มข้น 50 ppm 37
รูป ค-2 กราฟโครมาโทแกรมสารมาตรฐานคาเทชินความเข้มข้น 100 ppm 37
รูป ค-3 กราฟโครมาโทแกรมสารมาตรฐานคาเทชินความเข้มข้น 125 ppm 38
รูป ค-4 กราฟโครมาโทแกรมสารมาตรฐานคาเทชินความเข้มข้น 150 ppm 38
รูป ค-5 กราฟโครมาโทแกรมสารมาตรฐานคาเทชินความเข้มข้น 200 ppm 39
รูป ค-6 กราฟโครมาโทแกรมสารมาตรฐานคาเทชินความเข้มข้น 250 ppm 39
รูป ค-7 กราฟโครมาโทแกรมสารมาตรฐานคาเทชินความเข้มข้น 300 ppm 40
รูป ค-8 กราฟโครมาโทแกรมสารมาตรฐานคาเทชินความเข้มข้น 350 ppm 40
รูป ค-9 กราฟโครมาโทแกรมสารมาตรฐานคาเทชินความเข้มข้น 400 ppm 41
รูป ง -1 กราฟโครมาโทแกรมสารคาเทชินในชาเขียวนามาชะซ้ำที่ 1 42
รูป ง -2 กราฟโครมาโทแกรมสารคาเทชินในชาเขียวนามาชะซ้ำที่ 2 42
รูป ง -3 กราฟโครมาโทแกรมสารคาเทชินในชาเขียวนามาชะซ้ำที่ 3 43
รูป ง -4 กราฟโครมาโทแกรมสารคาเทชินในชาเขียวโออิชิซ้ำที่ 1 44

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูป ง -5 กราฟโครมาโทแกรมสารคาเทชินในชาเขียวโออิชิซ้ำที่ 2 44
รูป ง -6 กราฟโครมาโทแกรมสารคาเทชินในชาเขียวโออิชิซ้ำที่ 3 45
รูป ง -7 กราฟโครมาโทแกรมสารคาเทชินในชาเขียวยูนิฟ ซ้ำที่ 1 46
รูป ง -8 กราฟโครมาโทแกรมสารคาเทชินในชาเขียวยูนิฟ ซ้ำที่ 2 46
รูป ง -9 กราฟโครมาโทแกรมสารคาเทชินในชาเขียวยูนิฟ ซ้ำที่ 3 47
รูป ง -10 กราฟโครมาโทแกรมสารคาเทชินในชาเขียวเจแปนกรีนที ซ้ำที่ 1 48
รูป ง -11 กราฟโครมาโทแกรมสารคาเทชินในชาเขียวเจแปนกรีนที ซ้ำที่ 2 48
รูป ง -12 กราฟโครมาโทแกรมสารคาเทชินในชาเขียวเจแปนกรีนที ซ้ำที่ 3 49
รูป จ-1 กราฟโครมาโทแกรม spiked สารมาตรฐานคาเทชินลงในตัวอย่างชาเขียวพร้อมดื่มนามาชะซ้ำที่ 1 50
รูป จ-2 กราฟโครมาโทแกรม spiked สารมาตรฐานคาเทชินลงในตัวอย่างชาเขียวพร้อมดื่มนามาชะซ้ำที่ 2 50
รูป จ-3 กราฟโครมาโทแกรม spiked สารมาตรฐานคาเทชินลงในตัวอย่างชาเขียวพร้อมดื่มนามาชะซ้ำที่ 3 51
รูป จ-4 กราฟโครมาโทแกรม spiked สารมาตรฐานคาเทชินลงในตัวอย่างชาเขียวพร้อมดื่มโออิชิ ซ้ำที่ 1 52
รูป จ-5 กราฟโครมาโทแกรม spiked สารมาตรฐานคาเทชินลงในตัวอย่างชาเขียวพร้อมดื่มโออิชิซ้ำที่ 2 52
รูป จ-6 กราฟโครมาโทแกรม spiked สารมาตรฐานคาเทชินลงในตัวอย่างชาเขียวพร้อมดื่มโออิชิ ซ้ำที่ 3 53
รูป จ-7 กราฟโครมาโทแกรม spiked สารมาตรฐานคาเทชินลงในตัวอย่างชาเขียวพร้อมดื่มยูนิฟ ซ้ำที่ 1 54
รูป จ-8 กราฟโครมาโทแกรม spiked สารมาตรฐานคาเทชินลงในตัวอย่างชาเขียวพร้อมดื่มยูนิฟ ซ้ำที่ 2 54
รูป จ-9 กราฟโครมาโทแกรม spiked สารมาตรฐานคาเทชินลงในตัวอย่างชาเขียวพร้อมดื่มยูนิฟ ซ้ำที่ 3 55
รูป จ-10 กราฟโครมาโทแกรมspikedสารมาตรฐานคาเทชินลงในตัวอย่างชาเขียวพร้อมดื่มแจแปนกรีนทีซ้ำที่ 1 56
รูป จ-11 กราฟโครมาโทแกรมspikedสารมาตรฐานคาเทชินลงในตัวอย่างชาเขียวพร้อมดื่มแจแปนกรีนทีซ้ำที่ 2 56
รูป จ-12กราฟโครมาโทแกรม spiked สารมาตรฐานคาเทชินลงในตัวอย่างชาเขียวพร้อมดื่มแจแปนกรีนที ซ้ำที่ 3 57

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารต้านอนุมูลอิสระที่มีมากในชาเขียว คือ คาเทชิน ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจในการศึกษาการตรวจวัดหาปริมาณคาเทชินในเครื่องดื่มชาเขียวพร้อมดื่มที่เป็นที่นิยมบริโภคกันในทุกเพศทุกวัย โดยในที่นี้จะใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบเฟสย้อนกลับ(Reverse-phase High Performance Liquid chromatography, RP-HPLC) ในการตรวจวัด

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่องโครมาโทกราฟของเหลวสมรรถนะสูงในการตรวจวัดปริมาณคาเทชิน
2. เพื่อทำการตรวจวัดหาปริมาณสารคาเทชิน ในเครื่องดื่มชาเขียวสำเร็จรูปพร้อมดื่มที่มีขายตามท้องตลาดด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบเฟสย้อนกลับ (Reverse-Phase High Performance liquid chromatography, RP-HPLC)

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

1. ทดสอบความใช้ได้ของวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงในการตรวจวัด คาเทชินในสารละลายมาตรฐานคาเทชินและ spiked sample
2. ตรวจวัดปริมาณคาเทชินในเครื่องชาเขียวสำเร็จรูป 4 ยี่ห้อ คือ โออิชิ, ยูนิฟ, นามาชะและเจแปนกรีนที

1.4 ขั้นตอนการวิจัย และวิธีการดำเนินงาน

1. สืบค้นข้อมูลจากแหล่งข้อมูลที่เกี่ยวข้อง
2. ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่องโครมาโทกราฟของเหลวสมรรถนะสูงในการตรวจวัดสารละลายมาตรฐานคาเทชินและเตรียมกราฟมาตรฐาน
3. ศึกษาการเตรียมสารละลายคาเทชินจากการสกัดจากตัวอย่างเครื่องดื่มชาเขียว
4. ศึกษาการตรวจวัดปริมาณคาเทชินในสารละลายตัวอย่างด้วยเทคนิคโครมาโทรกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบเฟสย้อนกลับ(Reverse-Phase High Performance liquid chromatography, RP-HPLC)
5. ประเมินผลข้อมูลโดยใช้หลักทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงความเหมาะสมในการใช้วิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงในการตรวจวัดปริมาณสารคาเทชิน
2. ทราบถึงปริมาณสารคาเทชินที่มีอยู่ในเครื่องดื่มชาเขียวสำเร็จรูปพร้อมดื่ม 4 ยี่ห้อ คือ โออิชิ , ยูนิฟ, นามาชะและเจแปนกรีนที เพื่อเป็นตัวชี้บอกถึงคุณภาพของเครื่องดื่มชาเขียวได้
3. เป็นข้อมูลสำหรับผู้บริโภคในการเลือกบริโภคเครื่องดื่มชาเขียวสำเร็จรูปพร้อมดื่ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่2
หลักการและทฤษฎี

2.1 ปฏิกิริยาออกซิเดชั่นและการเกิดอนุมูลอิสระ

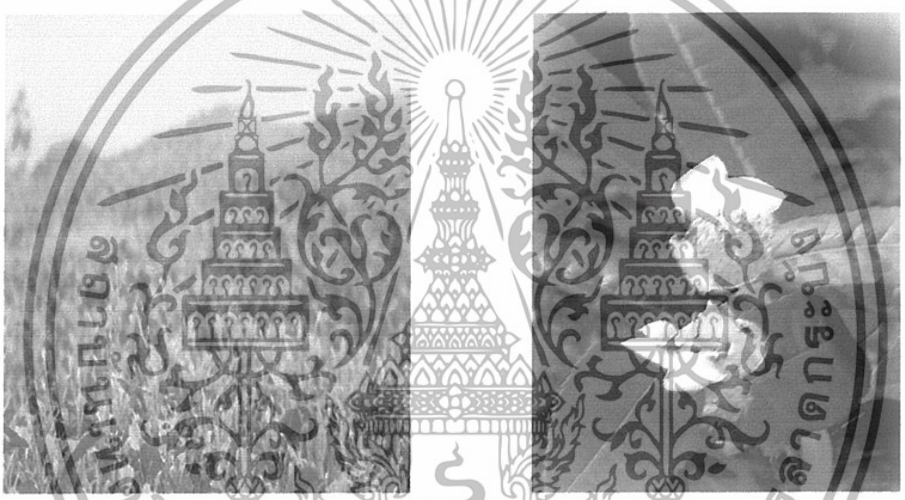
ปัจจุบันสมมติฐานในการเกิดอนุมูลอิสระที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นและนำไปสู่พยาธิสภาพของโรคต่างๆ ได้รับการยอมรับอย่างแพร่หลาย และมีการวิจัยกันอย่างต่อเนื่อง สารอนุมูลอิสระสามารถทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลชนิดต่างๆ ในร่างกายได้จำนวนมากก่อให้เกิดโรคภัยไข้เจ็บหลายชนิด ปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain reaction) คือทำให้สารที่ถูกอนุมูลอิสระเข้าทำปฏิกิริยาเสื่อมสภาพไปและสร้างสารอนุมูลอิสระใหม่ไปเร่งให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นและทำลายเนื้อเยื่อข้างเคียงหรือเนื้อเยื่ออื่นอีกต่อไปอย่างควบคุมไม่ได้ ปฏิกิริยาที่มีผลเสียต่อร่างกายอย่างมากคือการทำให้เกิดพันธะที่ผิดปกติของ DNA มีการทำลายโปรตีน ไขมัน และ macromolecule อื่นๆ เกิดความเสียหายมากมายตามมาเช่น การบาดเจ็บของเซลล์ การแก่ (aging) และโรคอีกหลายชนิดเช่น atherosclerosis เบาหวาน มะเร็ง เป็นต้น ปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของอนุมูลอิสระมักจะเกิดกับไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์หรือเยื่อหุ้ม organelles ภายในเซลล์ที่เรียกกันว่า lipid peroxidation ปกติภายในเซลล์จะมีระบบหรือกระบวนการควบคุมและทำลายสารอนุมูลอิสระ ได้แก่ superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase และ glutathione เป็นต้น สารเหล่านี้ทำหน้าที่ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นและกำจัดอนุมูลอิสระได้ จึงทำให้เราทุกคนไม่เกิดโรคเมื่อได้รับสารในกลุ่มอนุมูลอิสระเข้าสู่ร่างกาย ปัญหาที่เกิดโรคดังกล่าวมาแล้วมักเกิดจากการได้รับอนุมูลอิสระจำนวนมากจนเกินกว่าที่ระบบต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นจะสามารถควบคุมไว้ได้ หรืออาจเกิดจากระบบต้านออกซิเดชั่นของอนุมูลอิสระเสื่อมสภาพไปเอง

ในระยะหลังเริ่มมีผู้สนใจศึกษาเพื่อค้นคว้าหาสารที่มีความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระกันมากขึ้น เนื่องจากอาหารยุคปัจจุบันมีสารอนุมูลอิสระปนเปื้อนมาเป็นจำนวนมากขึ้นเรื่อยๆ โดยเฉพาะในอาหารประเภทกรุบกรอบทั้งหลายทั้งที่ผลิตมาจากโรงงานและขายเป็นอาหารสดทั่วไป อาหารที่ใช้น้ำมันทอดโดยเฉพาะที่ใช้น้ำมันเก่าๆ ทอดซ้ำติดต่อกันหลายครั้ง เช่น ปาท่องโก๋ เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของชา

ชาเป็นพืชในตระกูลคาเมลเลียไซเนนซิล (Camellia sinensis) ในอดีตนักพฤกษศาสตร์แบ่งชนิดของต้นชาด้วยกันสองชนิด และแต่ละชนิดมีเอกลักษณ์ และคุณสมบัติที่แตกต่างกัน กล่าวคือ ต้นชาสายพันธุ์คาเมลเลียไซเนนซิส เป็นชาที่มีถิ่นกำเนิดดั้งเดิมอยู่ในประเทศจีน เจริญเติบโตในสภาพภูมิประเทศที่เป็นพื้นที่สูง อากาศเย็น ต้นชาชนิดนี้ให้ใบเล็ก ยาวประมาณ 3 นิ้ว กว้างประมาณ 1 นิ้ว ส่วนอีกสายพันธุ์หนึ่งก็ได้แก่ คาเมลเลีย แอสซามิกา (Camellia asamica) ซึ่งเป็นพืชท้องถิ่นของอินเดีย และเจริญเติบโตได้ดีในภูมิประเทศเขตร้อนปานกลาง ต้นชาชนิดนี้ให้ใบใหญ่กว่าโดยอาจให้ใบที่กว้างถึง 4 นิ้ว ยาว 10 นิ้ว แต่ในปัจจุบันนี้ นักพฤกษศาสตร์สรุปได้ว่า แม้พืชทั้งสองสายพันธุ์นี้จะมีเอกลักษณ์ที่ต่างกันอย่างเห็นได้ชัด แต่ความจริงแล้วทั้งสองชนิดเป็นสายพันธุ์เดียวกัน คือ คาเมลเลีย ไซเนนซิสนั่นเอง



รูปที่ 2.1 ต้นชามีชื่อทางพฤกษาศาสตร์ว่า คาเมลเลีย ไซเนนซิส (CamelliaSinensis)

ต้นชาเป็นพืชที่มีลักษณะเป็นพุ่ม ใบเขียว และหากปล่อยให้เจริญเติบโตเองในป่าจะให้ดอกสีขาวส่งกลิ่นหอมในฤดูใบไม้ผลิ ซึ่งเมื่อดอกชาเติบโตเต็มที่จะให้ผลชาที่ภายในมีเมล็ดเล็กๆ ตั้งแต่หนึ่งถึงสามเมล็ด ส่วนในการแพร่พันธุ์ ต้นชาจะต้องได้รับการผสมละอองเกสรกับต้นชาต้นอื่นๆ เพื่อให้มีการแลกเปลี่ยนยีน (Gene) และโครโมโซม (Chromosome) ซึ่งกันและกัน เมื่อชาต้นใหม่เจริญเติบโตจะคงคุณลักษณะที่เข้มแข็งบางส่วนของพ่อแม่พันธุ์ และด้วยวิธีการนี้ ต้นชาจึงเป็นพืชที่มีคุณลักษณะเด่นเฉพาะตัว

ในป่า ต้นชาสามารถเจริญเติบโตได้สูงตั้งแต่ 15 – 30 ฟุต ภายในวงล้อมของชาต้นเล็กๆ แต่ในการเพาะปลูก เกษตรกรมักรักษาระดับความสูงของต้นชาให้อยู่ในระดับความสูงประมาณ 3 – 5 ฟุต เพื่อความสะดวกในการเก็บเกี่ยวใบชาอ่อน นอกจากนี้การปล่อยให้ต้นชาเจริญเติบโตสูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เกิดไป ใบอ่อนๆ ของต้นชาจะได้รับความเสียหายจากแสงแดดได้ง่าย ซึ่งทำให้ใบอ่อนไหม้เกรียม และด้วยเหตุผลข้อนี้เกษตรกรจึงมักเลือกสถานที่เพาะปลูกชาภายในร่มเงาของต้นไม้ใหญ่อื่นๆ ด้วยเช่นกัน

การเก็บเกี่ยวใบชา

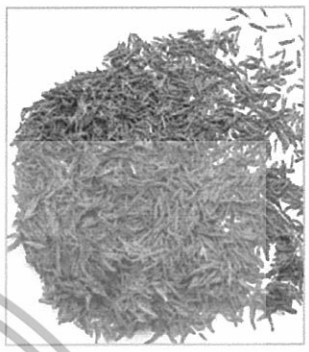
รูปที่ 2.2 การเก็บเกี่ยวใบชา

ส่วนของต้นชาที่นำมาทำเป็นเครื่องดื่มจะอยู่ส่วนบนสุดของต้น อันเป็นตำแหน่งของการผลิใบอ่อน และการแตกหน่อ ซึ่งเป็นส่วนที่ให้คุณภาพดีที่สุดกล่าวคือ ชาที่มีคุณภาพที่ดีที่สุดคือชาที่ผลิตจากใบชาอ่อน และตานั่นเอง อนึ่งมีข้อเท็จจริงที่น่าสนใจมากประเด็นหนึ่งซึ่งได้แก่ วิธีการเก็บเกี่ยว เพราะเครื่องมือในการเก็บเกี่ยวใบ และหน่ออ่อนของต้นชาที่ดีที่สุดซึ่งทำให้ได้ใบชา และตาที่มีคุณภาพมากที่สุด คือมือของมนุษย์ ตามข้อเท็จจริงก็คือการเก็บเกี่ยวใบ และตาของต้นชาที่ทำกันมาตั้งแต่อดีตเมื่อหลายพันปีก่อนจนถึงปัจจุบันในส่วนต่างๆ ของโลกยังคงใช้มือเป็นเครื่องมือในการเก็บเกี่ยวเหมือนเดิม ซึ่งแม้แต่ญี่ปุ่นหรือไต้หวันที่เป็นประเทศที่เจริญทางด้านอุตสาหกรรมในระดับแนวหน้าของโลกก็ยังคงเก็บเกี่ยวใบ และตาของต้นชาด้วยมือมนุษย์ และยังไม่เคยมีการใช้เครื่องจักรกลเข้ามาช่วยเลยแม้แต่ครั้งเดียว แน่นอน พวกเขามีเหตุผลทางด้านวิชาการสนับสนุน นั่นคือ การเก็บเกี่ยวด้วยเครื่องจักรมักไม่สามารถเก็บเกี่ยวเฉพาะใบ และตาแต่มักดึงเอาใบ และหน่อส่วนที่หยาบกว่าเข้ามารวมอยู่ด้วย และนอกจากใบ และตาส่วนที่หยาบกว่าแล้วเครื่องจักรกลยังมักดึงเอาส่วนที่เป็นกิ่ง ตลอดจนส่วนอื่นๆ ของต้นชาออกมาด้วย ที่สำคัญการเก็บเกี่ยวมี ลักษณะหยาบไม่ประณีตนี้เป็นปัจจัยทำให้เกิดกระบวนการที่เรียกว่าการหมัก โดยทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเอนไซม์ที่มีอยู่ในใบ และตา ซึ่งเป็นสิ่งที่ต้องหลีกเลี่ยง หากต้องการให้ผลิตภัณฑ์ชามีคุณภาพดีที่สุด

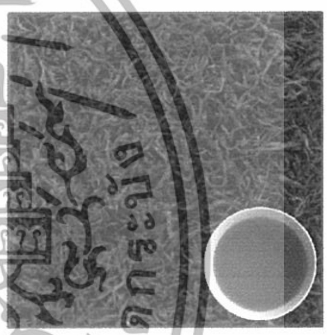
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 ประเภทของชา

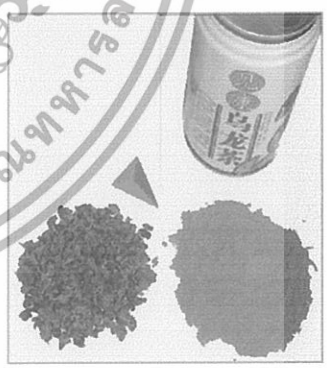
โดยทั่วไปความรู้พื้นๆ ของคนคิดว่าชามีเพียง 2 ชนิด คือชาจีนที่มีลักษณะเป็นใบนำมาชงดื่มต่างน้ำและชาฝรั่งที่มีลักษณะเป็นชาผงหรือชาสับที่กินผสมกับนม แต่ความจริงแล้วชาที่มีขายอยู่มากมายในท้องตลาดนั้น แบ่งออกเป็น 3 ประเภท ใหญ่ๆ ตามกรรมวิธีการผลิต จึงได้ชาที่มีกลิ่น รส และสีสันที่ต่างกันดังนี้คือ



1. ชาเขียว (green tea) คือยอดอ่อนของชาที่ถูกนำไปอบ (หรือคั่ว) แห้งทันที โดยไม่มีการนวดหรือหมักเลย จึงทำให้ใบชายังคงสีเขียวเอาไว้ได้ เพราะฉะนั้น ชาเขียวจึงให้รสชาติใกล้เคียงใบชาธรรมชาติมากที่สุด ซึ่งชาวจีนและชาวญี่ปุ่นจะนิยมดื่มชาเขียวกันมาก



2. ชาดำ (black tea) คือ ยอดอ่อนของชาที่ถูกนำมานวดอย่างเต็มที่ แล้วหมักจนได้กลิ่นหอมซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะ จากนั้นจึงนำมาทำให้แห้งด้วยการอบ ทำให้ใบชาที่ได้มีสีเข้มและมีรสขมปนฝาดมากขึ้น เนื่องจากปฏิกิริยาทางเคมีของสารแทนนินในใบชา ชาที่ฝรั่งส่วนใหญ่ดื่มก็คือชาดำ ซึ่งมีหลายชนิด และที่คนทั่วไปรู้จักกันดีก็คือ ชาอัสสัม ชาซีลอน และชาดาร์จิริ่ง



3. ชาแดงหรือชาอูหลง (red tea or Oolong) คือ ยอดอ่อนของชาที่ถูกนำมานวดพอให้ผิวนอกช้ำ เพิ่มกระตุ้นสารแทนนิน จากนั้นจึงอบให้แห้ง เพื่อหยุดยั้งปฏิกิริยาทางเคมีดังนั้น สีและรสของชาแดงจึงอยู่กึ่งกลางระหว่างชาดำกับชาเขียว เหมาะสำหรับดื่มเปล่าๆ ต่างน้ำ (ไม่ใส่นม)

เพราะฉะนั้นที่เข้าใจกันว่าชาแบ่งเป็น ชาจีน ชาญี่ปุ่น และชาฝรั่งจึงไม่ค่อยถูกต้องนัก เพราะชาจีนมีทั้งชาเขียวและชาแดง และชาญี่ปุ่นก็จัดเป็นชาเขียวชนิดหนึ่งเท่านั้น ซึ่งภูมิปัญญาในการผลิตชาทั้ง 3 ชนิดนี้เป็นของคนจีนมาแต่โบราณ ชาวจีนสามารถผลิตทั้งชาเขียว ชาแดง และชาดำ มาก่อนที่ชาวตะวันตกจะมาทำการค้าขายด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปัจจุบันมีการนำเอาดอกไม้ ผลไม้แห้ง หรือน้ำมันที่สกัดได้จากสมุนไพรต่างๆ มาผสมกับใบชาทั้ง 3 ประเภท ทำให้ชามีกลิ่นและรสต่างๆ หลากหลายขึ้น ที่รู้จักกันเป็นอย่างดีก็คือชามะลิ (จีน) และชาเอิร์ลเกรย์ (Earl Gray) ของอังกฤษ เป็นต้น

2.4 พอลิฟีนอล (polyphenol) สารอาหารที่มีประโยชน์สูงต่อสุขภาพ

วิธีหรือกระบวนการในการผลิตชาดำ และชาเขียวไม่เพียงเปลี่ยนแปลงรสชาติ เปลี่ยนแปลงกลิ่น และเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของชาเท่านั้น แต่ยังเปลี่ยนแปลงสรรพคุณของชาที่มีต่อสุขภาพของเราด้วยเพราะในความเป็นจริง ชาเขียวที่ไม่มีปฏิกิริยาการหมักเป็นชาที่มีปริมาณของสารกระตุ้นสุขภาพอันทรงพลังที่ชื่อว่าพอลิฟีนอลในระดับที่มากกว่าชาดำ และชาชนิดอื่นๆ ที่มีปฏิกิริยาการหมักเกิดขึ้นมากมาย

สารพอลิฟีนอลเป็นสารประกอบเชิงเคมีธรรมชาติที่พบในผลไม้ และในผักบางชนิด ซึ่งรวมถึงมันฝรั่ง กระเทียม และอาหารอื่นๆ อีกหลายชนิด ที่สำคัญในกลุ่มสารพอลิฟีนอล ได้แก่สารคาเทชิน (catechins) ซึ่งมีสรรพคุณในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และยังเป็นสารต้านออกซิเดชัน หรือสารต้านอนุมูลอิสระ ที่มีประสิทธิภาพสูง คาเทชินเป็นสารที่มีประโยชน์มากนับตั้งแต่ช่วยป้องกันไม่ให้อาหารบูดเสียเรื่อยไปจนถึงการช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง และคาเทชินนี้ก็เป็นสารอาหารที่พบได้ในเหล้าองุ่น ใบแปะก๊วย เปลือกของต้นสน และมีมากที่สุดในใบชาสด

กระบวนการผลิตชามีผลกระทบต่อปริมาณคาเทชินในใบชาเป็นอย่างมาก ยกตัวอย่างเช่น ปริมาณคาเทชินในใบชาสดที่ไม่เกิดปฏิกิริยาการหมัก จะมีอยู่ประมาณ 15–30 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักใบชาแห้ง ในขณะที่ชาสมุนไพรอื่นๆ ที่เกิดปฏิกิริยาการหมัก จะมีคาเทชินในปริมาณเพียง 8–20 เปอร์เซ็นต์ และชาดำมีปริมาณน้อยที่สุดคือมีเพียง 3 – 10 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น

ในใบชาจะมีเอนไซม์ที่ชื่อว่า พอลิฟีนอล ออกซิเดส (polyphenol oxidase) ซึ่งเมื่อใบชาถูกเด็ดออกจากต้น เอนไซม์นี้จะทำปฏิกิริยากับออกซิเจน ทันทีที่ปฏิกิริยาออกซิเดชันเกิดขึ้น กระบวนการทางเคมีนี้จะทำการเปลี่ยนโครงสร้าง และปริมาณของคาเทชิน ด้วยเหตุนี้ เป้าหมายสำคัญในการผลิตชาเขียวคือ ต้องป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันให้ได้มากที่สุด ซึ่งแน่นอนว่าการป้องกันไม่ให้เกิดปฏิกิริยาดังกล่าวได้ 100 เปอร์เซ็นต์ เลยนั้นย่อมเป็นสิ่งที่เป็นไปไม่ได้ เพราะปฏิกิริยานี้จะเกิดขึ้นทันทีที่ใบชาถูกเด็ดจากต้น อย่างไรก็ตาม การให้ใบชาสดได้รับความร้อนเป็นปัจจัยที่สามารถยุติกระบวนการดังกล่าว ดังนั้น เคล็ดลับในการผลิตใบชาจึงอยู่ที่การนำใบชาสดเข้าสู่แหล่งความร้อนให้ได้เร็วที่สุดเท่าที่จะเร็วได้นั่นเอง ปัจจัยเรื่องเวลาจึงเป็นปัจจัยสำคัญสูงสุดในการผลิตชาเขียว

แต่กระบวนการผลิตชาดำจะแตกต่างกันโดยสิ้นเชิง เพราะแทนที่จะนำใบชาสดเข้าสู่แหล่งความร้อนโดยการบ่มด้วยไอน้ำหรือคั่วในกระทะให้ได้เร็วที่สุด ใบที่ถูกเก็บเกี่ยวจะถูกนำมาวาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เรียงกันในถาดแล้วปล่อยให้ตากแดดตากลมนานประมาณ 18–24 ชั่วโมง เพื่อให้แห้งสนิท ซึ่งกว่ากระบวนการนี้จะเสร็จสิ้น น้ำหนักของใบชาสดจะหายไปตั้งแต่หนึ่งในสามถึงครึ่งหนึ่ง ขณะเดียวกันปฏิกิริยาออกซิเดชันจะเร่งการทำลายสารคาเทชินที่มีอยู่ในใบชาไปพร้อมกัน ด้วยเหตุนี้สรรพคุณของชาดำจึงน้อยกว่าชาเขียวมากมายดังกล่าวข้างต้น ชาดำจะได้เปรียบกว่าชาเขียวก็เฉพาะในประเด็นที่มีรสเข้มข้นกว่า และมีกลิ่นแรงกว่าเท่านั้น

ชาวจีนดื่มชาโดยระบุว่าการดื่มชาเป็นสิ่งที่ดีต่อสุขภาพดีทั้งสุขภาพกาย และสุขภาพจิตมานานนับเป็นพันๆปี แต่นักวิทยาศาสตร์ของโลกตะวันตกได้ทำการศึกษา และวิจัยสรรพคุณข้างต้นอย่างจริงจังด้วยการแยกสารประกอบในใบชา และดำเนินการตรวจสอบในห้องปฏิบัติการเมื่อไม่นานมานี้เอง

ในปี 1970 ผู้เชี่ยวชาญโรคระบาดวิทยาของโลกตะวันตกหลายท่านสังเกตพบว่าประชากรที่อาศัยอยู่ในเมืองชิสุโอกะแถบบริเวณที่เป็นใจกลางประเทศญี่ปุ่น และเป็นบริเวณที่มีการเพาะปลูกชา รวมไปถึงมีการบริโภคชาเขียวในปริมาณที่สูงมากนั้น มีอัตราการเสียชีวิตจากโรคมะเร็งกระเพาะอาหารในสัดส่วนที่ต่ำกว่าชาวญี่ปุ่นด้วยกันเองในแถบอื่นๆ มากมายอย่างเห็นได้ชัด ทั้งที่โรคมะเร็งกระเพาะอาหารของชาวญี่ปุ่นยังคงอยู่ในระดับสูง ในขณะที่อัตราการเป็นโรคมะเร็งชนิดอื่นๆ ยังคงอยู่ในระดับต่ำสุด เมื่อเปรียบเทียบกับส่วนอื่นๆ ของโลก

ด้วยข้อเท็จจริงนี้เองที่กระตุ้นให้ผู้เชี่ยวชาญโรคระบาดวิทยาหันมาให้ความสนใจ และศึกษาวิถีชีวิตของชาวญี่ปุ่นในเมืองชิสุโอกะอย่างจริงจัง ซึ่งก็พบว่าชาวเมืองชิสุโอกะนิยมดื่มชาเขียวในปริมาณที่สูงกว่าประชาชนในแถบอื่นๆ ที่มีสัดส่วนการเป็นโรคมะเร็งในระดับที่สูงกว่ากล่าวคือ ผู้เชี่ยวชาญโรคระบาดวิทยาพบว่าชาวญี่ปุ่นโดยทั่วไปนิยมดื่มชาส่วนใหญ่ได้แก่ชาเขียว แต่มีเพียงประชากรในเมืองชิสุโอกะเพียงเมืองเดียวเท่านั้นที่ดื่มชาเขียวกันอย่างจริงจัง ทั้งนี้เนื่องจากเมืองชิสุโอกะเป็นเมืองที่มีการเพาะปลูกชากันมากที่สุดในประเทศนั่นเอง แม้แต่ประชาชนทั่วไปมักปลูกชาเป็นพืชสวนครัวในลานหลังบ้านอีกด้วย ด้วยเหตุนี้ กาหรือหม้อน้ำของชาวญี่ปุ่นในเมืองนี้จึงมักต้มน้ำให้เดือดอยู่ตลอดเวลา

เมื่อศึกษาในผู้ที่นิยมดื่มชาดำในแถบอื่นๆ ของโลก ผู้เชี่ยวชาญโรคระบาดวิทยากลุ่มนี้ก็พบว่าสรรพคุณในด้านป้องกันโรคมะเร็งกระเพาะอาหารในกลุ่มที่นิยมดื่มชาดำไม่เด่นชัดเหมือนกับปรากฏการณ์ที่พวกเขาพบในเมืองชิสุโอกะ กระทั่งในที่สุด คำตอบที่ชัดเจนนั่นคือปริมาณคาเทชินที่มีสูงกว่ามากในชาเขียว เพราะในชาเขียวมีคาเทชินอยู่ราว 30 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักใบชาแห้ง ในขณะที่ชาดำมีคาเทชินเพียง 3–10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักใบชาแห้งเท่านั้น ด้วยเหตุนี้ผู้เชี่ยวชาญจึงต้องทำการวิจัยเพิ่มเติม เพื่อหาหลักฐานสนับสนุนทฤษฎีที่ว่าคาเทชินในชาเขียวเป็นสารที่มีความสามารถในด้านป้องกันโรคมะเร็งได้

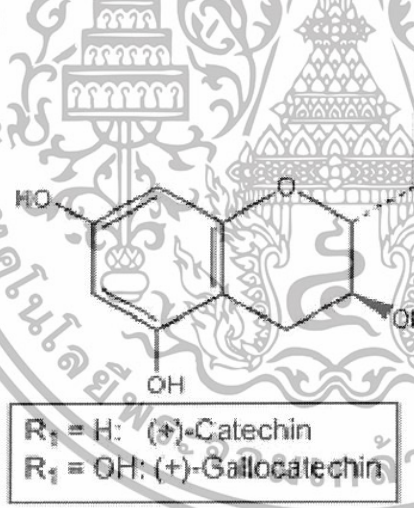
เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุดกับสัตว์ทดลองในห้องปฏิบัติการนักวิจัยใช้กระบวนการทางด้านวิทยาศาสตร์ในการสกัดสารคาเทชินที่มีอยู่ในใบชา และทำให้เข้มข้นในรูปของผงแห้ง ซึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถผสมในอาหาร ในน้ำดื่มหรือละลายเป็นยาฉีดผ่านเข้าทางผิวหนัง และนับตั้งแต่บัดนั้นเป็นต้นมา วงการวิจัยทางการแพทย์ก็ตื่นตัว มีการแยกสารคาเทชินออกมาวิเคราะห์แบบเจาะลึกมากขึ้น รวมไปถึงการทดสอบประสิทธิภาพที่มีต่อระบบสรีระวิทยา และผลที่ได้จากการวิจัยในแต่ละครั้งได้สร้างความน่าสนใจให้แก่วงการแพทย์เป็นอย่างมากนั่นเอง

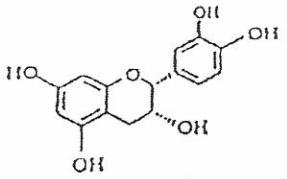
2.5 คาเทชิน

มีสูตรทางเคมีคือ $C_{15}H_{14}O_6$ มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 290.28 กรัมต่อโมล จุดหลอมเหลว (melting point) อยู่ระหว่าง 212–216 องศาเซลเซียส สามารถละลายได้เล็กน้อยในน้ำเย็น และละลายได้มากในน้ำร้อน แอลกอฮอล์ กรดน้ำส้ม (glacial acetic acid) และอะซิโตน (acetone) ไม่ละลายในเบนซีน (benzene) คลอโรฟอร์ม (chloroform) และปิโตรเลียม อีเทอร์ (petroleum ether) คาเทชินที่พบในชามีด้วยกัน 8 อนุพันธ์ได้แก่ คาเทชิน (catechin, C) อิพิ-คาเทชิน (Epicatechins, EC) แกลโลคาเทชิน (gallocatechin, GC) อิพิแกลโลคาเทชิน (epigallocatechin, EGC) คาเทชินแกลเลต (Catechin gllate, CG) แกลโลคาเทชินแกลเลต (gallocatechin gallate, GCG) อิพิคาชินแกลเลต (epicatechin gallate, ECG) และอิพิแกลโล-คาเทชินแกลเลต (epigallocatechingallate, EGCG)

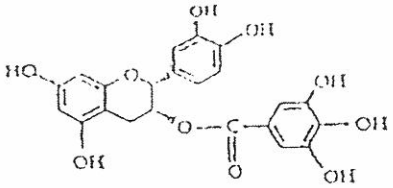


รูปที่ 2.4 แสดงสูตรโครงสร้างของสารคาเทชินที่มีอยู่ในชาเขียว

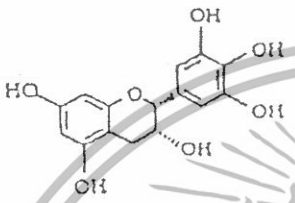
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



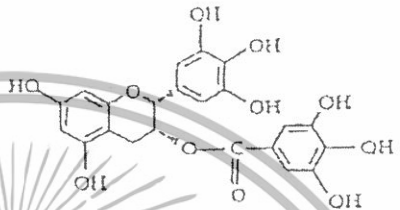
(-)-Epicatechin



(-)-Epicatechin-3-gallate



(-)-Epigallocatechin



(-)-Epigallocatechin-3-gallate

รูปที่ 2.5 แสดงสูตรโครงสร้างของสารคาเทชินที่สำคัญ 4 ชนิดที่มีอยู่ในชาเขียวคือ (-)-epicatechin (EC), (-)-epicatechin-3-gallate (ECG), (-)-epigallocatechin (EGC), (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG)

คาเทชินเป็นฟลาโวนอยด์ (flavonid) ชนิดพิเศษที่พบในชาโดยเฉพาะในชาเขียว และบางครั้งก็เรียกว่าพอลิฟีนอลชาเขียว (Green tea polyphenol) มีสรรพคุณเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพสูง (Liebert และคณะ, 1999) ช่วยดัก และทำลายอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นออกซิเจนโมเลกุลเดี่ยว และเปอร์ออกไซด์ ช่วยป้องกันไม่ให้เกิดการทำลายเซลล์เนื้อเยื่อ นอกจากนี้ยังทำงานร่วมกับวิตามิซีเมื่อเสริมความแข็งแรงให้แก่ผนังหลอดเลือด

2.6 สารอาหารอื่นๆ ที่พบในชามีดังนี้

วิตามินซี	เป็นสารต้านออกซิเดชันที่มีประสิทธิภาพอีกชนิดหนึ่ง ช่วยลดความเครียดต่อต้านภาวะติดเชื้อและเสริมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน
วิตามินบีรวม	ช่วยเสริมการทำงานในกระบวนการเมตาบอลิซึ่ม (Metabolism) ของคาร์โบไฮเดรต
วิตามินเอ	มีสรรพคุณเป็นสารต้านออกซิเดชัน และช่วยชะลอความแก่
ฟลูออไรด์	ช่วยเสริมความแข็งแรงให้แก่เคลือบฟัน ป้องกันฟันผุ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7 ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของชาเขียว

ชาเขียวมีความสามารถในการลด ภาวะที่มีอนุมูลอิสระมากเสียจนสารต้านอนุมูลอิสระมีไม่เพียงพอ ได้ดีคือ มีสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) และ free–radical scavenging activity สูงทั้งการวิจัยในลักษณะ ภายในห้องปฏิบัติการ (in vitro) และในสิ่งมีชีวิต (in vivo)

สารพอลิฟีนอล ที่สำคัญของชาเขียวคือ EGCG มีความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิ-เดชันได้ดีมากและดีกว่าสาร theaflavin และ thearubigin ในชาดำ EGCG ในชาเขียวสามารถลดการสังเคราะห์ hydrogen peroxide ที่เกิดจากแสงอุลตราไวโอเลต ลดการสร้าง reactive oxygen species (ROS) ในปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดจากสารก่อมะเร็งบางชนิดได้ด้วย และลดการเจริญของเซลล์มะเร็งบางชนิดด้วยการลดการสังเคราะห์ hydrogen peroxide

EGCG เป็นสารคาเทชิน ที่มีปริมาณมากกว่าสารคาเทชินอื่นในชาเขียว รายงานการวิจัยจำนวนมากเชื่อว่าฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสาระสำคัญในชาเขียวในกลุ่มพอลิฟีนอลส่วนใหญ่มาจาก EGCG ฤทธิ์สำคัญและมีการกล่าวอ้างถึงอยู่บ่อยมากคือการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ก่อให้เกิดผลดีต่อสุขภาพตามมาอีกหลายอย่าง เช่น ลดการอักเสบ ลดการเกิด atherosclerosis ลด lipid per oxidation ลด neutrophil migration

ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของ EGCG ถือว่าอยู่ในเกณฑ์ที่ดีมาก และดีกว่าสาร theaflavin และ thearubigin ในชาดำ สามารถลดการสังเคราะห์ hydrogen peroxide ที่เกิดจากแสงอุลตราไวโอเลต ลดการสร้าง reactive oxygen species (ROS) ในปฏิกิริยาออกซิ-เดชันที่เกิดจากสารก่อมะเร็งบางชนิดได้ด้วย และลดการเจริญของเซลล์มะเร็งบางชนิดด้วยการลดการสังเคราะห์ hydrogen peroxide

EGCG ต้านกระบวนการ lipid per oxidation ในเซลล์ตับหนูทดลองได้สูงใกล้เคียงกับสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันมาตรฐานอื่นๆ เช่น glutathione, butylated hydroxytoluene, butylated hydroxyanisole, วิตามินซี และวิตามินอี หนูทดลองที่ได้รับชาเขียวจึงมักจะมี marker ของปฏิกิริยาออกซิเดชันลดลง เช่น tret-butylhydropeoxide-inducer lipid peroxidation ในไตลดลง การทำลายสาย DNA จากปฏิกิริยาออกซิเดชันลดลง

ผู้บริโภคชาเขียวจะมีน้ำเลือด (plasma) ที่มีค่า antioxidant activity สูงกว่าคนปกติ ชาเขียวมีบทบาทสำคัญในการลดปริมาณ low density lipoprotein (LDL)–cholesterol และยับยั้งปฏิกิริยา Cu^{2+} - mediated oxidation ของ LDL ความเสียหายที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของ LDL-cholesterol ก็น้อยตามไปด้วย และยังสันนิษฐานกันว่าชาเขียวสามารถยับยั้ง LDL - cholesterol มิให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน จึงมีผลลดอัตราเสี่ยงของการเกิดโรคต่างๆ ของระบบไหลเวียนโลหิต นอกจากใช้รับประทานแล้ว ปัจจุบันมีการนำชาเขียวมาเติมลงในผลิตภัณฑ์ดูแลบำรุงผิวหนัง (skin care products) หลายๆ ชนิดรวมทั้งแชมพูสระผมอีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จึงกล่าวได้ว่าชาเขียวเป็นพืชสมุนไพรที่มีรายงานทางวิทยาศาสตร์พิมพ์เผยแพร่ไว้มากที่สุด โดยเกือบทั้งหมดยืนยันประสิทธิภาพของชาเขียวในแง่มุมต่างๆ รวมทั้งกลไกทั้งในระดับเซลล์ และระดับโมเลกุล

2.8 การตรวจสอบความใช้ได้ (Method validation)

การตรวจสอบความใช้ได้ คือ การยืนยันโดยการตรวจสอบ และจัดทำหลักฐานที่เป็นรูปธรรม เพื่อแสดงว่าข้อกำหนดพิเศษต่างๆสำหรับการใช้ตามที่ตั้งใจไว้โดยเฉพาะ สามารถบรรลุผลได้ครบถ้วนและเป็นไปตามข้อกำหนด เป็นกระบวนการที่ห้องปฏิบัติการอาจกำหนดขึ้นมา เพื่อตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี วิธีวิเคราะห์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการโดยทั่วไป วิธีที่เสนอโดยลูกค้า วิธีที่หน่วยงานวิจัยพัฒนาขึ้นมา วิธีที่ห้องปฏิบัติการคิดขึ้นมาโดยอ้างอิงวิธีเดิมที่มีอยู่แล้ว (Based on an existing method) หรือ เป็นวิธีใหม่ (a novel method for the laboratory)

2.8.1 วิธีการควบคุมคุณภาพ โดยทั่วไปจะเกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์ตัวอย่างควบคุมต่างๆ ต่อไปนี้

2.8.1.1 การวิเคราะห์สารอ้างอิงที่ได้รับการรับรอง (Certified Reference Material, CRM) หรือสารอ้างอิงมาตรฐาน (Standard Reference Material, SRM) ที่ได้รับการรับรองจาก The National Institute of Standard and Technology (NIST)

2.8.1.2 การตรวจเช็คคุณภาพของสารมาตรฐาน (QC check stand, Instrument check standard)

2.8.1.3 การวิเคราะห์รีเอเจนต์แบลงค์ หรือแบลงค์ของวิธีทดสอบ (reagent blank or method blank)

2.8.1.4 การวิเคราะห์ spiked sample หรือการหา % recovery ที่ความเข้มข้นต่างๆตลอดช่วงใช้งาน

2.8.1.5 การวิเคราะห์ซ้ำในตัวอย่างเดียวกัน (duplicate analysis pair)

2.8.1.6 การทดสอบหรือประเมินวิธีวิเคราะห์โดยทำกับตัวอย่างควบคุม

2.8.1.7 การตรวจสอบสมรรถนะ (performance) ของเครื่องมือ

ในที่นี้จะขอกล่าวถึงเพียงการทดสอบหรือการประเมินวิธีวิเคราะห์โดยทำกับตัวอย่างควบคุม โดยการทดสอบความเหมาะสมของวิธีวิเคราะห์ (Method validation) คือ การยืนยันโดยการทดสอบและมีหลักฐานแสดงว่าวิธีวิเคราะห์เหมาะสมกับความต้องการเฉพาะเป้าหมายของการทดสอบความเหมาะสมของวิธีวิเคราะห์ คือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8.2 การทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ จะมีอยู่ 8 ขั้นตอนคือ

2.8.2.1 วัด Precision (ความเที่ยง)

ตรวจสอบว่าการวัดแต่ละครั้งนั้นให้ค่าใกล้เคียงเพียงใด เมื่อทดลองตัวอย่างเดียวกันซ้ำๆกัน ภายใต้สภาวะเดียวกัน โดยรายงานเป็นค่า Reproducibility เมื่อใช้ตัวอย่างซ้ำๆ กัน ซึ่งส่วนใหญ่จะรายงานผลความแม่นยำเป็นเปอร์เซ็นต์ร้อยละของสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์หรือ เปอร์เซ็นต์ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

2.8.2.2 วัด Accuracy (ความถูกต้อง)

บอกถึงว่าค่าที่วิเคราะห์ได้ ห่างไปจากค่าที่เป็นจริงเท่าใด ดังนั้นเราจึงจำเป็นต้องมีสารมาตรฐานอ้างอิงที่ทราบความเข้มข้นแล้วนำสารมาตรฐานอ้างอิง นั้นมาวิเคราะห์เปรียบเทียบ อีกวิธีหนึ่งสามารถทำได้คือ การเปรียบเทียบความชันของกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานกับความชันกราฟของตัวอย่างที่ทำ Standard addition method และดูว่าค่าความชันกราฟของเส้นกราฟทั้งสอง ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญหรือไม่

2.8.2.3 Limit of detection

หมายถึงความเข้มข้นต่ำสุดที่เราสามารถวัดสารนั้นได้โดยดูค่าสัญญาณเปรียบเทียบกับสัญญาณรบกวนด้วยความเชื่อมั่นทางสถิติ โดย Limit of detection อาจหมายถึง ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่จะวิเคราะห์โดยที่ระดับความเข้มข้นนี้แยกสัญญาณของสารให้ต่างออกจาก Background ได้

2.8.2.4 Limit of Quantization

คือ ระดับความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่เราสามารถวัดวิเคราะห์สารนั้นได้โดยมีความมั่นใจระดับหนึ่ง ซึ่งแตกต่างจากค่าแบลงค์ และ สามารถรายงานผลได้อย่างถูกต้อง

2.8.2.5 Selectivity

คือ ความสามารถที่จะวัดสารนั้นๆในตัวอย่างอย่างถูกต้อง ในเมื่อตัวอย่างอาจมีส่วนประกอบอื่นรวมอยู่ด้วย ทั้งนี้หมายถึงว่า สารที่เราจะวิเคราะห์จะต้องแยกความแตกต่างออกได้จากสารอื่นๆที่คล้ายกัน หรือสารปนเปื้อนที่มีในตัวอย่าง ซึ่งผู้วิเคราะห์สามารถวิเคราะห์ได้โดยไม่มีการรบกวนจากสารอื่นนั่นเองการทำ Selectivity นั้น อาจทำได้หลายแบบเช่น การวัด resolution (R) ระหว่างสารที่เราวิเคราะห์กับสารปนเปื้อน

2.8.2.6 Range

คือ ช่วงค่าความเข้มข้นต่ำสุด และ สูงสุดของสารที่ได้ Calibrate ไว้โดยบอกเป็นหน่วยของความเข้มข้นสารที่จะวัด

2.8.2.7 Linearity

เป็นการแสดงให้เห็นว่า ช่วงค่าความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์สัมพันธ์เป็นเส้นตรงกับค่าที่ได้จากการวิเคราะห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8.2.8 Ruggedness

คือ ความสามารถของวิธีวิเคราะห์ตัวอย่างภายใต้สภาวะที่ต่างกัน เช่น อุณหภูมิ ความดันบรรยากาศ สารเคมี สภาวะความเป็นกรด-ด่าง (pH) ชนิด และ ความเข้มข้นของตัวทำละลาย ปริมาณตัวอย่าง เวลาที่ใช้กวนสารละลาย เป็นต้น

ในที่นี้จะขอกล่าวถึงวิธีการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ที่เหมาะสมกับวิธีตรวจวัดหาปริมาณคาเทชินที่มีในชาเขียว คือ

1. วัด Precision (ความเที่ยง)

การวิเคราะห์ความเที่ยงเป็นการตรวจสอบความสามารถของกระบวนการวิเคราะห์แยกออกเป็น 2 ส่วน คือ การตรวจสอบความแม่นยำในการเตรียมสาร และความแม่นยำของเครื่องมือวิเคราะห์ในการวัดแบ่งออกเป็น

1.1 วิเคราะห์สารตัวอย่างหรือแบลงค์ต่างๆในช่วงที่สนใจหรือใช้

1.2 วิเคราะห์ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ (ไม่น้อยกว่า 7 ซ้ำ)

1.3 คำนวณค่าความเบี่ยงเบนสัมพัทธ์แต่ละความเข้มข้น

$$RSD = \frac{SD}{\overline{X}} \times 100$$

1.4 ประเมินว่าความแม่นยำนี้ยอมรับได้หรือไม่โดยใช้ F-test หรือ Horwitz equation (Horwitz trumpet) คือ

$$RSD_R = 2^{(1-0.5\log C)}$$

$$RSD_p = 0.66 \times 2^{(1-0.5\log c)}$$

โดย C คือ Concentration ratio

2. วิธีที่วิเคราะห์ได้ผลที่ถูกต้อง (accuracy)

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Accuracy หรือ Trueness) คือ การตรวจสอบความใกล้เคียงของผลการวิเคราะห์กับค่าจริงหรือค่าที่ยอมรับได้ของการวัด

2.1 ปัจจัยที่มีผลต่อความถูกต้อง

2.1.1 Systematic Error คือ ความคลาดเคลื่อนที่ทำให้ข้อมูลแตกต่างจากค่าจริง

หรือค่าที่ยอมรับซึ่งสิ่งที่สังเกตได้คือทุกข้อมูลจะมากหรือน้อยกว่าค่าที่ควรจะเป็นในทิศทางเดียวกันสามารถเกิดได้จาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.1.1 ความคลาดเคลื่อนที่เกิดจากเครื่องมือวัด (Instrumental error)

2.1.1.1.1 เครื่องมือวัดไม่ได้มาตรฐานหรือไม่ได้รับการสอบเทียบ (calibration)

2.1.1.1.2 เครื่องมือวัดถูกใช้ในสภาวะที่ไม่เหมาะสม มีการปนเปื้อนหรือสูญหายจากภาชนะ หรือ มีความไวต่อสภาวะแวดล้อมขณะวัด เช่น อุณหภูมิ ความชื้น พลังงานไฟฟ้า

แก้ไข: ทำการสอบเทียบเครื่องมือวัด

2.1.1.2 ความคลาดเคลื่อนที่เกิดจากวิธีการวัด (Method error)

2.1.1.2.1 ความสมบูรณ์ของปฏิกิริยาและรีเอเจนต์ ความเฉพาะเจาะจงของรีเอเจนต์ ปฏิกิริยาข้างเคียง ความไวของปฏิกิริยา ความคงตัวของสาร

2.1.1.3 ความคลาดเคลื่อนที่เกิดจากผู้วัด (Personal error)

2.1.1.3.1 การตัดสินใจ การดูสี การอ่านค่าตัวเลข bias prejudice

แก้ไข: การฝึกฝน ปรับให้เกิดน้อยที่สุด นอกจากนี้ Systematic Error ยังรวมถึง

ความคลาดเคลื่อนคงที่ ไม่ขึ้นกับขนาดของการวัด (Constant error)

การสูญเสียตะกอนจากการล้างตะกอน (ค่าการละลาย), การเติมรีเอเจนต์ที่มากเกินพอกับการเปลี่ยนสีที่จุดยุติ, การเตรียมกราฟมาตรฐานจะมีผลมากเมื่อขนาดของการวัดมีค่าน้อย

ความคลาดเคลื่อนที่เป็นสัดส่วน ขึ้นกับขนาดของการวัด (Proportional error)

การปนเปื้อน ขึ้นกับปริมาณของสาร

การตรวจสอบ Systematic error (bias)

1. วิเคราะห์แบลงค์
2. วิเคราะห์โดยเปลี่ยนขนาดของตัวอย่าง
3. วิเคราะห์สารอ้างอิงมาตรฐาน (Standard reference material)
4. วิเคราะห์ด้วยวิธีอื่นที่แตกต่างจากวิธีที่ใช้อยู่

2.1.2 ความผิดพลาดแบบสุ่ม (Random Error)

ความคลาดเคลื่อนที่ทำให้ข้อมูลกระจายรอบๆ ค่าเฉลี่ย (+ และ -) ซึ่งส่งผลต่อความแม่น (precision) มีอยู่ในการวัดทุกครั้ง, ไม่สามารถกำจัดมันไปได้, ไม่ทราบว่าเกิดจากไหน, เป็นตัวแปรที่ควบคุมไม่ได้ความผิดพลาดแบบสุ่มในการวิเคราะห์มีการกระจายตัวแบบปกติ และสามารถใช้สถิติในการจัดการ random error

2.1.3 Gross Error

คือ ความคาดเคลื่อนที่ทำให้ข้อมูลผิดปกติไปมาก สิ่งที่สังเกตได้คือ มีข้อมูลที่มากกว่าหรือน้อยกว่ามากๆ หลุดออกจากกลุ่ม (Outlier)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตรวจสอบความถูกต้องวิธีวิเคราะห์

เป็นการวัดความใกล้เคียงระหว่างค่าที่ได้จากการวิเคราะห์และค่าที่มีอยู่จริง ปกติจะใช้ SRM ในการตรวจสอบความถูกต้องของการวิเคราะห์ ในกรณีที่ไม่มี SRM จะใช้วิธีการเติมสารมาตรฐานที่รู้ปริมาณที่แน่นอนลงไปในตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ สามารถทำได้ 2 วิธี

1. การเปรียบเทียบค่า $\overline{X}$ ที่วัดได้กับค่า $\overline{X}$ อ้างอิง (จากCRM หรือ SRM) โดยใช้ t-test คำนวณได้จากสูตร

$$t = \frac{\overline{X} - \mu}{S/\sqrt{N}}$$

2. การเปรียบเทียบค่า $\overline{X}$ ที่วัดได้จากวิธีที่ตรวจสอบการวัดกับค่า $\overline{X}$ ที่วัดจากวิธีมาตรฐาน โดยการทดสอบแบบ t-test ดังสมการต่อไปนี้

$$t = \frac{(\overline{X_1} - \overline{X_2})}{\sqrt{\frac{S_1^2}{n_1} 1 + \frac{S_2^2}{n_2}}}$$

โดยที่ Degree of freedom (df) = $n_1 + n_2 - 2$

3. การหาค่า Recovery หรือการวิเคราะห์ spiked sample ที่ความเข้มข้นต่างๆ ตลอดการใช้งาน

การเตรียม spiked sample ทำได้โดยเติมสารมาตรฐานความเข้มข้นสูงๆ ปริมาณน้อยๆ ลงในตัวอย่างเพื่อตรวจสอบปริมาณสารที่เราวิเคราะห์ที่เราใช้ไปใน sample matrix หรือถ้ามีการวิเคราะห์ตัวอย่างที่มี matrix ที่แตกต่างไป ก็เป็นการทวนสอบปริมาณสารรบกวน นอกจากนี้ยังสามารถเติมสารลงในแบลงค์ของวิธีทดสอบ หรือฟิลด์แบลงค์ เพื่อตรวจสอบสมรรถนะของวิธีวิเคราะห์ทดสอบ สารมาตรฐานที่ใช้ควรมาจากคนละแหล่งกับที่ใช้เตรียมกราฟมาตรฐาน และความเข้มขันเฉลี่ยของ spiked sample ควรอยู่ในช่วงเดียวกับตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์ ทั้งนี้ผู้วิเคราะห์ทดสอบควรแน่ใจว่าสิ่งที่เติมลงไปมีคุณสมบัติทางเคมีเหมือนตัวอย่าง และรวมตัวเป็นเนื้อเดียวกับตัวอย่าง

$$\%\text{Recovery} = \frac{(\text{ความเข้มข้นของ spiked sample} - \text{ความเข้มข้นของสารตัวอย่างเริ่มต้น}) \times 100}{\text{ความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติมลงไป}}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
107807

2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Eisei Nishitani, Yuko M. Sagesaka . ทำการศึกษาโดยการใช้วิธีไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี ในการวิเคราะห์สารในใบชา คือ คาเทชิน 8 ตัว (epigallocatechin gallate, epigallocatechin, epicatechin gallate, epecatechin, gallocatechin gallate, gallocatechin, catechin gallate และ catechin), คาเฟอีน และสารประกอบของฟีนอลิก 8 ตัว (epigallocatechin 3-*O*-(3"-*O*-methyl) gallate, epigallocatechin 3,5-di-*O*-gallate, chlorogenic acid, 3-*O*-caffeoylquinic acid, 4-*O*-*p*-coumaroylquinic acid, 5-*O*-*p*-coumaroylquinic acid, coniferin, 1,4,6-tri-*O*-galloyl-β-D-glucose) โดยใช้ octadecylsilyl column และใช้ระบบ gradient elution เป็น water-methanol-ethyl acetate-phosphoric acid ซึ่งสามารถแยกสารประกอบทั้งหมดได้ภายในเวลา 40 นาที การรับรองการตรวจสอบทำโดยการวัดหาปริมาณคาเทชิน 8 ตัว และคาเฟอีน การตรวจวัดสารประกอบจะมี detection limit อยู่ในช่วง 1.4 – 3.5 mg การวิเคราะห์ที่ให้ linearity ที่ดีนั้นสามารถใช้ได้ถึง 1500 mg และมีความแม่นของการวิเคราะห์อยู่ที่ 96 – 103%การใช้วิธีการนี้ในการวิเคราะห์เราสามารถตรวจวัดสารประกอบฟีนอลิก 16 ตัว และคาเฟอีนได้ในเวลาเดียวกัน การตรวจสอบวิธีการวิเคราะห์เพื่อการหาปริมาณคาเทชิน 7 ตัว ยกเว้น (-)-Cg และคาเฟอีนสามารถตรวจได้ผลที่น่าเชื่อถือ วิธีการนี้เป็นการนำเสนอข้อมูลสมบัติทางเคมีที่แสดงให้เห็นว่า ชามีประโยชน์ต่อสุขภาพ

ภญ.ผศ.ดร.รุ้งตะวัน สุภาพผล และ ภญ.รศ.ดร.วันดี กฤษณเพ็ญธุ์ ทำการศึกษาฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระของชาเขียวไทย และญี่ปุ่น โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูง และใช้ UV detector เป็นตัวตรวจวัด ที่ช่วง 210 นาโนเมตร พิจารณาสาร polyphenol 4 ชนิด คือ EC, ECG, EGC, ECGC พบว่าชาเขียวไทยต่ำชาเขียวญี่ปุ่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ผลการศึกษาในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นหรือสารอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay และ total oxidant activity มีค่าต่ำกว่าชาเขียวญี่ปุ่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) จึงนำไปสู่ข้อสันนิษฐานว่า (1) การบริโภคชาเขียวไทยในลักษณะสารสกัดหยาบด้วยน้ำร้อนน่าจะให้คุณประโยชน์ในการต้านออกซิเดชั่น 4 ชนิดดังที่ได้กล่าวมาแล้ว (2) ชาเขียวไทยน่าจะมีสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นหรือสารอนุมูลอิสระ และควรจะมิใช่สารในกลุ่ม polyphenols 4 ชนิดดังเช่นชาเขียวญี่ปุ่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สารเคมี

1. เมทานอล (methanol ,CH_3OH), A.R. grade บริษัท LAB-SCAN ANALYTICAL SCIENCES
2. 85% กรดฟอสฟอริก (85% phosphoric acid, H_3PO_4)เกรด HPLC บริษัท Fluka
3. สารมาตรฐานคาเทชินไฮเดรต ((+)-catechin hydrate purum; $\geq$ 96.0 %, $C_{15}H_{14}O_6.H_2O$) เกรด HPLC บริษัท Fluka
4. น้ำกลั่นปราศจากไอออน (Deionization)

3.2 สารตัวอย่าง

1. ชาเขียวสำเร็จรูปพร้อมดื่ม4 ยี่ห้อคือ Oishi, Japan Greentea, Namasha, Unif

3.3 เครื่องมือ และอุปกรณ์

1. เครื่องโครมาโทกราฟของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatograph)
   - Pump : รุ่น 515 HPLC pump
   - Detector : รุ่น Water 486 Tunable Absorbance Detector
   - Program : รุ่น Millennium 32 Login
2. อ่างทำความเย็น (cooling bath) รุ่น Heto CBN 28-30
3. เครื่องระเหยแห้งด้วยความเย็น (freeze-drier) รุ่น Heto Lyolab 3000
4. ปั๊มกรอง รุ่น Water Division of MILLIPORE Milford, MA 01757 U.S.A.
5. เครื่องไล่อากาศ รุ่น Cavitator Ultrasonic cleaner
6. อุปกรณ์เครื่องแก้วต่างๆ
7. กระดาษกรอง Whatman 0.45 µm
8. กระดาษวัด pH (Universalindicator) บริษัท Merck

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 วิธีดำเนินการทดลอง

3. 4.1 การเตรียมสารละลาย

3.4.1.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานคาเทชินไฮเดรตเข้มข้น 1000 ppm

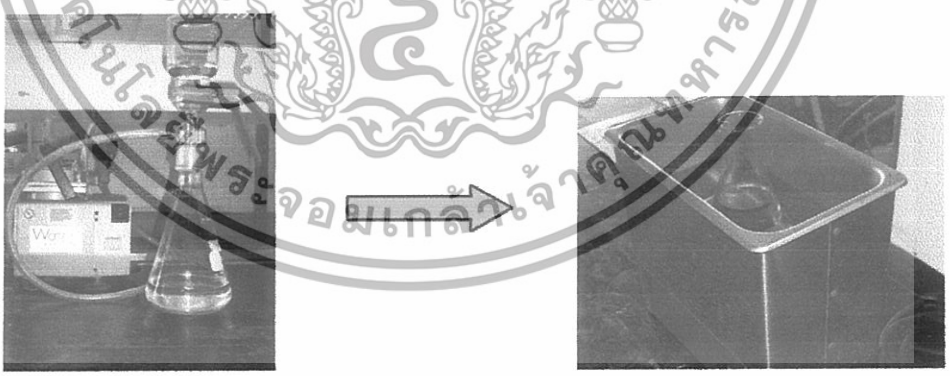
ชั่งสารมาตรฐานคาเทชินไฮเดรต 0.1 กรัม มาปรับปริมาตรด้วยเฟสเคลื่อนที่ที่ประกอบด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน (Deionization): เมทานอล เกรด HPLC: กรดฟอสฟอริกอัตราส่วน 85:15:0.1 ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 mL

3.4.1.2 เตรียมสารละลายมาตรฐานคาเทชินไฮเดรตเข้มข้น 50, 100, 125, 150, 200, 250, 300, 350, 400 ppm

ปิเปตสารละลายมาตรฐานคาเทชินไฮเดรตเข้มข้น 1,000 ppm มา 5, 10, 12.5, 15, 20, 25, 30, 35 และ40mL ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 mL 9 ขวด ตามลำดับ ปรับปริมาตรด้วยเฟสเคลื่อนที่ ให้ถึงขีดบอกปริมาตร

3.4.2 การเตรียมเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase)

นำสารละลาย กรดฟอสฟอริก85% ผสมกับเมทานอลและผสมกับน้ำกลั่นปราศจากไอออน (Deionization) ในอัตราส่วน 85: 15: 0.1 ตามลำดับนำมากรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 µm และนำมาใส่ในเครื่องไล่อากาศ



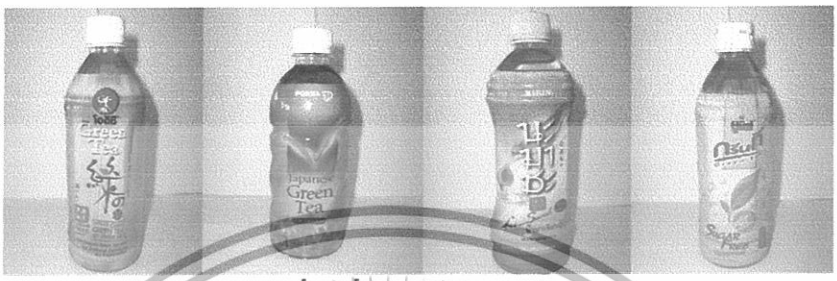
ก ข

รูปที่ 3.1 (ก) เครื่อง Water Division of MILLIPORE Milford
(ข) เครื่อง Cavitator Ultrasonic cleaner สำหรับไล่อากาศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.3 การเตรียมตัวอย่าง

3.4.3.1 นำเครื่องดื่มชาเขียวที่มีจำหน่ายทั่วๆ ไปมา 4 ยี่ห้อคือ Oishi, Japan Greentea, Namasha, Unif ยี่ห้อละ 500 mL



รูปที่ 3.2 ชาเขียวสำเร็จรูปพร้อมดื่ม4 ยี่ห้อคือ Oishi, Japan Greentea, Namasha, Unif

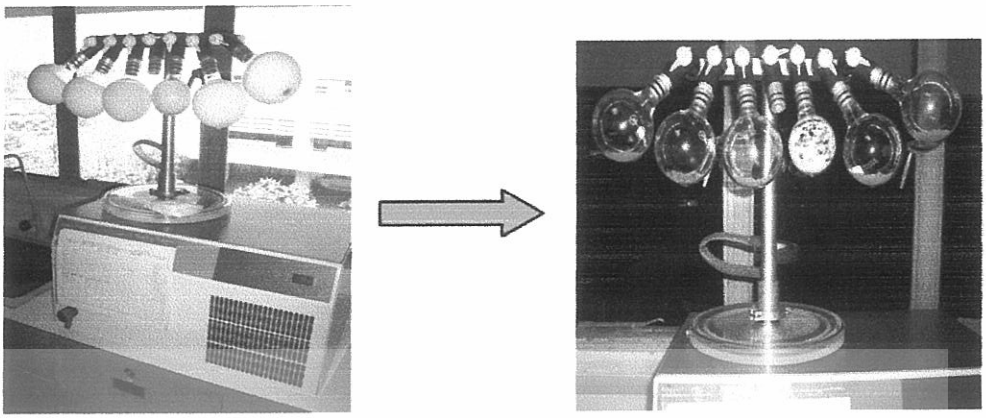
3.4.3.2 ตวงตัวอย่างชาเขียวใส่ขวดก้นกลม 5 ขวด โดยแบ่งขวดละ 100 mL

3.4.3.3 ทำการหมุนขวดด้วยเครื่องหมุนในเครื่องเตรียมแช่เย็นที่มีอุณหภูมิ -47 °C ประมาณขวดละ 20 นาที ชาเขียวจะแข็งติดขวดก้นกลม

รูปที่ 3.3 เครื่องเตรียมแช่แข็ง (cooling bath) อุณหภูมิ -47 °C

3.4.3.4 นำของเหลวที่เป็นตัวอย่างแข็งแล้วนำไปเข้าเครื่องระเหยแห้งด้วยความเย็น (freeze-drier) ที่มีอุณหภูมิ -47 °C ถึง -53 °C เป็นเวลา10-11 ชั่วโมง จะได้ผงของสารตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ก ข

รูปที่ 3.4 (ก) เครื่อง freeze-drier, (ข) รูปสารตัวอย่างเมื่อกลายเป็นผง

3.4.3.5 เตรียม spiked sample

นำสารตัวอย่างแต่ละชนิดมาละลายด้วยเฟสเคลื่อนที่แล้วปิเปตมา 4 mL ใส่ลงในขวดวัดปริมาตร 10 mL แล้วปิเปตสารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น1,000 ppm ด้วยไมโครปิเปตมา 1250 µL จากนั้นปรับปริมาตรจนถึงขีดบอกปริมาตร จะได้สารตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของสารมาตรฐานคาเทชิน 125 ppm

3.4.4 สภาวะเครื่องโครมาโทกราฟชนิดของเหลวสมรรถนะสูง

คอลัมน์ : C18 reverse phase Kingsorb 5 µm C18 (150×4.6 mm) กับ Kingsorb 5 µ C18 (30×4.6 mm) guard column

เฟสเคลื่อนที่ : น้ำกลั่นปราศจากไอออน (Deionization): เมทานอล เกรด HPLC: กรดฟอสฟอริก 85 % อัตราส่วน 85:15:0.1 ตามลำดับ pH = 2

อัตราการไหล : 1.2 mL/min

อุณหภูมิ : 27 องศาเซลเซียส

ตัวตรวจวัด : ยูวี ดีเทคเตอร์ วัดที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.5 การเตรียมกราฟมาตรฐานคาเทชินไฮเดรต

นำสารละลายมาตรฐานคาเทชินไฮเดรตที่เตรียมได้จาก ข้อ 3.3.1.2 แต่ละความเข้มข้นฉีดเข้าเครื่องโครมาโทกราฟของเหลวสมรรถนะสูง พลอตกราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้พีคของคาเทชินไฮเดรตกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานคาเทชินไฮเดรต

3.3.6 การตรวจวัดปริมาณคาเทชินในสารละลายตัวอย่าง

1. นำผงตัวอย่างที่เตรียมได้ในข้อ 3.3.2 มาละลายด้วยเฟสเคลื่อนที่ ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 mL แล้วปรับปริมาตรด้วยเฟสเคลื่อนที่

2. นำสารละลายที่ได้มากรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน จากนั้นฉีดสารละลาย 10 ไมโครลิตร เข้าเครื่องโครมาโทกราฟของเหลวสมรรถนะสูง

3. นำพื้นที่ใต้พีคของคาเทชินไฮเดรตมาเทียบหาความเข้มข้นจากกราฟมาตรฐานคาเทชินไฮเดรตที่เตรียมได้ในข้อ 3.3.4

4. ทำการทดลองซ้ำ 3 ซ้ำ

3.3.7 ประเมินข้อมูลโดยใช้หลักทางสถิติ

ใช้หลักทางสถิติประเมินผลข้อมูลดังนี้

3.3.7.1 การศึกษาความเที่ยง (Precision) ของวิธีวิเคราะห์

การตรวจสอบความเที่ยง (Precision) ของวิธีวิเคราะห์ทำโดยฉีดสารมาตรฐานคาเทชินไฮเดรตแต่ละความเข้มข้นซ้ำ 3 ครั้งแล้วคำนวณค่าเฉลี่ย ($\overline{X}$), คำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD), คำนวณค่าร้อยละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% Relative Standard, RSD)

3.3.7.2 การศึกษาความแม่น (Accuracy) ของวิธีวิเคราะห์

การตรวจสอบทำได้โดยการตรวจวัดปริมาณคาเทชินในตัวอย่างและ spiked sample แล้วนำมาคำนวณหาร้อยละของการคืนกลับ (% recovery)

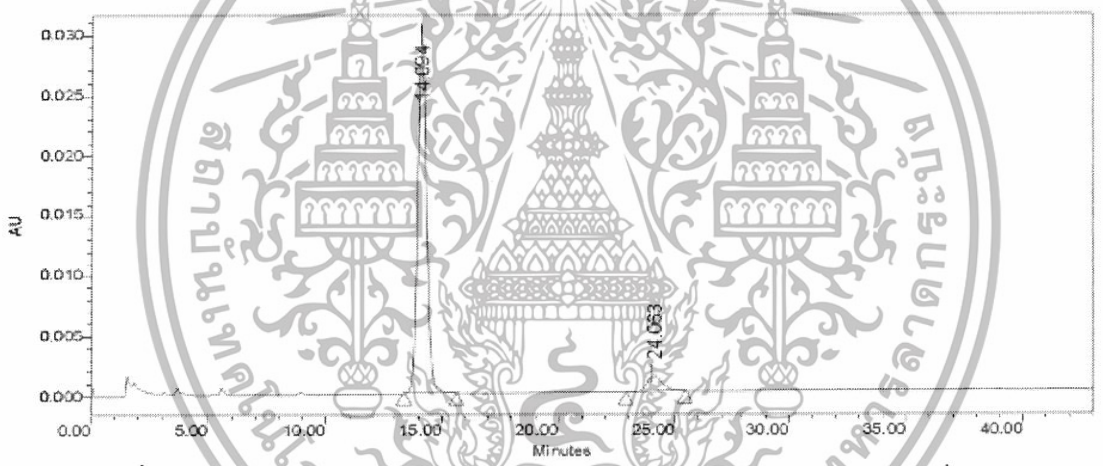
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

จากการวิจัยนี้ได้ผลการทดลองที่พอจะสรุปได้ดังนี้

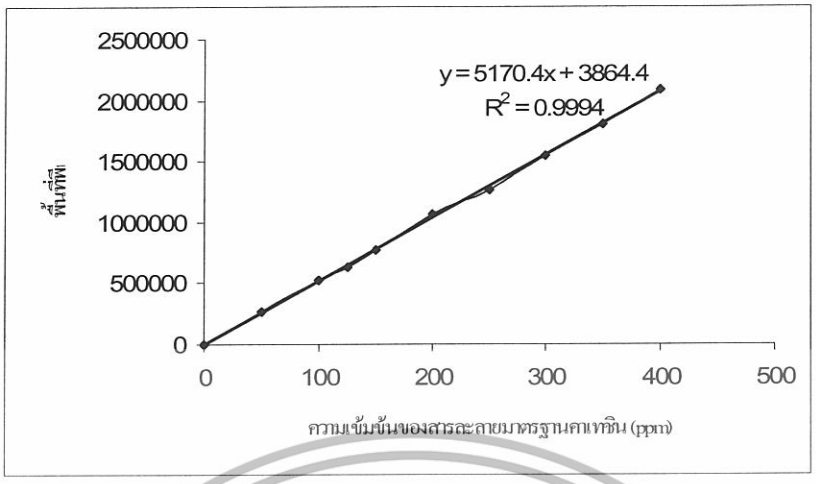
4.1 การเตรียมกราฟมาตรฐานคาเทชิน

กราฟมาตรฐานคาเทชินเตรียมได้จาก การตรวจวัดสารละลายมาตรฐานคาเทชินไฮเดรตที่ความเข้มข้นต่างๆกัน (50, 100, 125, 150, 200, 250, 300, 350, 400 ppm) ด้วยเทคนิค RP-HPLC โดยใช้สภาวะเครื่องโครมาโทกราฟของเหลวสมรรถนะสูงดังแสดงในข้อที่ 3.4.4 โครมาโทแกรมที่ได้มีลักษณะดังรูปที่ 4.1 สารคาเทชินถูกแยกออกที่เวลาประมาณ 14.00 นาที (retention time, t_R) จากนั้นนำค่าพื้นที่พีคของคาเทชินมาพลอตกราฟกับความเข้มข้นของสารละลายคาเทชินได้กราฟมาตรฐานดังแสดงในรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.1 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานคาเทชินเข้มข้น 150 ppm ที่อัตราการไหล 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 กราฟมาตรฐานสารละลายคาเทชิน

สมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานคาเทชินคือ y = 5170.4x + 3864.4 และมีสัมประสิทธิสหพันธ์ (R^2) เท่ากับ 0.9994 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

4.2 การตรวจวัดปริมาณคาเทชินในเครื่องดื่มเขียว 4 ยี่ห้อ

ในงานวิจัยนี้ตรวจวัดหาปริมาณคาเทชินในตัวอย่างเครื่องดื่มชาเขียวด้วยวิธีกราฟมาตรฐานและแต่ละตัวอย่างทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ความเข้มข้นของคาเทชินในเครื่องดื่มชาเขียว 4 ยี่ห้อ (mg)

ยี่ห้อเครื่องดื่มชาเขียว	ความเข้มข้นของคาเทชินเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)	% RSD
โออิชิ(Oishi)	4.3863 ± 0.1920	4.38
ยูนิฟ(Unif)	1.5701 ± 0.1872	11.92
นามาชะ(Namasha)	3.4389 ± 0.2554	7.43
แจแปนกรีนที(Japan Green tea)	3.7892 ± 0.2549	6.72

หมายเหตุ การคำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) แสดงในภาคผนวก ข

ตัวอย่างคำนวณความเข้มข้นย้อนกลับเครื่องดื่มชาเขียวโออิชิ

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$219.32 \times 10 = C_2\,(500)$$

$$C_2 = 4.3863 \text{ mg}$$

หมายเหตุ วิธีการคำนวณความเข้มข้นย้อนกลับข้างต้นนี้นำไปใช้กับทุกตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 การศึกษาความเที่ยง

ในงานวิจัยนี้การตรวจสอบความเที่ยง (Precision) ของวิธีวิเคราะห์ทำโดยฉีดสารมาตรฐานคาเทชินไฮเดรตเข้าเครื่องโครมาโทกราฟของเหลวสมรรถนะสูงแต่ละความเข้มข้นซ้ำ 3 ครั้งได้ข้อมูลดังแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ตารางแสดงค่าเฉลี่ย ($\overline{X}$), ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD), ค่าร้อยละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% Relative Standard, RSD)

ความเข้มข้นของสารมาตรฐานคาเทชินไฮเดรต (ppm)	ค่าพื้นที่พีคซ้ำที่ 1	ค่าพื้นที่พีคซ้ำที่ 2	ค่าพื้นที่พีคซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ยพื้นที่พีค ($\overline{X}$)	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)	% RSD
0	0	0	0	0	0	0
50	273516	269876	278371	273921	4261.96	1.56
100	512160	528921	537279	526120	12637.40	2.40
125	630714	634209	641034	635319	5248.78	0.83
150	788282	776613	768835	777910	9788.16	1.26
200	1054890	1081528	1060217	1065545	14095.62	1.32
250	1310873	1234838	1250045	1265252	40233.94	3.18
300	1538258	1563034	1553124	1551472	17635.72	1.14
350	1806168	1800346	1829456	1811990	21783.93	1.20
400	2091130	2063370	2098070	2084190	18361.51	0.88

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 การตรวจวัดปริมาณคาเทชินใน spiked sample

ในงานวิจัยนี้เตรียม Spiked sample จากเครื่องดื่มชาเขียว 4 ยี่ห้อ นำมาตรวจวัดปริมาณคาเทชินด้วยสภาวะเครื่อง HPLC เช่นเดียวกับข้อ 4.2 และ 4.3 และทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้งได้ข้อมูลดังแสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ความเข้มข้นของคาเทชินใน spiked sample (mg)

ยี่ห้อเครื่องดื่มชาเขียว	ความเข้มข้นคาเทชิน เฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)	% RSD	% recovery
โออิชิ(Oishi)	6.9645 ± 0.3778	5.41	103.13
ยูนิฟ(Unif)	4.4994 ± 0.2437	5.40	117.54
นามาชะ(Namasha)	5.9020 ± 0.6050	10.25	98.53
แจแปนกรีนที (Japan Green tea)	6.9035 ± 0.2835	1.80	124.57

หมายเหตุ การคำนวณ % recovery แสดงไว้ในภาคผนวก จ

จากตารางที่ 4.2 ค่าร้อยละการคืนกลับ (% recovery) อยู่ในช่วง 99-125 % แสดงว่าวิธีตรวจวัดนี้มีความเที่ยงอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

การหาค่า Limit of Detection (LOD)

ยี่ห้อเครื่องดื่มชาเขียว	Limit of Detection
โออิชิ (Oishi)	1.1334
ยูนิฟ (Unif)	0.7311
นามาชะ (Namasha)	1.8150
แจแปนกรีนที (Japan Green tea)	0.8505

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่องโครมาโทกราฟของเหลวสมรรถนะสูงในการตรวจวัดปริมาณคาเทชิน จากการศึกษาพบว่าการใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบเฟสย้อนกลับ (RP-HPLC) ชะด้วยระบบไอโซเครทิก (isocratic) เฟสเคลื่อนเป็นของผสมระหว่างสารละลาย กรดฟอสฟอริก 85%, เมทานอล และน้ำกลั่นปราศจากไอออน (Deionization) ในอัตราส่วน 85: 15: 0.1 ตามลำดับ ด้วยอัตราการไหล 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที โดยมี UV-detector เป็นตัวตรวจวัด ผลพบว่าได้โครมาโทแกรมที่มีความคมชัด โดยคาเทชินมีเวลาการคงไว้ที่ประมาณ 14.00 นาที กราฟมาตรฐานคาเทชินที่ได้มีสมการเส้นตรงคือ $y = 5170.4x + 3864.4$ มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) 0.9994 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

สภาวะที่เหมาะสมของวิธีวิเคราะห์ถูกทดสอบความใช้ได้ด้วยเทอมทางสถิติคือ ค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ 4-12 ร้อยละของการคืนกลับเท่ากับ 99-125 % ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ทั้ง 2 ค่าแสดงว่าการนำวิธี โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบเฟสย้อนกลับ(RP-HPLC) ด้วยสภาวะเครื่องที่ใช้ในงานวิจัยนี้มีความเที่ยงและความแม่นเหมาะสมในการนำมาใช้วิเคราะห์คาเทชิน เมื่อนำมาวิเคราะห์ในตัวอย่างเครื่องดื่มชาเขียวสำเร็จรูป 4 ยี่ห้อพบว่ายี่ห้อ ออิชิมีปริมาณคาเทชินมากที่สุดโดยมีปริมาณคาเทชินเท่ากับ 4.3863 ± 0.1920 ppm รองลงมาคือแจแปนกรีนที (Japan Green tea) เท่ากับ 3.7892 ± 0.2549 ppm, นามาชะ(Namasha) เท่ากับ 3.4389 ± 0.2554 ppm และยูนิฟ(Unif) เท่ากับ 1.5701 ± 0.1872 ppm ตามลำดับ

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. สารมาตรฐานคาเทชินจะมีความไวต่อแสงมากทำให้สารเกิดการสลายตัวได้จึงต้องเตรียมก่อนฉีดทันทีและไม่ทิ้งไว้ข้ามวัน หรือทิ้งให้โดนแสง

2. อุณหภูมิมีผลต่อความหนืดของเฟสเคลื่อนที่โดยต้องทำที่อุณหภูมิคงที่ตลอด

3. เนื่องจาก เครื่อง HPLC มีความไวสูงจึงต้องล้างอุปกรณ์เครื่องแก้วให้สะอาดทุกครั้งเพื่อป้องกันความผิดพลาดจากสารปนเปื้อน

4. ควรใช้อุปกรณ์ที่เหมาะกับสภาวะที่ทำการทดลองและไม่เก็บสารที่ใช้ในการวิเคราะห์เป็นเวลานานเพราะสารเคมีอาจเกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

ประทานพร พิพัฒน์จำเริญกุล. 2547. ชาเขียวน้ำทิพย์แห่งชีวิต, Update, ปีที่ 19, Se-ed print, กรุงเทพฯ, 198: 45-54.

อาภรณ์ ธรรมเขต. 2536. ชาเขียวเครื่องดื่มสุขภาพ, นสพ.กสิกร, ปีที่ 6, เอส.ซี.พี. บุ๊คส์, กรุงเทพฯ, 6: 559-61.

Alshuler, L. 1998. Green tea: Healing tonic. Am J Natur Med, 5: 28-31.

Anderson J. W. New England Journal of Medicine 1995; 333: 276-82.

Bhagwat, S., Beecher, G.R., Haytowitz, D.B., Holden, J.M., Dwyer, J., Peterson, J., Gebhardt, S.E., Eldridge, A.L., Agarwal, S. and Balentine, D.A. 2003. Flavonoid composition of tea: Comparison of black and green teas, Beltsville Human Nutrition Reasearch Center, ARS, USDA, Beltsville.

Brown, M.D. 1999. Green tea (Camellia sinensis), extract and its possible role in the prevention of cancer, 4: 360-370.

Chattopadhyay, P., Besra, S.E., Gomes, A., Das, M., Sur, P., Mitra, S. and Vedasiromoni, J.R. 2004 . Anti-inflammatory activity of tea (Camellia sinensis) root extract, Life Sciences 74, 1839-1849.

Chaudhuri, T., Sur, P., Gomes, A., Das, S.K., Das, M. and Ganguly, D.K. 1997 . Effect of tea root extract (TRE) on solid tumours induced by 3-methylcholanthrene in mice, Phytother. Res., 12: 62-64.

Connor W. E. Circulation 1995; 88: 2771-9.

Conney A. Cancer Research 1994; 54: 3428-35.

Dolby, V. and Mitscher, L.A. 1998. The green tea book: China's fountain of youth, Avery Publishhing Group, New york.

Doná, M., Aica, I.D., Calabrese, F., Benelli, R., Morini, M., Albini, A. and Garbisa, S. 2003. Neutrophil restraint by green tea; Inhibition of inflammation associated angiogenesis, and pulmonary fibrosis, J. Immunol., 170: 4335-4341.

Dulloo, A.G., Duret, C., Rohrer, D., Girardier, L., Mensi, N., Fathi, M., Chantre, P. and Vandermander, J. 1999. Efficacy of a green tea extract rich in catechin polyphenols and

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

caffeine in increasing 24-h energy expenditure and fat oxidation in humans, Am. J. Clin. Nutr., 70: 1040-

Dulloo, A.G., Seydoux, J., Girardier, L., Chantre, P. and Vandermander, J. 2004. Green tea and thermogenesis; Interactions between catechin polyphenols, caffeine and sympathetic activity, International Journal of Obesity, 2: 252-258.

E. Nishitani and Y.M. Sagesaka, Simultaneous determination of catechins, caffeine and other phenolic compounds in tea using new HPLC method. Journal of Food Composition and Analysis 17, 2004. 675 – 685

Folts J. D. Circulation 1995; 91 : 1182-8.

Gao, Y.T., McLaughlin, J.K., Blot, W.J., Ji, B.T., Dai, Q. and Fraumeni, J.F. 1994. Reduced risk of esophageal cancer associated with green tea consumption, J. Natl. Cancer. Inst., 86: 855-8.

Graham, H.N. 1992 . Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry, Prev Med, 21: 334-350.

Hamilton-miller, J.M.T. 1995. Minireview; Antimicrobial properties of tea (Camellia sinensis L.), Antimicrobial Agent and Chemotherapy, 39: 2375-2377.

Hartog M. and Feskens E. The Lancet 1993; 342: 1007-11.

Imai, A. and Nakachi, K. 1995. Cross sectional study of drinking greetea on cardiovascular and liver diseases, BMJ., 310: 693-6.

Imai K. and Nakachi K. British Medical Journal 1995; 310: 693-6.

Jellin, J.M., Batz, F. and Hitchens, K. 1999. Pharmacisst's letter/prescriber's leeter natural medicinal comphrehensive database, Therapeutic Research Faculty, Stocton: 412-14.

Kaegi, E. 1998. Unconventional therapies for cancer; green tea. The task force on alternative therapies of the Canadian breast cancer research initiative, CMAJ., 158: 1033-5.

Kuo, P.L. and Lin, C.C. 2003. Green tea constituent (-) – epigallocatechin-3-gallate inhibits Hep G2 cell proliferation and induces apoptosis through p35-dependent and Fas-mediated pathways, J. Biomed. Sci., 10: 219-227.

Lavy A. Annals of Nutrition and Metabolism 1994; 38 : 287-94.

Lieberman, S. 2004. Weight loss; A lifestyle plane, http://www.vrp.com/newsletters/vitaminresearchnews/819102.html, Access 22/9/2004.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

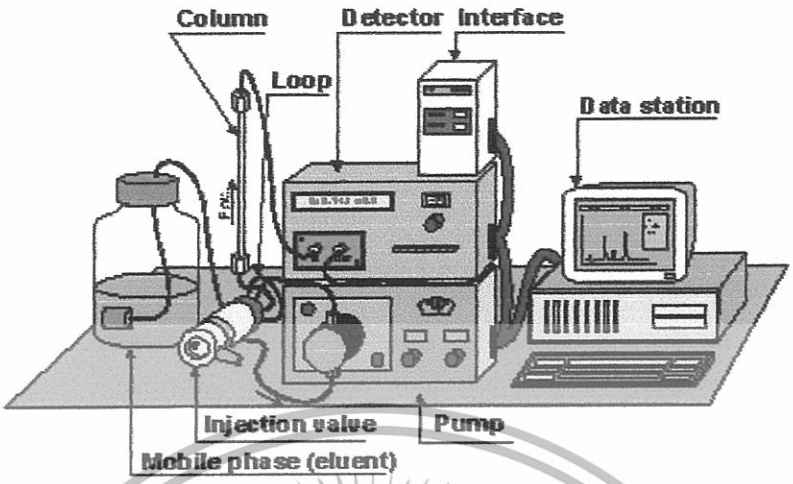
ภาคผนวก ก

หลักการของโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

เทคนิค HPLC มี เฟสเคลื่อนที่(mobile phase) ที่เป็นของเหลวจะถูกปั๊มผ่านคอลัมน์แยกสารที่เป็นท่อบรรจุด้วยอนุภาคของแข็งซึ่งทำหน้าที่เป็นเฟสอยู่กับที่ (stationary phase) เมื่อตัวอย่างซึ่งเป็นองค์ประกอบหลายชนิดละลายอยู่ในรูปของเหลว ถูกนำเข้าสู่ระบบปกติโดยการฉีดด้วยปริมาตรจำกัดที่จุดฉีด (injector) ก่อนเข้าสู่คอลัมน์ และแพร่กระจายเข้าสู่ระบบการไหล หน้าที่ของ เฟสเคลื่อนที่คือล้างตัวอย่างในขณะไหลผ่านคอลัมน์ ทำให้เกิดการแยกองค์ประกอบแต่ละชนิดออกจากกัน อันเนื่องมาจากความแตกต่างของแรงที่เกิดเนื่องด้วยอันตรกิริยาขององค์ประกอบกับ เฟสอยู่กับที่ และ เฟสเคลื่อนที่แต่ละองค์ประกอบจะใช้เวลาตั้งแต่เริ่มฉีด จนกระทั่งออกจากปลายคอลัมน์ ซึ่งเป็นเวลาส่วนใหญ่ของการเดินทาง เป็นช่วงเวลาที่เป็นคุณสมบัติเฉพาะตัว (characteristic time) ของแต่ละสาร แต่อย่างไรก็ตามต้องระมัดระวังว่าภายใต้สภาวะแวดล้อมของการแยกนั้น สารบางชนิดที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกัน อาจจะใช้เวลาแยกใกล้เคียงกันจนเกิดการทับซ้อนกันได้ กฎโดยทั่วไปที่เกี่ยวข้องกับการแยกคือ องค์ประกอบใดที่สามารถเกิดอันตรกิริยาหรือสามารถกระจายตัวอยู่ในชั้นของ เฟสอยู่กับที่ได้ดีกว่าก็จะใช้เวลาอยู่ในคอลัมน์ได้นานกว่าและในทางตรงกันข้าม สารใดที่มีอันตรกิริยา หรือสามารถกระจายตัวอยู่ในชั้นของเฟสเคลื่อนที่ได้ดีกว่า ก็จะถูกชะ (elute) ออกจากคอลัมน์ได้เร็วกว่า หรือใช้เวลาในคอลัมน์น้อยนั่นเอง

รูปที่ ก-1 เครื่องโครมาโทกราฟของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ก-2 ส่วนประกอบของเครื่องโครมาโทกราฟของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

ส่วนประกอบของเครื่อง HPLC ที่สำคัญมีดังนี้

1. ภาชนะที่บรรจุเฟสเคลื่อนที่)mobile phase reservoir) เป็นขวดสำหรับใส่ตัวทำละลายที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่
2. ระบบปั๊ม (pump system) ใน HPLC มีความต้านทานการไหลของเฟสเคลื่อนที่ที่จะไหลผ่านคอลัมน์ซึ่งมีอนุภาคขนาดเล็กบรรจุอยู่ ความต้านทานการไหลที่ว่านี้จะมากเมื่อใช้อนุภาคเล็ก ๆ และคอลัมน์มีขนาดเล็กอีกด้วย จึงจำเป็นที่จะต้องใช้ความดันที่สูงดันเฟสเคลื่อนที่ให้ไหลไป
3. คอลัมน์ (column) เป็นส่วนประกอบที่มีราคาน้อยที่สุด แต่ถือว่าเป็นหัวใจของระบบ คอลัมน์ HPLC โดยทั่วไปมีความยาว 25– 30 ซม .ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 4– 5 มม .และบรรจุขนาดอนุภาคน้อยลง ทั้งนี้เนื่องจากความสามารถผลิตสารบรรจุที่มีขนาดเล็กลงมา 5-3) ไมโครเมตร (และใช้เทคนิคการบรรจุสารที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้น ทำให้ประสิทธิภาพในการแยกต่อหน่วยความยาวคอลัมน์ดีขึ้น
4. เครื่องตรวจวัด (Detector) เครื่องตรวจวัดที่ได้นำมาใช้มากที่สุดใน HPLC ได้แก่ Ultraviolet Absorbance) UV) และ Refractive Index (RI) เครื่องตรวจวัดชนิด UV มีประโยชน์สำหรับการวิเคราะห์สารอินทรีย์เป็นส่วนใหญ่ เครื่องตรวจวัดชนิดนี้มีทั้งความยาวคลื่นเดียว (มักใช้ที่ 254nm Mercury arc lamp) และแบบที่เปลี่ยนความยาวคลื่นได้ (variable wavelength) ในช่วง 600-190nm การดูดกลืนแสงนี้เป็นคุณสมบัติของโมเลกุล ดังนั้นแต่ละสารประกอบจึงมีการดูดกลืนแสงที่จำเพาะของตัวเอง เครื่องตรวจวัดชนิด UV จัดเป็นชนิดที่มีความไวสูง สามารถตรวจวัดสารมากประเภทในปริมาณต่ำถึงระดับนาโนกรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. ส่วนประมวลผลข้อมูล (Data System) ส่วนที่แปลงสัญญาณ analog เป็น digital
6. ส่วนที่ทิ้งของเสีย (Waste)

เครื่องวัดสัญญาณแบบอัลตราไวโอเลตและวิสิเบิล (UV and Visible Light Detector)

ตัววัดสัญญาณที่ใช้กันอย่างกว้างขวาง มีความไวต่อการตอบสนองสูง มีช่วงเส้นตรงกว้าง (a wide linear range) ความแปรปรวนของอุณหภูมิ (temperature fluctuations) ไม่มีผลต่อการตอบสนองและเหมาะกับการทำเกรเดียนอีลูชัน การตอบสนองอาศัยหลักการดูดกลืนแสงในช่วงอัลตราไวโอเลต หรือช่วงวิสิเบิล สารที่ดูดกลืนคลื่นแสงอัลตราไวโอเลตส่วนมากจะเป็นพวกที่มีอิเล็กตรอนที่พันธะไพ (¶-bonding electrons) และพวกที่มีอิเล็กตรอนไม่ได้ร่วมพันธะ)unshared electron (เช่นโอลิฟิน)olefin,(สารประกอบอะโรมาติก)aromatic pounds (และสารประกอบที่มี C=O , C=S , -N=O และ -N=N- อยู่โมเลกุล สำหรับเฟสเลื่อนที่นั้นไม่ควรจะดูดกลืนแสงหรือดูดกลืนแสงน้อยที่ความยาวคลื่นที่เลือกใช้ในการวิเคราะห์สารตัวอย่าง

การดูดกลืนแสงของสารที่ความยาวคลื่นหนึ่งจะเป็นฟังก์ชันกับความเข้มข้น(C) ตามกฎของแลมเบิร์ทและเบียร์(The Lambert – Beer Law) :

$$A = \varepsilon bC$$

A เป็นแอบซอร์แบนซ์

b เป็นความหนาของเซลล์ที่บรรจุสาร

C เป็นความเข้นข้นของสาร (mol/L)

ε เป็น molar absorptivity (dm^3 / mol –cm)

ตามสมการของเบียร์-แลมเบิร์ท จะได้ว่า ความสูงของพีคจะเป็นฟังก์ชันกับ Molar absorptivity และความเข้มข้นของสารที่ผ่านเซลล์ที่บรรจุสาร หน่วยของ Absorption Unit (AU) โดยนิยามเป็น 1 a.u.f.s. หรือ 1 Absorption full scale หมายความว่า การบันทึกค่าแอบซอร์แบนซ์ได้เท่ากับหนึ่งที่พอดีกับเครื่องบันทึกสัญญาณอ่านได้เต็มสเกล (an absorbance of 1 at full scale deflection) ตัววัดสัญญาณแบบ UV / visible ที่ใช้อยู่ในเครื่อง HPLC จะมี 2แบบ คือแบบที่ตึงความยาวคลื่น (fixed wavelength) และแบบที่ปรับความยาวคลื่นได้ (variable wavelength)

1. แบบตรึงความยาวคลื่น (fixed wavelength) คือแบบตรึงความยาวคลื่นไว้ที่ 254และ 280nm ซึ่งเป็นความยาวคลื่นมากสุดที่ วงแหวนเบนซิน (benzing ring) ดูดกลืนแสงไว้ ดังนั้นสารประกอบอะโรมาติกจะดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 254nm อย่างเห็นได้ชัด และที่ความยาวคลื่น 254และ 280nm นี้เป็นความยาวคลื่นแสงที่ไอปรอทคายออกมา จึงใช้หลอดไอของปรอท (mercury vapour lamps) เป็นแหล่งกำเนิดคลื่นแสงดังกล่าวข้อเสียของตัววัดสัญญาณชนิดนี้ ก็คือ มีสารตัวอย่างบางชนิดที่จะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิเคราะห์ไม่ดูดกลืนแสงที่ 254และ 280nm และเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้จะต้องไม่ดูดกลืนแสงที่ 254และ 280 nm ด้วย

2. แบบที่ปรับความยาวคลื่น(Variable wavelength) จะใช้หลอดดิวทิเรียม (deuterium lamps) หรือ หลอดที่ใช้ไส้ทังสเตน (tungsten filament lamps) เป็นแหล่งกำเนิดคลื่นแสงที่สามารถปรับค่าความยาวคลื่นได้ตั้งแต่ 190– 700 nm

ตารางแสดง ตัววัดสัญญาณที่ปรับความยาวคลื่นได้

	แหล่งกำเนิดคลื่นแสง	ช่วงความยาวคลื่น(nm)
Phillips 4025	Deuterium lamp	190 – 380
Uvikon 735	Tungsten lamp	190 – 600
	Deuterium lamp	190 – 350

เมื่อใช้ตัววัดสัญญาณชนิดวัดหนึ่งแสงอัลตราไวโอเลต สิ่งสำคัญที่จะต้องพิจารณาคือ สภาพไว (sensitivity) จะต้องให้มีค่าสูงสุด อัตราส่วนสัญญาณต่อสัญญาณรบกวน (signal-to-noise) หรือความสูงของพีคต่อ baseline มีค่าสูง นั้นก็คือจะต้องเลือกเฟสเคลื่อนที่ให้เหมาะสมโดยไม่เลือกเฟสเคลื่อนที่ที่สามารถดูดกลืนแสงตรงความยาวคลื่นที่ใช้เลือกในการวิเคราะห์สารตัวอย่าง

โดยทั่ว ๆ ไปแล้วช่วงการดูดกลืนแสงของเฟสเคลื่อนที่จะต่ำกว่าความยาวคลื่น 230nm ปัจจัยที่มีผลต่อการดูดกลืนแสงของเฟสเคลื่อนที่คือ

- ความเข้มข้นขององค์ประกอบในเฟสเคลื่อนที่
- pH
- แก๊สที่อยู่ในเฟสเคลื่อนที่

สิ่งที่ต้องพิจารณาคือค่า UV cut-off point ของเฟสเคลื่อนที่ซึ่งเป็นค่าของความยาวคลื่นที่เฟสเคลื่อนที่มีการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1หน่วยของค่าแอบซอร์แบนซ์ ดังนั้น ควรเลือกเฟสเคลื่อนที่ที่มี UV cut-off point ต่ำกว่าความยาวคลื่นที่เลือกใช้ในการวิเคราะห์สารตัวอย่าง ถ้าเฟสเคลื่อนที่สามารถดูดกลืนแสงตรงกับช่วงความยาวคลื่นที่ใช้วิเคราะห์สารจะมีผลทำให้ baseline มีการรบกวน (baseline noise) มาก จะเกิด background absorbance สูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

วิธีการคำนวณค่าสารคาเทชินในตัวอย่างชาเขียวสำเร็จรูปพร้อมดื่ม

หาได้จากสูตร

$$y = 5123.1x + 7208.4$$

y = พื้นที่พีค x = ความเข้มข้น

การหาค่าเฉลี่ยของผลการทดลอง

หาได้จากสูตร

$$\overline{X} = \sum_{i=1}^{n} \frac{x_i}{n}$$

การหาส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ของผลการทดลอง

หาได้จากสูตร

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(x_i - \overline{x})^2}{n-1}}$$

การหาค่า Recovery หรือการวิเคราะห์ spiked sample

หาได้จากสูตร

$$\% \text{ Recovery} = \frac{(\text{ความเข้มข้นของ spiked sample} - \text{ความเข้มข้นของสารตัวอย่างเริ่มต้น})}{\text{ความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติมลงไป}}$$

การหาความเที่ยง

หาได้จากสูตร

$$\%RSD = \frac{SD \times 100}{\overline{X}}$$

SD = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

$\overline{X}$ = ค่าเฉลี่ย

การหาค่า Limit of Detection (LOD)

หาได้จากสูตร

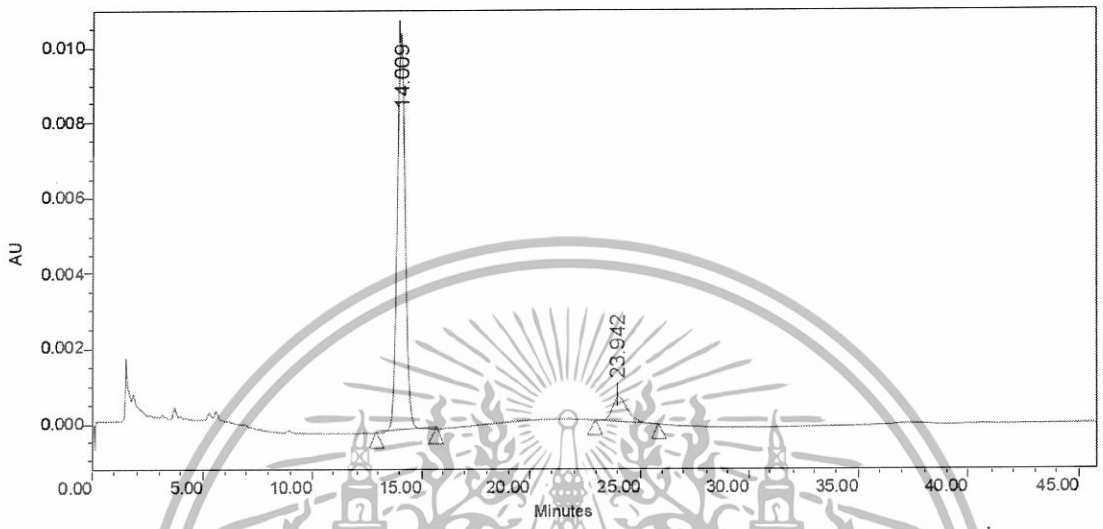
LOD = 3SD

SD = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

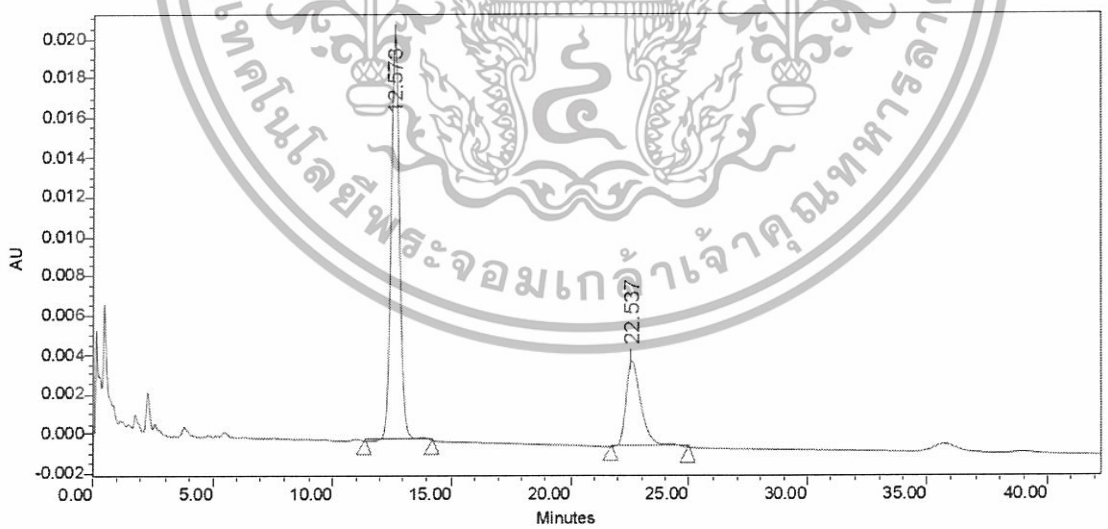
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

กราฟโครมาโทแกรมสารมาตรฐานคาเทชิน

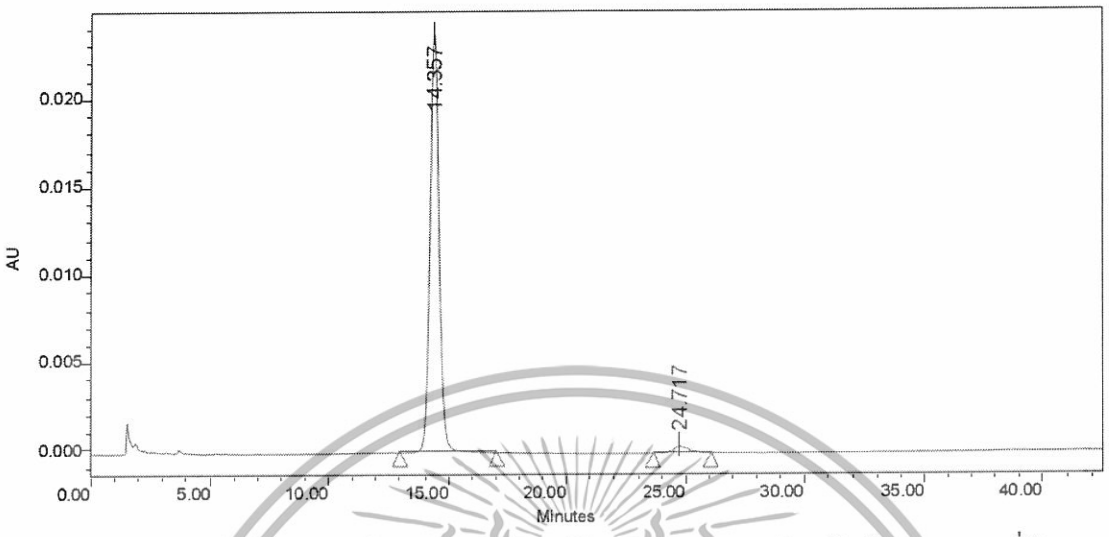


รูป ค-1 กราฟโครมาโทแกรมสารมาตรฐานคาเทชินความเข้มข้น 50 ppm ที่อัตราการไหล 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที

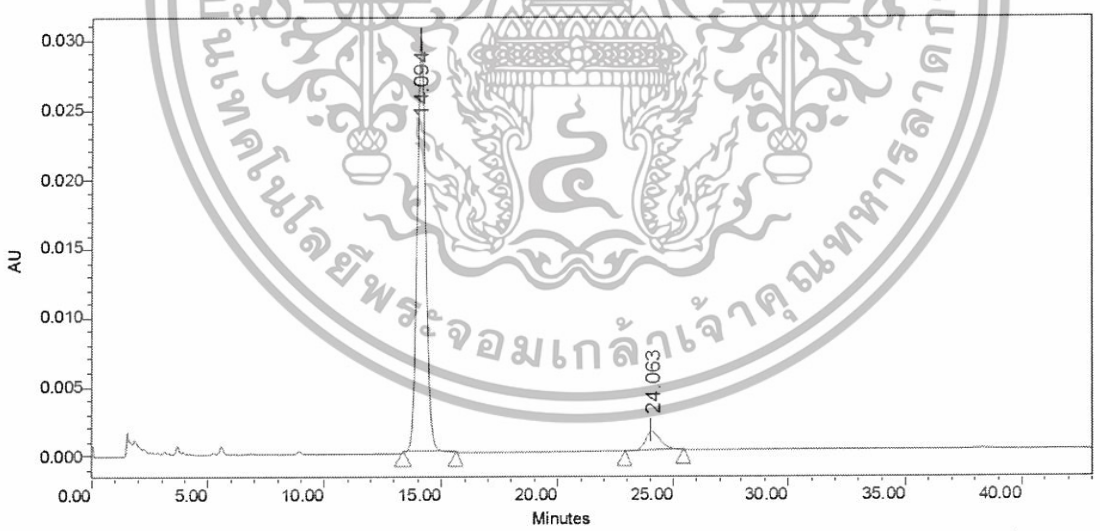


รูป ค-2 กราฟโครมาโทแกรมสารมาตรฐานคาเทชินความเข้มข้น 100 ppm ที่อัตราการไหล 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

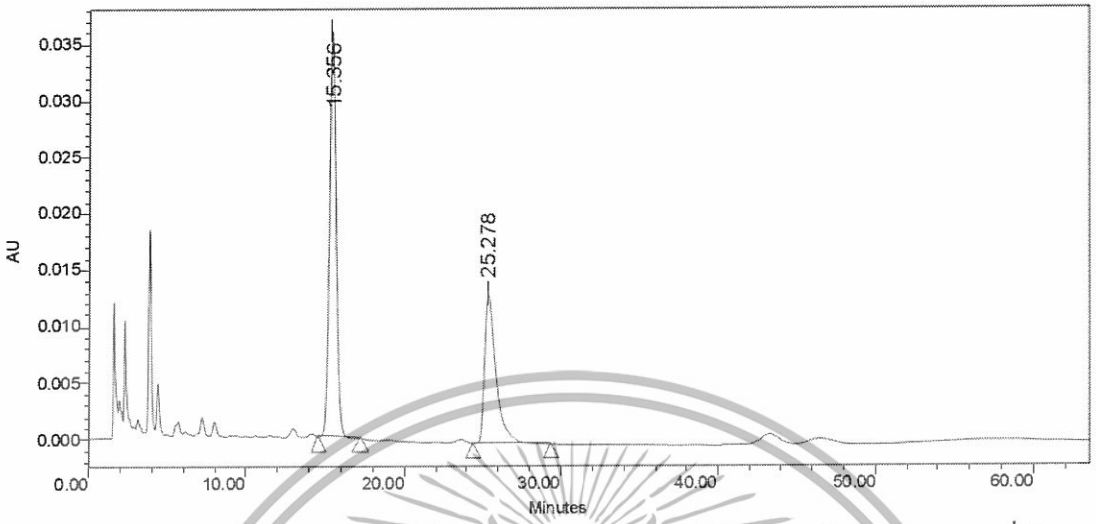


รูป ค-3 กราฟโครมาโทแกรมสารมาตรฐานคาเทชินความเข้มข้น 125 ppm ที่อัตราการไหล 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที

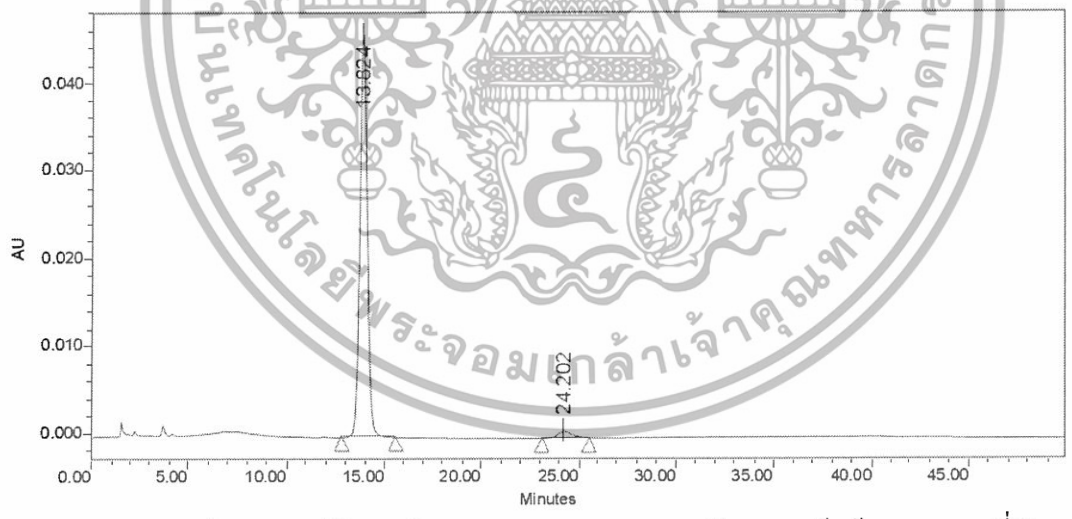


รูป ค-4 กราฟโครมาโทแกรมสารมาตรฐานคาเทชินความเข้มข้น 150 ppm ที่อัตราการไหล 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

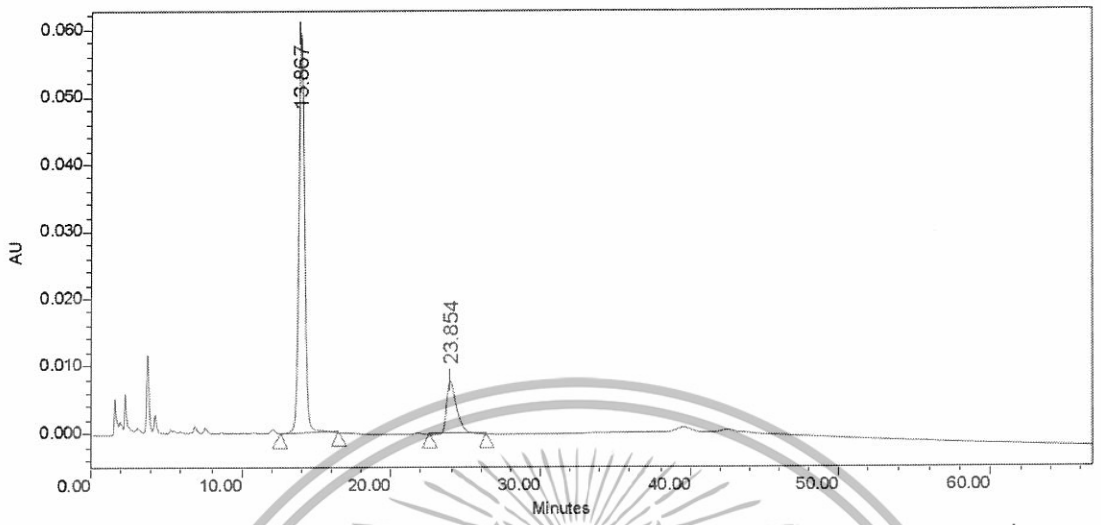


รูป ค-5 กราฟโครมาโทแกรมสารมาตรฐานคาเทชินความเข้มข้น 200 ppm ที่อัตราการไหล 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที

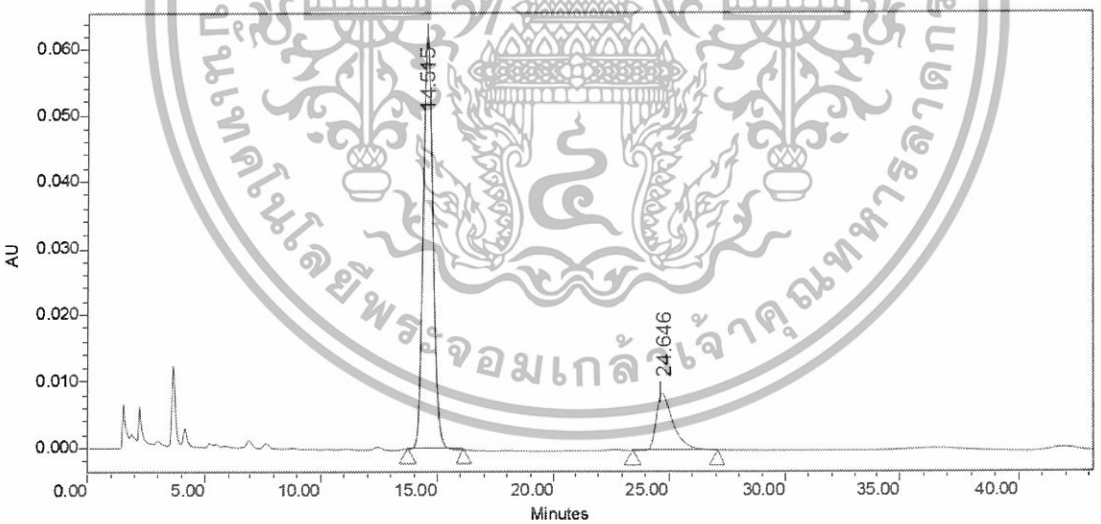


รูป ค-6 กราฟโครมาโทแกรมสารมาตรฐานคาเทชินความเข้มข้น 250 ppm ที่อัตราการไหล 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

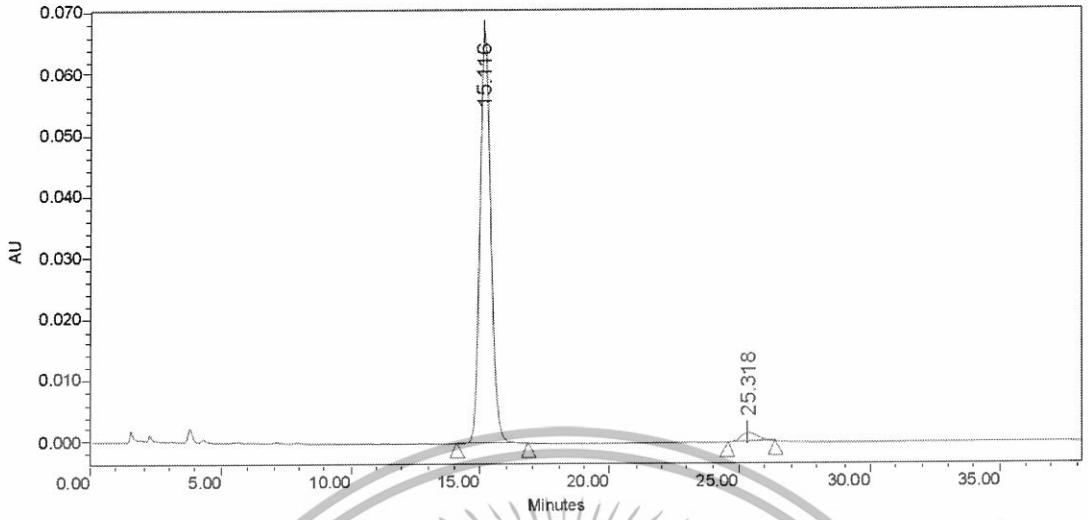


รูป ค-7 กราฟโครมาโทแกรมสารมาตรฐานคาเทชินความเข้มข้น 300 ppm ที่อัตราการไหล 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที



รูป ค-8 กราฟโครมาโทแกรมสารมาตรฐานคาเทชินความเข้มข้น 350 ppm ที่อัตราการไหล 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูป ค-9 กราฟโครมาโทแกรมสารมาตรฐานคาเทชินความเข้มข้น 400 ppm ที่อัตราการไหล 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที

ตาราง ค-1 ค่าพื้นที่พีคแต่ละค่าความเข้มข้นต่างๆของสารมาตรฐาน

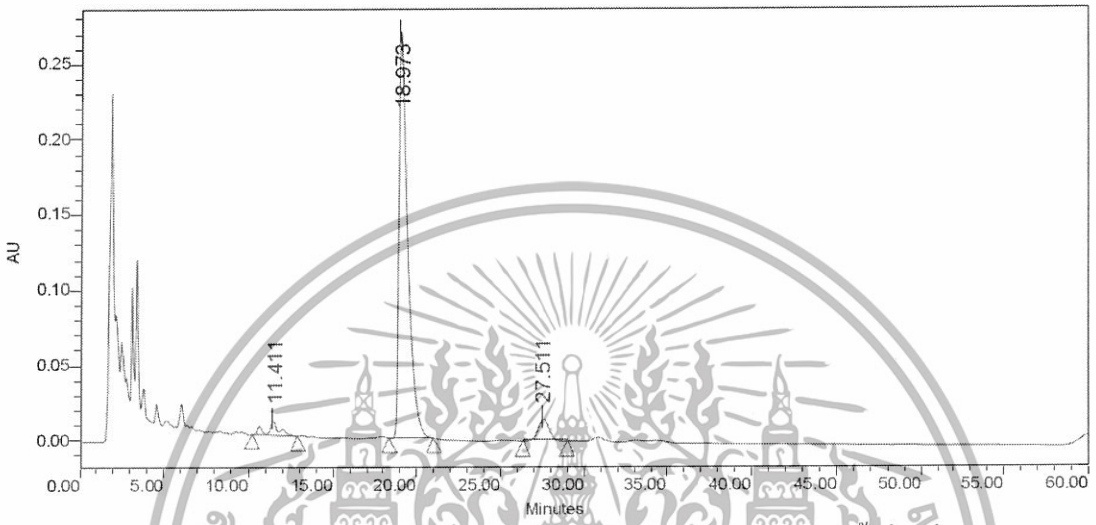
ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน คาเทชินไฮเดรต (ppm)	ค่าพื้นที่พีคซ้ำที่ 1	ค่าพื้นที่พีคซ้ำที่ 2	ค่าพื้นที่พีคซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ยพื้นที่พีค $(\overline{X})$	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)
0	0	0	0	0	0
50	273516	269876	278371	273921	4261.96
100	512160	528921	537279	526120	12637.40
125	630714	634209	641034	635319	5248.78
150	788282	776613	768835	777910	9788.16
200	1054890	1081528	1060217	1065545	14095.62
250	1310873	1234838	1250045	1265252	40233.94
300	1538258	1563034	1553124	1551472	17635.72
350	1806168	1800346	1829456	1811990	21783.93
400	2091130	2063370	2098070	2084190	18361.51

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

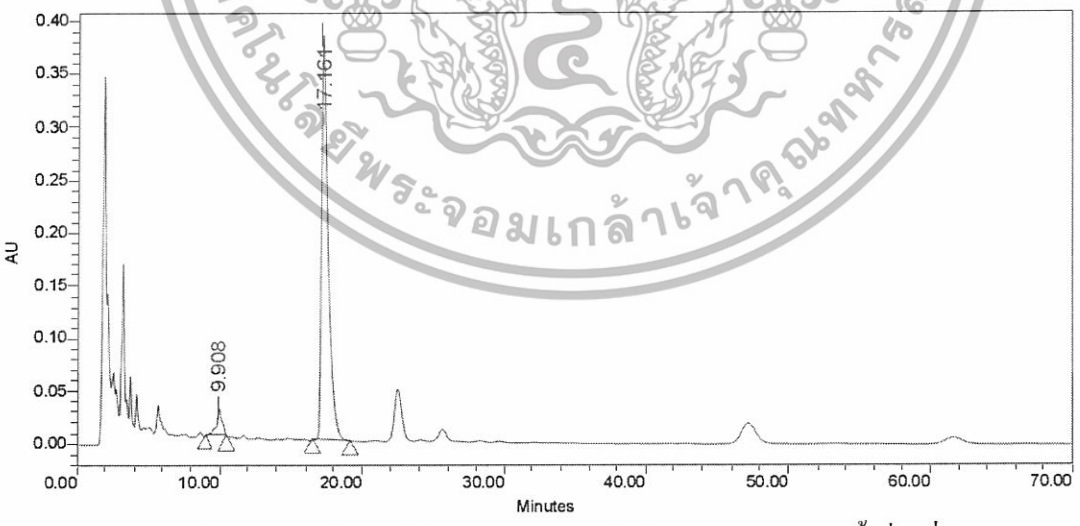
ภาคผนวก ง

กราฟความเข้มข้นสารคาเทชินในชาเขียวพร้อมดื่ม 4 ยี่ห้อ และคำนวณค่า $\overline{X}$, SD, %RSD

1. กราฟความเข้มข้นสารคาเทชินในชาเขียวนามาชะ 3 ซ้ำ

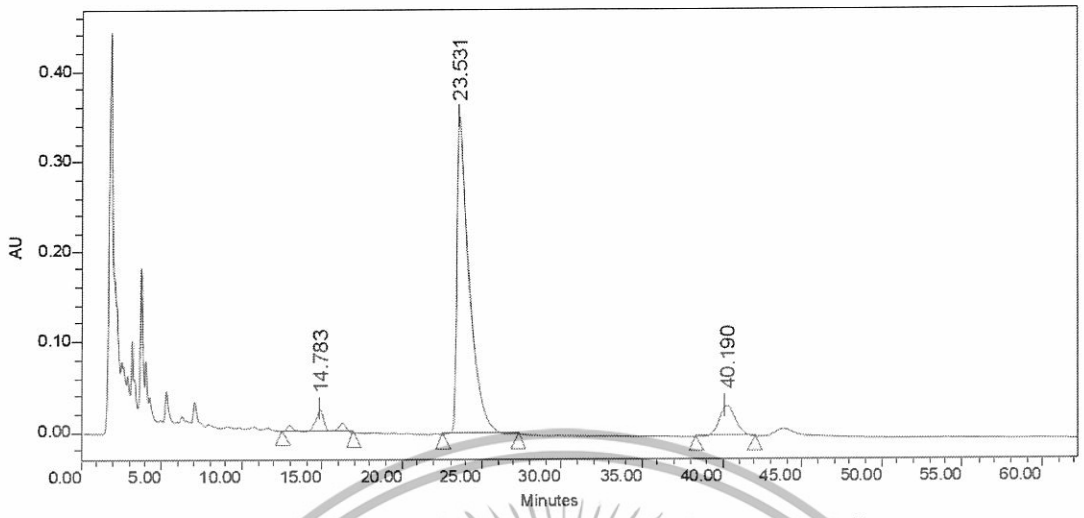


รูป ง -1 กราฟโครมาโทแกรมสารคาเทชินในชาเขียวนามาชะซ้ำที่ 1 ที่อัตราการไหล 1.2 มิลลิลิตรต่อ นาที



รูป ง -2 กราฟโครมาโทแกรมสารคาเทชินในชาเขียวนามาชะซ้ำที่ 2 ที่อัตราการไหล 1.2 มิลลิลิตรต่อ นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูป ง -3 กราฟโครมาโทแกรมสารคาเทชินในชาเขียวนามาชะซ้ำที่ 3 ที่อัตราการไหล 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที

ตาราง ง -1 ความเข้มข้นสารคาเทชินที่มีในชาเขียวนามาชะ (mg)

ชาเขียวยี่ห้อนามาชะ	ค่าความเข้มข้นสารคาเทชินที่มีในชาเขียวนามาชะซ้ำที่ 1	ค่าความเข้มข้นสารคาเทชินที่มีในชาเขียวนามาชะซ้ำที่ 2	ค่าความเข้มข้นสารคาเทชินที่มีในชาเขียวนามาชะซ้ำที่ 3
	3.1758	3.4550	3.6858

$$\overline{X} = \frac{3.1758 + 3.4550 + 3.6858}{3}$$

$$= 3.4389 \text{ mg}$$

$$SD = \sqrt{\frac{0.0692 + 0.0003 + 0.0610}{2}}$$

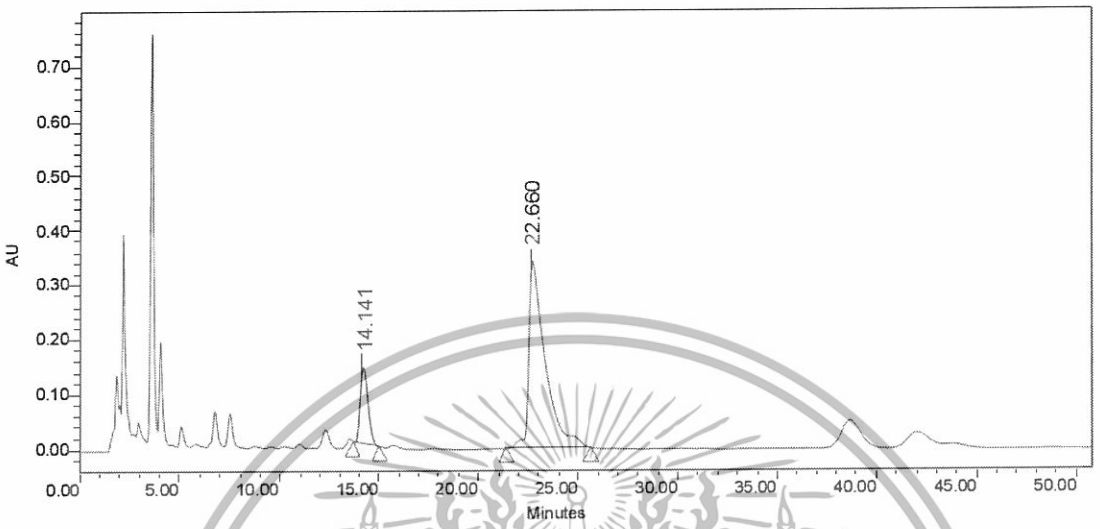
$$= 0.2554$$

$$\%RSD = \frac{0.2554}{3.4389} x100$$

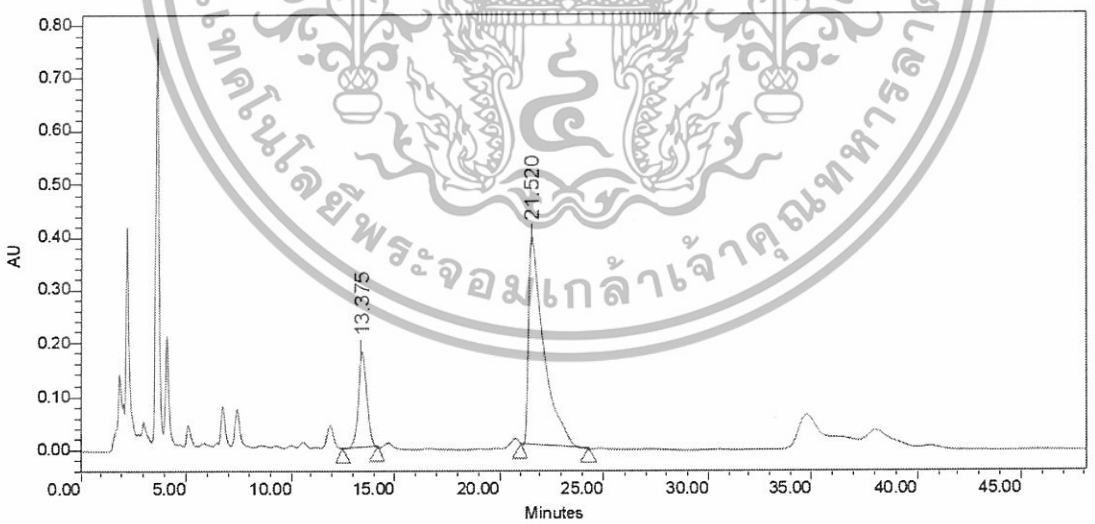
$$= 7.4300$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. กราฟความเข้มข้นสารคาเทชินในชาเขียวโออิชิ 3 ซ้ำ

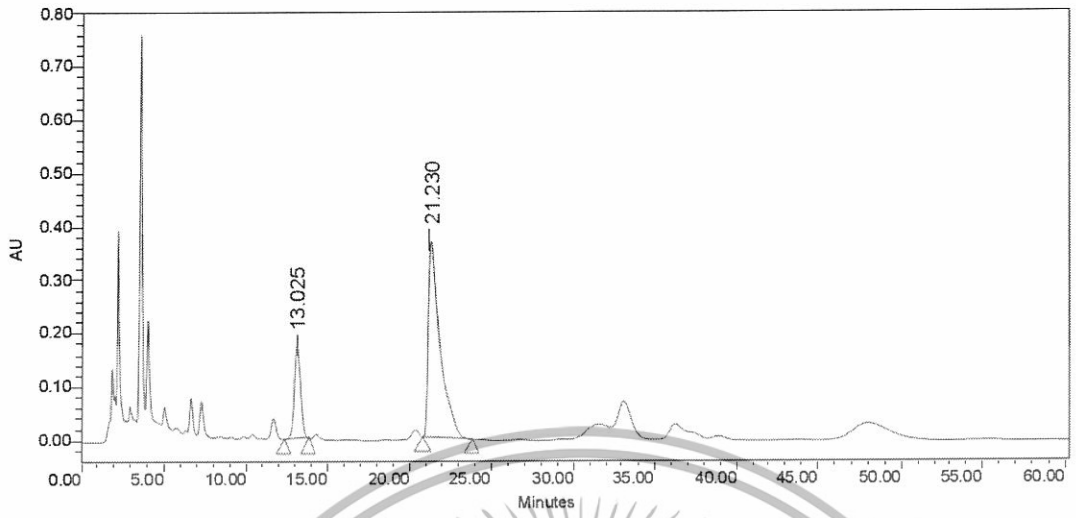


รูป ง -4 กราฟโครมาโทแกรมสารคาเทชินในชาเขียวโออิชิซ้ำที่ 1 ที่อัตราการไหล 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที



รูป ง -5 กราฟโครมาโทแกรมสารคาเทชินในชาเขียวโออิชิซ้ำที่ 2 ที่อัตราการไหล 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูป ง -6 กราฟโครมาโทแกรมสารคาเทชินในชาเขียวโออิชิซ้ำที่ 3 ที่อัตราการไหล 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที

ตาราง ง -2 ความเข้มข้นสารคาเทชินที่มีในชาเขียวโออิชิ (mg)

ชาเขียวยี่ห้อโออิชิ	ค่าความเข้มข้นสารคาเทชินที่มีในชาเขียวโออิชิซ้ำที่ 1	ค่าความเข้มข้นสารคาเทชินที่มีในชาเขียวโออิชิซ้ำที่ 2	ค่าความเข้มข้นสารคาเทชินที่มีในชาเขียวโออิชิซ้ำที่ 3
	4.1926	4.5766	4.3898

$$\overline{X} = \frac{4.1926 + 4.5766 + 4.3898}{3}$$

$$= 4.3863 \text{ mg}$$

$$SD = \sqrt{\frac{0.0375 + 0.0362 + 0.0000}{2}}$$

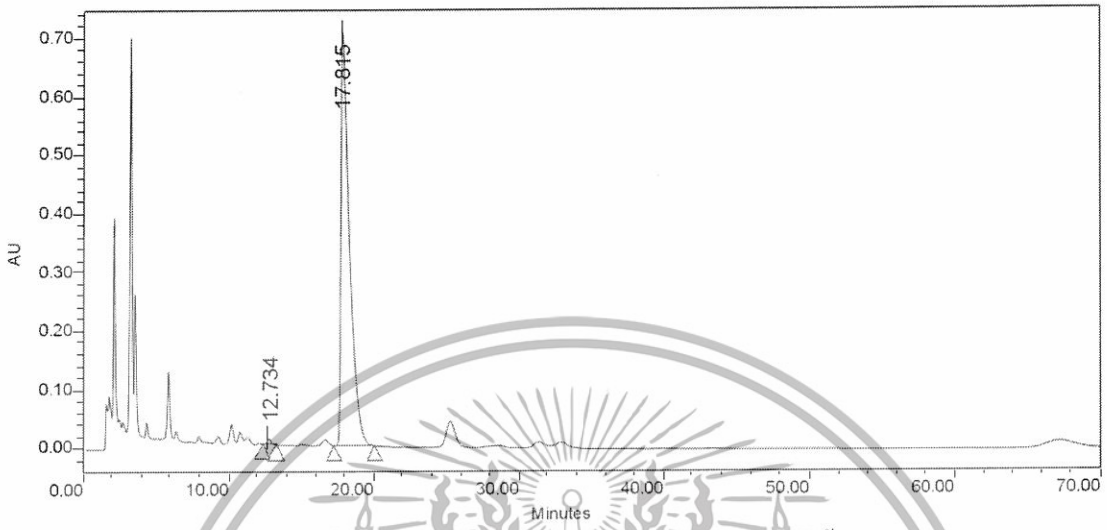
$$= 0.1920$$

$$\%RSD = \frac{0.1920}{4.3863} x100$$

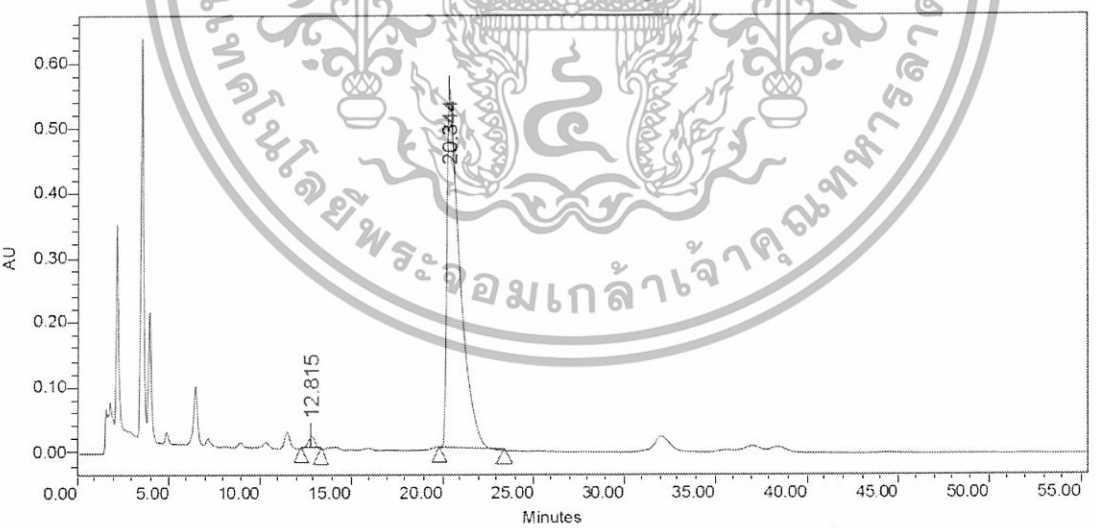
$$= 4.3800$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.กราฟความเข้มข้นสารคาเทชินในชาเขียวยูนิฟ 3 ซ้ำ

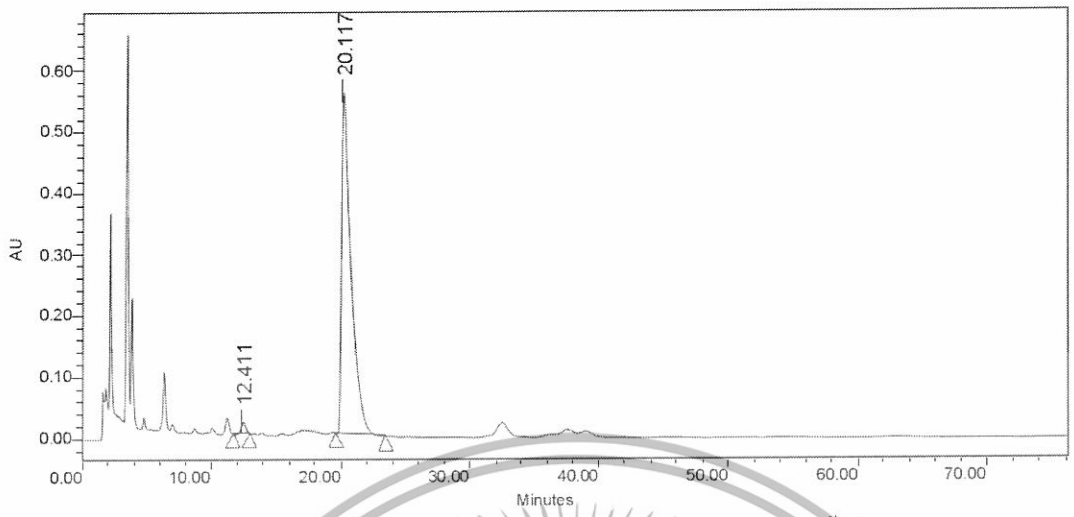


รูป ง -7 กราฟโครมาโทแกรมสารคาเทชินในชาเขียวยูนิฟ ซ้ำที่ 1 ที่อัตราการไหล 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที



รูป ง -8 กราฟโครมาโทแกรมสารคาเทชินในชาเขียวยูนิฟ ซ้ำที่ 2 ที่อัตราการไหล 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูป ง -9 กราฟโครมาโทแกรมสารคาเทชินในชาเขียวยูนิฟ ซ้ำที่ 3 ที่อัตราการไหล 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที

ตาราง ง -3 ความเข้มข้นสารคาเทชินที่มีในชาเขียวยูนิฟ (mg)

ชาเขียวยี่ห้อยูนิฟ	ค่าความเข้มข้นสารคาเทชินที่มีในชาเขียวยูนิฟ ซ้ำที่ 1	ค่าความเข้มข้นสารคาเทชินที่มีในชาเขียวยูนิฟ ซ้ำที่ 2	ค่าความเข้มข้นสารคาเทชินที่มีในชาเขียวยูนิฟ ซ้ำที่ 3
	1.3668	1.7356	1.6078

$$\overline{X} = \frac{1.3668 + 1.7356 + 1.6078}{3}$$

$$= 1.5701 \text{ mg}$$

$$SD = \sqrt{\frac{0.0413 + 0.0274 + 0.0014}{2}}$$

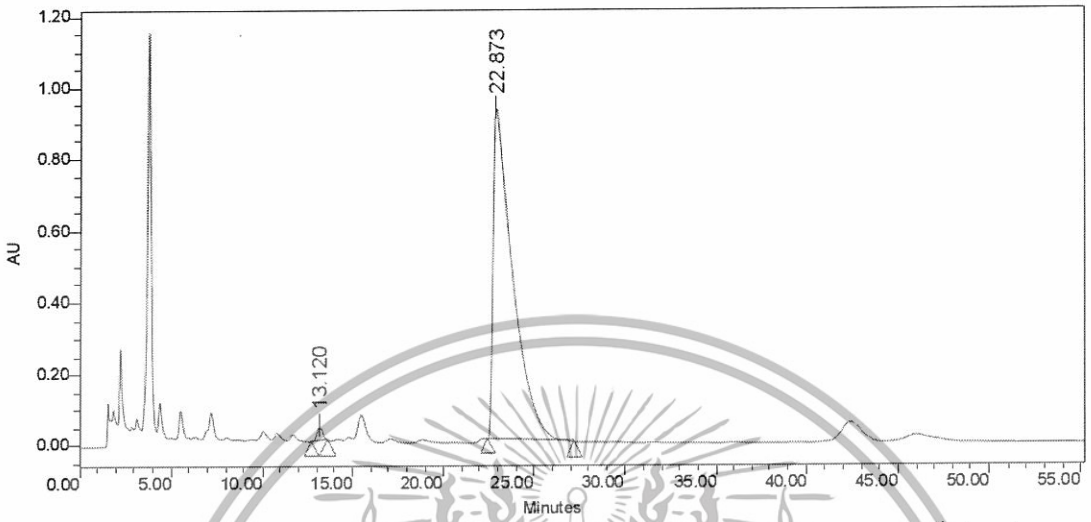
$$= 0.1872$$

$$\%RSD = \frac{0.1872}{1.5701} \times 100$$

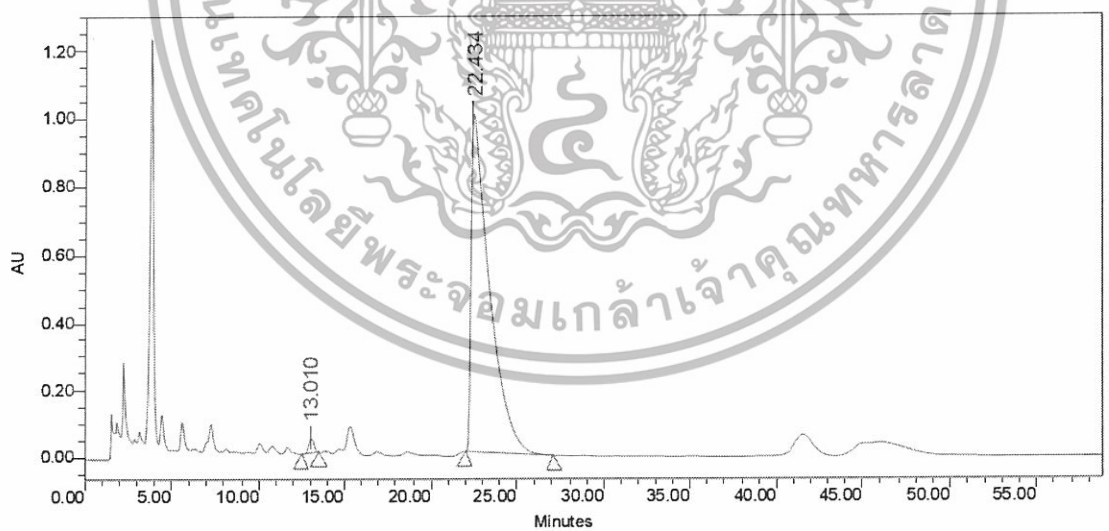
$$= 11.9200$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.กราฟความเข้มข้นสารคาเทชินในชาเขียวเจแปนกรีนที 3 ซ้ำ

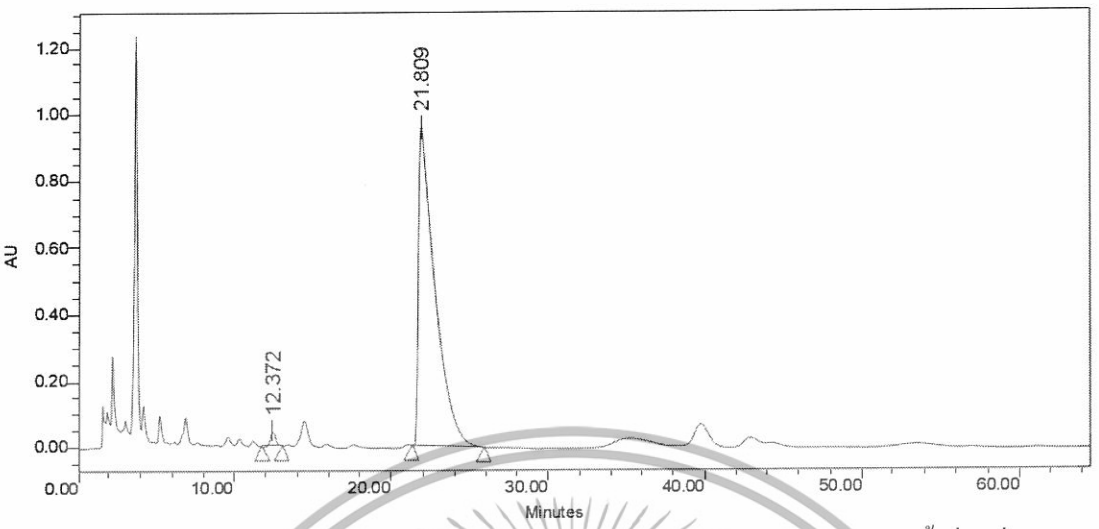


รูป ง -10 กราฟโครมาโทแกรมสารคาเทชินในชาเขียวเจแปนกรีนที ซ้ำที่ 1 ที่อัตราการไหล 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที



รูป ง -11 กราฟโครมาโทแกรมสารคาเทชินในชาเขียวเจแปนกรีนที ซ้ำที่ 2 ที่อัตราการไหล 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูป ง -12 กราฟโครมาโทแกรมสารคาเทชินในชาเขียวเจแปนกรีนที ซ้ำที่ 3 ที่อัตราการไหล 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที

ตาราง ง -4 ความเข้มข้นสารคาเทชินที่มีในชาเขียวเจแปนกรีนที (mg)

ชาเขียวยี่ห้อเจแปนกรีนที	ค่าความเข้มข้นสารคาเทชินที่มีในชาเขียว เจแปนกรีนที ซ้ำที่ 1	ค่าความเข้มข้นสารคาเทชินที่มีในชาเขียว เจแปนกรีนที ซ้ำที่ 2	ค่าความเข้มข้นสารคาเทชินที่มีในชาเขียว เจแปนกรีนที ซ้ำที่ 3
	3.5674	3.7326	4.0676

$$\overline{X} = \frac{3.5674 + 3.7326 + 4.0676}{3}$$

$$= 3.7892 \text{ mg}$$

$$SD = \sqrt{\frac{0.0492 + 0.0032 + 0.0775}{2}}$$

$$= 0.2549$$

$$\%RSD = \frac{0.2549}{3.7892} x100$$

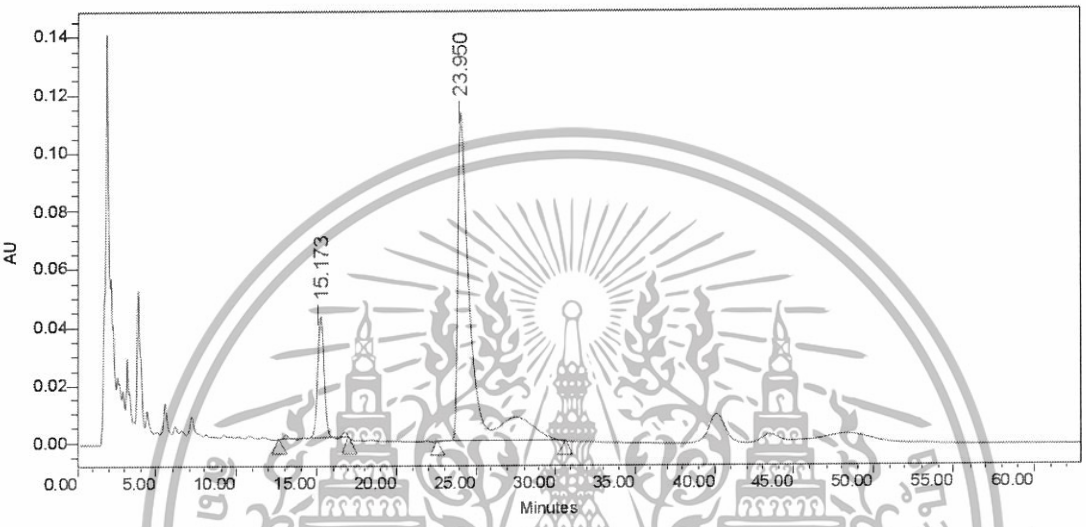
$$= 6.7200$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

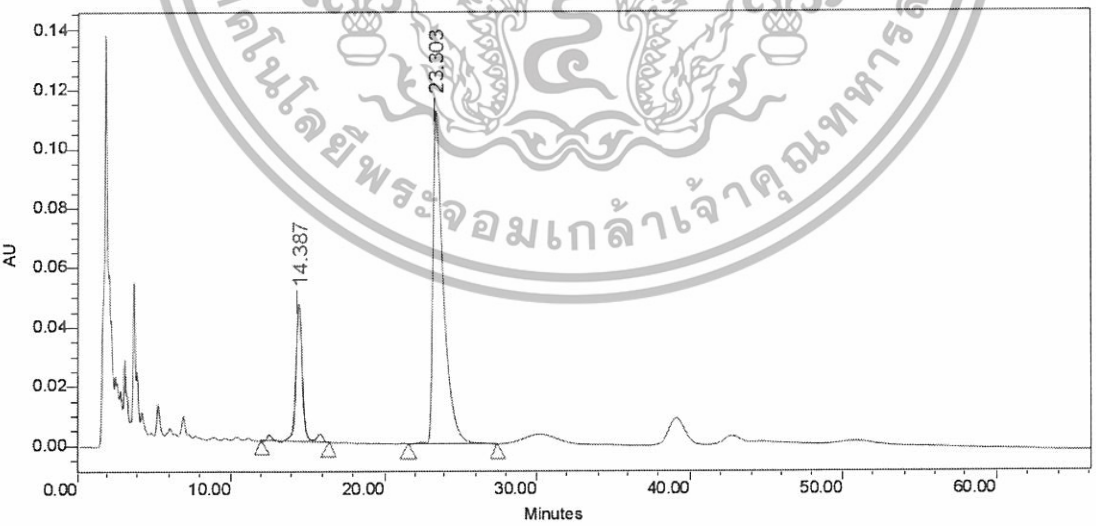
ภาคผนวก จ

กราฟ Spiked สารมาตรฐานคาเทชินลงในตัวอย่างชาเขียวพร้อมดื่ม 4 ยี่ห้อ

1. กราฟ spiked สารมาตรฐานคาเทชินลงในตัวอย่างชาเขียวพร้อมดื่มนามาชะ 3 ซ้ำ

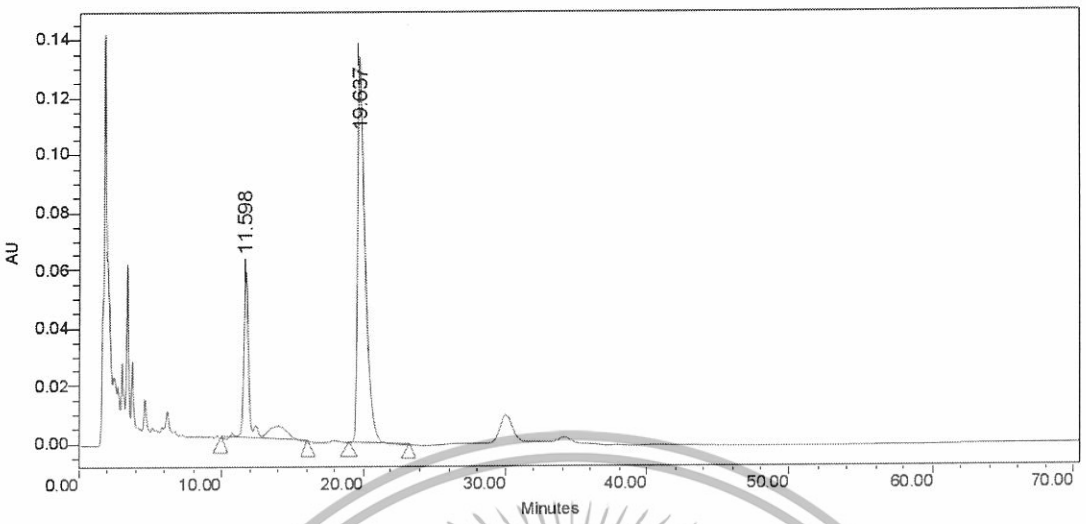


รูป จ-1 กราฟโครมาโทแกรม spiked สารมาตรฐานคาเทชินลงในตัวอย่างชาเขียวพร้อมดื่มนามาชะ ซ้ำที่ 1 ที่อัตราการไหล 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที



รูป จ-2 กราฟโครมาโทแกรม spiked สารมาตรฐานคาเทชินลงในตัวอย่างชาเขียวพร้อมดื่มนามาชะ ซ้ำที่ 2 ที่อัตราการไหล 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูป จ-3 กราฟโครมาโทแกรม spiked สารมาตรฐานคาเทชินลงในตัวอย่างชาเขียวพร้อมดื่มนามาชะ ซ้ำที่ 3 ที่อัตราการไหล 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที

ตาราง จ -1 ความเข้มข้นสารคาเทชินที่มีในชาเขียวนามาชะ (mg)

ชาเขียวยี่ห้อนามาชะ	ค่าความเข้มข้นสารคาเทชินที่มีในชาเขียวนามาชะ ซ้ำที่ 1	ค่าความเข้มข้นสารคาเทชินที่มีในชาเขียวนามาชะ ซ้ำที่ 2	ค่าความเข้มข้นสารคาเทชินที่มีในชาเขียวนามาชะ ซ้ำที่ 3
	5.4370	5.6830	6.5860

$$\overline{X} = \frac{5.4370 + 5.6830 + 6.5860}{3}$$

$$= 5.9020 \text{ mg}$$

$$SD = \sqrt{\frac{0.2162 + 0.0480 + 0.4679}{2}}$$

$$= 0.6050$$

$$\%RSD = \frac{0.6050}{5.902} \times 100$$

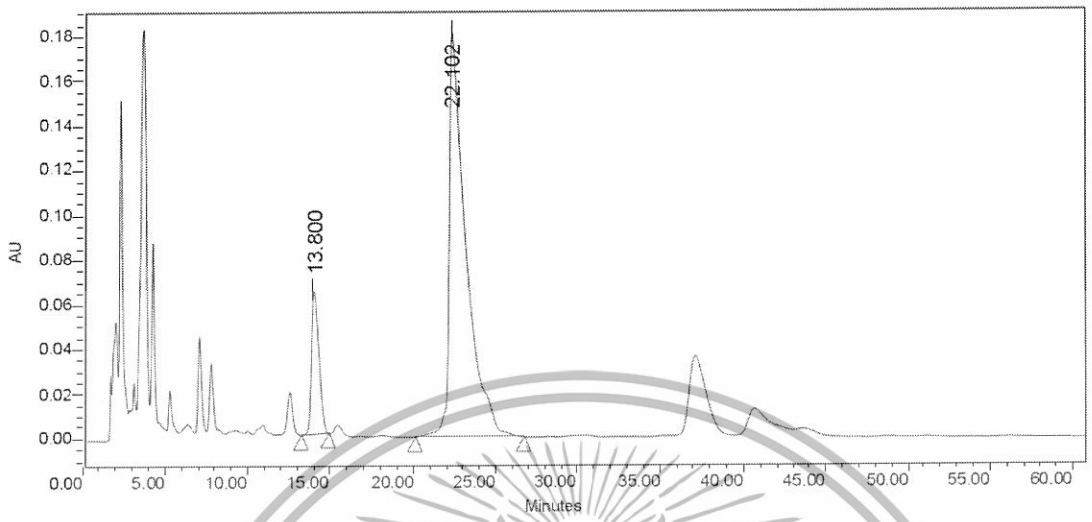
$$= 10.2500$$

$$\% \text{ recovery} = \frac{295.1000 - 171.9400}{125} \times 100$$

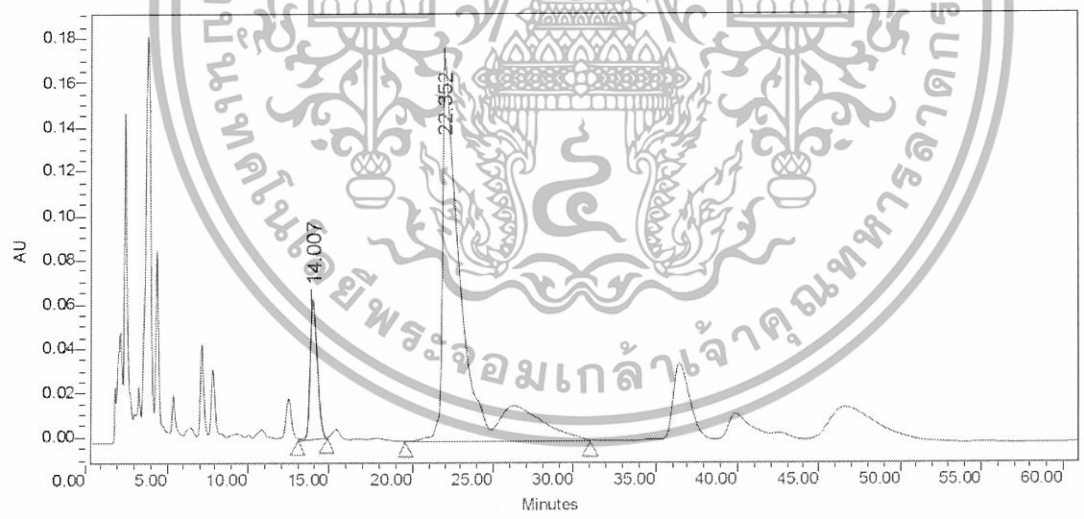
$$= 98.5300$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. กราฟ spiked สารมาตรฐานคาเทชินลงในตัวอย่างชาเขียวพร้อมดื่มโออิชิ 3 ซ้ำ

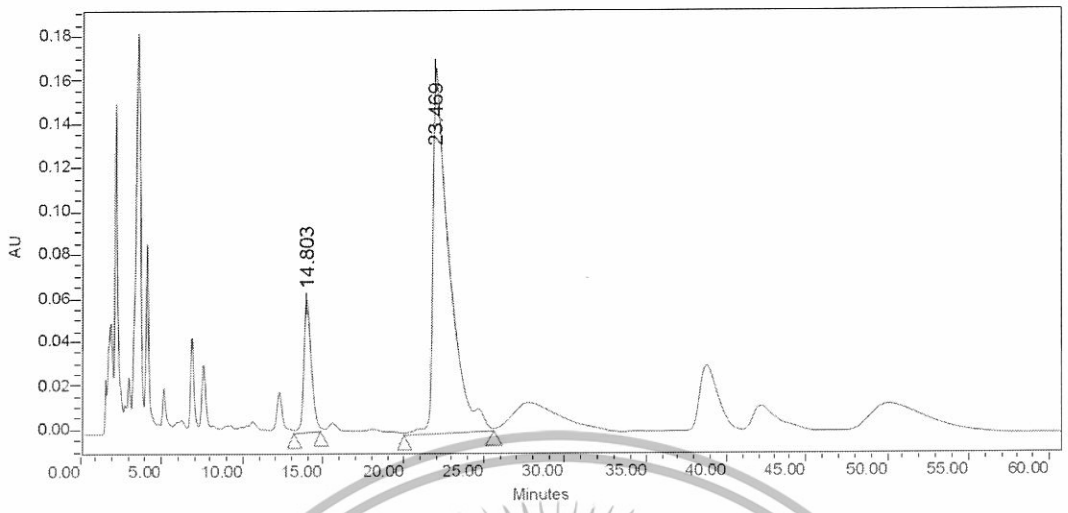


รูป จ-4 กราฟโครมาโทแกรม spiked สารมาตรฐานคาเทชินลงในตัวอย่างชาเขียวพร้อมดื่มโออิชิ ซ้ำที่ 1 ที่อัตราการไหล 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที



รูป จ-5 กราฟโครมาโทแกรม spiked สารมาตรฐานคาเทชินลงในตัวอย่างชาเขียวพร้อมดื่มโออิชิซ้ำที่ 2 ที่อัตราการไหล 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า. ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปจ-6 กราฟโครมาโทแกรม spiked สารมาตรฐานคาเทชินลงในตัวอย่างชาเขียวพร้อมดื่มโออิชิ ซ้ำที่ 3 ที่อัตราการไหล 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที

ตาราง จ -2 ความเข้มข้นสารคาเทชินที่มีในชาเขียวโออิชิหลังจากการspiked สารมาตรฐานคาเทชินลงไป (mg)

ชาเขียวยี่ห้อโออิชิ	ค่าความเข้มข้นสารคาเทชินที่มีในชาเขียว โออิชิซ้ำที่ 1	ค่าความเข้มข้นสารคาเทชินที่มีในชาเขียว โออิชิซ้ำที่ 2	ค่าความเข้มข้นสารคาเทชินที่มีในชาเขียว โออิชิซ้ำที่ 3
	7.3727	6.8938	6.6271

$$\overline{X} = \frac{7.3727 + 6.8938 + 6.6271}{3}$$

$$= 6.9645 \text{ mg}$$

$$SD = \sqrt{\frac{0.1666 + 0.0050 + 0.1138}{2}}$$

$$= 0.3778$$

$$\%RSD = \frac{0.3778}{6.9645} x100$$

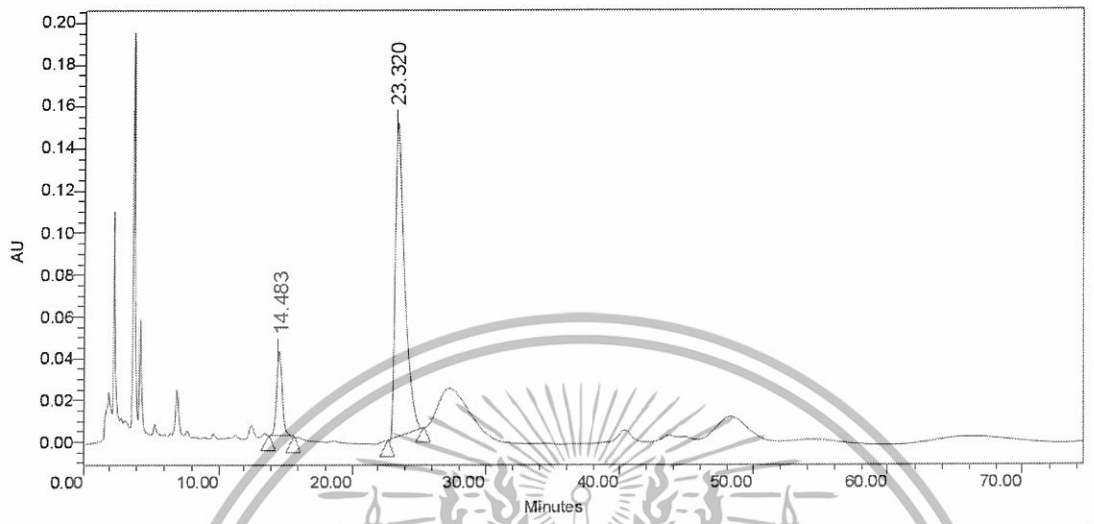
$$= 5.4100$$

$$\% \text{ recovery} = \frac{348.2200 - 219.3200}{125} x100$$

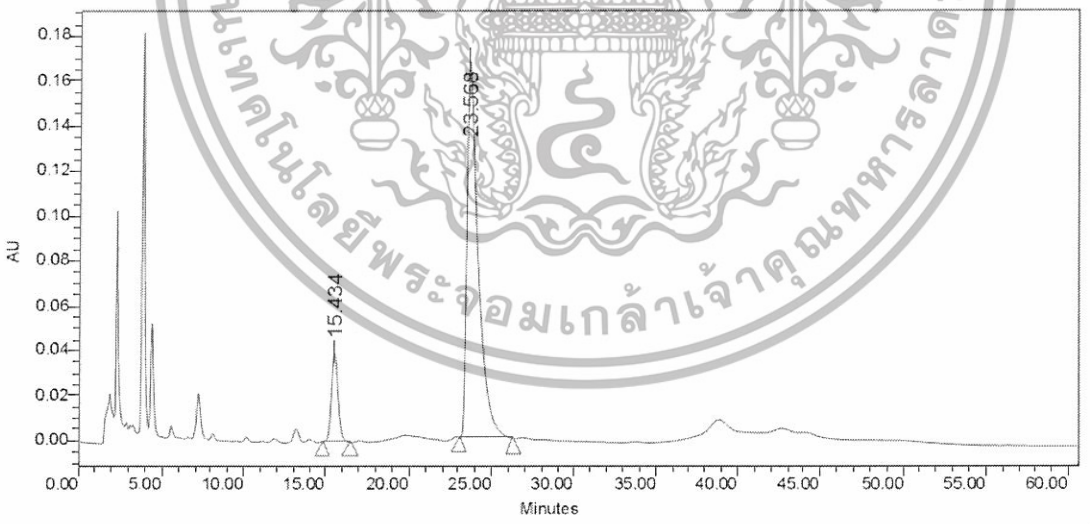
$$= 103.1300$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. กราฟ spiked สารมาตรฐานคาเทชินลงในตัวอย่างชาเขียวพร้อมดื่มยูนิฟ 3 ซ้ำ

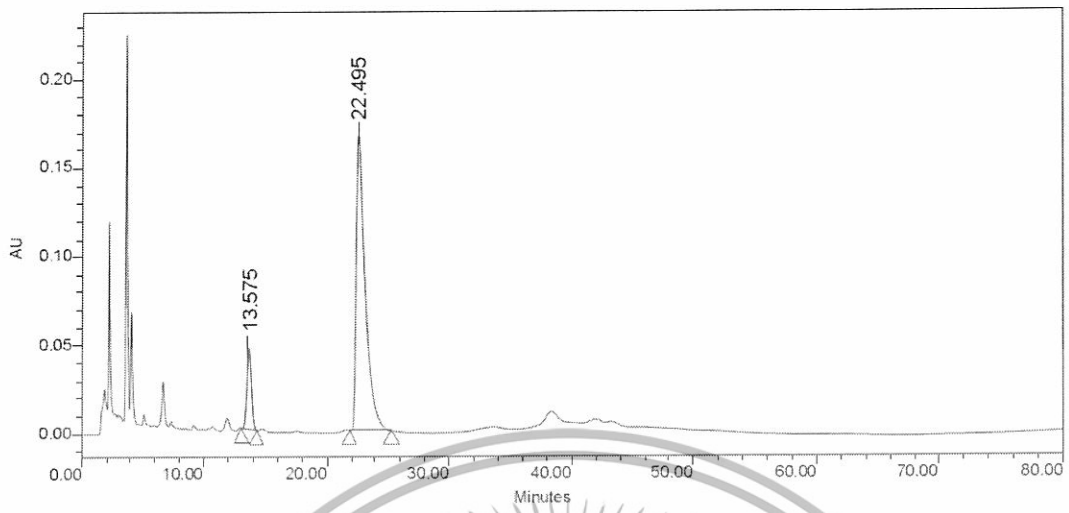


รูปจ-7 กราฟโครมาโทแกรม spiked สารมาตรฐานคาเทชินลงในตัวอย่างชาเขียวพร้อมดื่มยูนิฟ ซ้ำที่ 1 ที่อัตราการไหล 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที



รูปจ-8 กราฟโครมาโทแกรม spiked สารมาตรฐานคาเทชินลงในตัวอย่างชาเขียวพร้อมดื่มยูนิฟ ซ้ำที่ 2 ที่อัตราการไหล 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปจ-9 กราฟโครมาโทแกรม spiked สารมาตรฐานคาเทชินลงในตัวอย่างชาเขียวพร้อมดื่มยูนิฟ ซ้ำที่ 3 ที่อัตราการไหล 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที

ตาราง จ -3 ความเข้มข้นสารคาเทชินที่มีในชาเขียวยูนิฟหลังจากการspiked สารมาตรฐานคาเทชินลงไป (mg)

	ค่าความเข้มข้นสารคาเทชินที่มีในชาเขียวยูนิฟซ้ำที่ 1	ค่าความเข้มข้นสารคาเทชินที่มีในชาเขียวยูนิฟซ้ำที่ 2	ค่าความเข้มข้นสารคาเทชินที่มีในชาเขียวยูนิฟซ้ำที่ 3
ชาเขียวยี่ห้อยูนิฟ	4.7172	4.2410	4.5670

$$\overline{X} = \frac{4.7172 + 4.2410 + 4.5670}{3}$$

$$= 4.4994 \text{ mg}$$

$$SD = \sqrt{\frac{0.0474 + 0.0668 + 0.0046}{2}}$$

$$= 0.2437$$

$$\%RSD = \frac{0.2437}{4.4994} x100$$

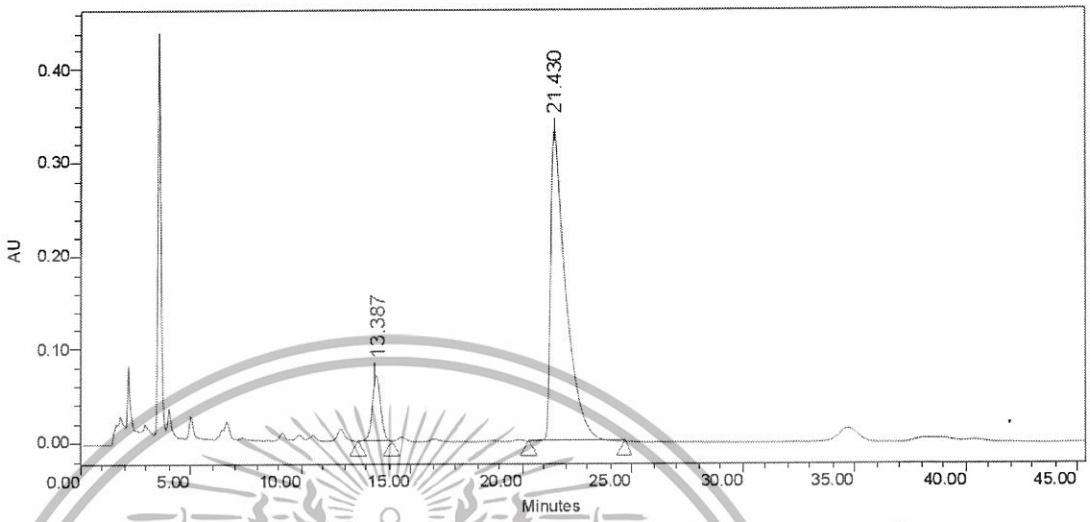
$$= 5.4000$$

$$\% \text{ recovery} = \frac{225.4200 - 78.5000}{125} x100$$

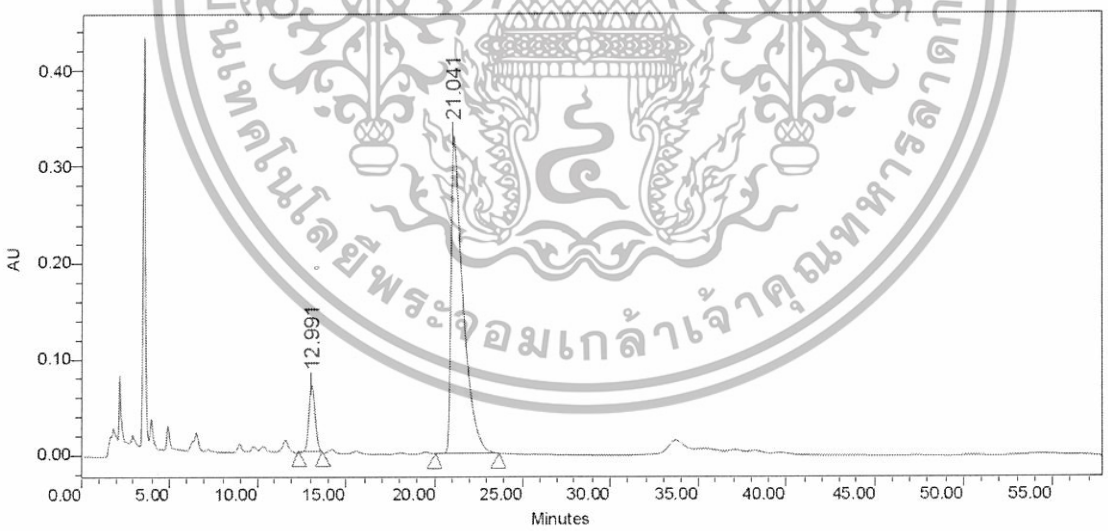
$$= 117.5400$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. กราฟ spiked สารมาตรฐานคาเทชินลงในตัวอย่างชาเขียวพร้อมดื่มเจแปนกรีนที 3 ซ้ำ

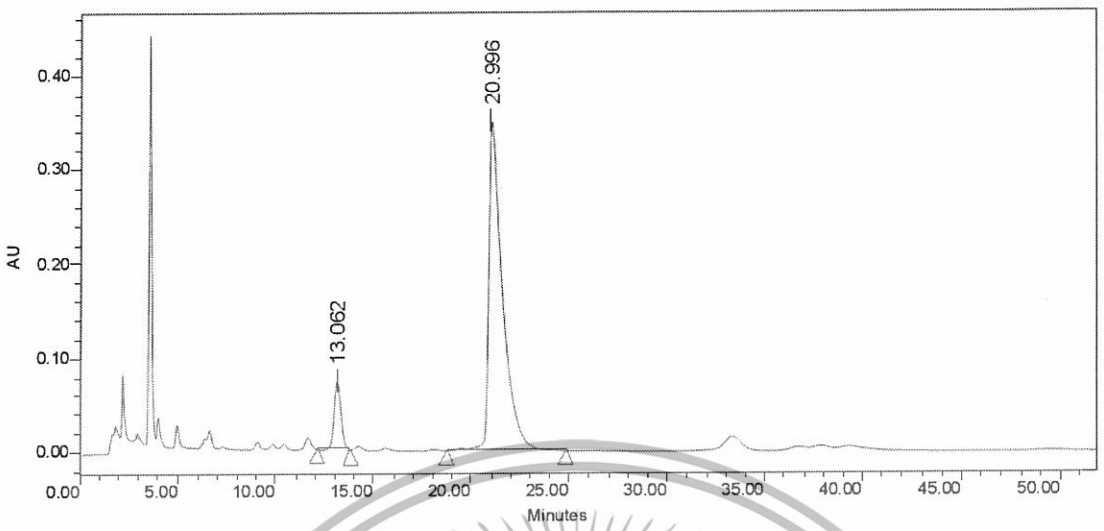


รูปจ-10 กราฟโครมาโทแกรมspikedสารมาตรฐานคาเทชินลงในตัวอย่างชาเขียวพร้อมดื่มเจแปนกรีนทีซ้ำที่ 1 ที่อัตราการไหล 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที



รูปจ-11 กราฟโครมาโทแกรมspikedสารมาตรฐานคาเทชินลงในตัวอย่างชาเขียวพร้อมดื่มเจแปนกรีนทีซ้ำที่ 2 ที่อัตราการไหล 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปจ-12 กราฟโครมาโทแกรม spiked สารมาตรฐานคาเทชินลงในตัวอย่างชาเขียวพร้อมดื่มเจแปนกรีนที ซ้ำที่ 3 ที่อัตราการไหล 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที

ตาราง จ -4 ความเข้มข้นสารคาเทชินที่มีในชาเขียวเจแปนกรีนทีหลังจากการspiked สารมาตรฐานคาเทชินลงไป (mg)

ชาเขียวยี่ห้อเจแปนกรีนที	ค่าความเข้มข้นสารคาเทชินที่มีในชาเขียวเจแปนกรีนที ซ้ำที่ 1	ค่าความเข้มข้นสารคาเทชินที่มีในชาเขียวเจแปนกรีนที ซ้ำที่ 2	ค่าความเข้มข้นสารคาเทชินที่มีในชาเขียวเจแปนกรีนที ซ้ำที่ 3
	7.0422	6.5752	7.0912

$$\overline{X} = \frac{7.0422 + 6.5752 + 7.0912}{3}$$

$$= 6.9035 \text{ mg}$$

$$SD = \sqrt{\frac{0.0198 + 0.1078 + 7.0912}{2}}$$

$$= 0.2853$$

$$\%RSD = \frac{0.2853}{6.9053} x100$$

$$= 4.13$$

$$\% \text{ recovery} = \frac{345.1767 - 189.4600}{125} x100$$

$$= 124.5734$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ฉ
ข้อมูลเกี่ยวกับการประเมินทางสถิติ

ตาราง ฉ-1 แสดงผลการทดลองการประเมินผลทางสถิติเพื่อการหาความถูกต้องและความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์คาเทชินในชาเขียวพร้อมดื่ม

ยี่ห้อเครื่องดื่มชาเขียว	ความเข้มข้นของคาเทชินเฉลี่ย($\overline{X}$)	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)	% RSD	% recovery
โออิชิ(Oishi)	4.3863	0.1920	4.3800	103.1300
ยูนิฟ(Unif)	1.5701	0.1872	11.9200	117.5400
นามาชะ (Namasha)	3.4389	0.2554	7.4300	98.5300
แจแปนกรีนที (Japan Greentea)	3.7892	0.2549	6.7200	124.5734

เมื่อ

$\overline{X}$ = ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของคาเทชิน 3 ซ้ำ

SD = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

% RSD = ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของวิธี โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบเฟสย้อนกลับ

% recovery = ค่าความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ของวิธี โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบเฟสย้อนกลับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้