แบบรายงานสรุปผลการวิจัย
โครงการวิจัยทุนอุดหนุนจากมูลนิธิโครงการหลวง

ชื่อโครงการวิจัย

(ภาษาไทย) "การตรวจวิเคราะห์คุณสมบัติต้านออกซิเดชันและจับธาตุเหล็กของสารคะเตชินในใบชาจากโครงการหลวง"

(ภาษาอังกฤษ) "Analysis of Antioxidant and Iron-Chelating Properties of Tea Catechins from Thailand Royal Project"

ทุนอุดหนุนวิจัย ประจำปี 2546 รหัสโครงการ 3333 งบประมาณ 189,530 บาท

หัวหน้าโครงการวิจัย นายสมเดช ศรีชัยรัตนกูล

ผู้ร่วมโครงการวิจัย นายอุดมภัณฑ์ ขาลสุวรรณ
นางสาวจันทร์ศิริ วาทะหงษ์
นายชัยวัฒน์ ชุ่มปัน

ผู้ช่วยวิจัย นางสาวสะแกวัลย์ อุ่นใจจีน

การตรวจวิเคราะห์คุณสมบัติต้านออกซิเดชันและจับธาตุเหล็กของสารคะเตชินในใบชาจากศูนย์ผลิตชามูลนิธิโครงการหลวง

1. บทนำ

ชาเป็นเครื่องดื่มที่เก่าแก่และได้รับความนิยมในการนำมาบริโภคมากที่สุดชนิดหนึ่งของโลก คนจีนเป็นชนชาติแรกที่นิยมดื่มน้ำชา ต่อจากนั้นความนิยมได้แพร่กระจายไปทั่วโลก ต้นชามีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Camellia sinensis* ในตระกูล *Theaceae* ใบชาสดมีสารโพลีฟีนอล (polyphenols) กลุ่มที่มีชื่อว่า ฟลาวานอล (flavanols) หรือ คะเตชิน (catechins) ประมาณ 30% ของน้ำหนักใบชาแห้ง นอกจากนี้ยังมีสารคาเฟอีน (caffeine) ประมาณ 3% มี methylxanthines, theobromine และ theophylline เล็กน้อย สารที่เป็นลักษณะเฉพาะตัวของใบชาคือกรดอะมิโนธีอะนีน (theanine หรือ 5-N-ethylglutamine) ใบชาไม่มีสารกรดแทนนิค (tannic acid) สาร thearubigens เป็นสารองค์ประกอบส่วนใหญ่ที่สะกัดได้จากชาดำ (Graham HN, 1992) ใบชาสดเมื่อเอามาทำแห้งโดยผ่านขบวนการที่แตกต่างกันจะได้เป็นชาสำหรับชงดื่มหลายชนิดเช่น ชาดำ (black tea) ชาอู่หลง (oolong tea) และ ชาเขียว (green tea) ในขบวนการผลิตชาดำ ใบชาสดจะถูกนำไปหมักในเวลาต่าง ๆกัน ในระหว่างขบวนการหมักนี้ สารคะเตชินจะถูกออกซิไดส์โดยเอนไซม์ polyphenol oxidase กลายเป็นสารอนุพันธุ์ควินโนน (quinone derivatives) หลายชนิดเช่น bisflavanols, theaflavins, epitheaflavic acids, และ thearubigens ซึ่งสารเหล่านี้เป็นตัวแสดงลักษณะรสชาติ กลิ่นและสีเฉพาะของชาดำ ขบวนการผลิตชาอู่หลงผ่านการหมักน้อยกว่าชาดำจึงมีสารคะเตชินเหลืออยู่บ้าง ส่วนขบวนการผลิตชาเขียวนั้นก่อนที่จะนำใบชาอ่อนที่ไม่ผ่านปฏิกิริยาออกซิเดชันเข้าสู่กระบวนการทำให้แห้ง ใบชาจะถูกนำมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงในเวลาสั้น ๆก่อน เพื่อหยุดยั้งการทำงานของเอนไซม์ polyphenol oxidase ที่จะทำลายสารประกอบโพลีฟีนอล (polyphenolic compounds) หลายตัวที่มีอยู่ในใบชา โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารคะเตชินต่าง ๆซึ่งได้แก่ catechin หรือ C, (-)-epicatechin หรือ EC, (-)-epicatechin 3-gallate หรือ ECG, (-)-epigallocatechin หรือ EGC, (-)-gallocatechin gallate หรือ GCG รวมทั้ง (-)-epigallocatechin 3-gallate หรือ EGCG (Bronner and Beecher, 1998) ชาเขียวจึงมีสารคะเตชินเหลืออยู่มากใกล้เคียงกับใบชาสด (Graham HN, 1992) ซึ่งสารเหล่านี้มีคุณสมบัติต้านการออกซิเดชัน (antioxidants) (Nakagawa et al., 1999; Toschi et al., 2000) และคุณสมบัติอื่น ๆที่มีประโยชน์ นอกจากสารคะเตชินแล้ว ใบชายังมีกรดแกลลิค (gallic acid, GA) และแคฟเฟอีน (caffeine) เป็นองค์ประกอบด้วย

ชาเขียวเป็นที่นิยมดื่มกันในประเทศแถบเอเชียตะวันออกและเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น จีน ญี่ปุ่น เวียตนาม ลาวและพม่า ชาเขียวมีอยู่หลายชนิดแตกต่างกันในขบวนการผลิต โดยขึ้นอยู่กับวิธีการให้ความร้อนซึ่งอาจจะใช้ไอน้ำหรือการคั่วแห้งในกระทะ ในประเทศญี่ปุ่นนิยมใช้วิธีไอน้ำร้อน ส่วนประเทศในแถบ Southeast Asia นิยมใช้วิธีคั่วแห้งในกระทะร้อน ชาเขียวที่ผลิตโดยวิธีคั่วแห้งในกระทะร้อนมีปริมาณสารฟลาวานอลต่ำกว่าชาเขียวที่ผลิตโดยใช้ไอน้ำร้อนประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ (Wang et al., 2000) ชาเขียวเมื่อชงน้ำร้อนจะมีสีเขียวอมเหลือง ชาเขียวคุณภาพดีเมื่อชงแล้วต้องให้สีเขียวอ่อนและมีกลิ่นหอมของสารเทอร์พีน (terpenes) เช่นสาร ไลนาโลออล (linalool) และเฮกซานาล (hexanal) สารหอมระเหยอื่นที่สำคัญในชาเขียวมีอยู่อีกหลายชนิดเช่น 1-penten-3-ol, heptanal, 1-pentenal, (Z)-2-penten-1-ol, (Z)-3penten-3-ol, linalool oxide (*trans*-furanoid และ *cis*-furanoid), linalyl propanoate และ geraniol สารหอมระเหยเหล่านี้เกิดขึ้นในระหว่างขบวนการให้ความร้อนในการผลิตชาเขียว (Kato and Shibamoto, 2001)

การศึกษาคุณสมบัติทางยา (pharmacological properties) ของชาที่ผ่านมาพบว่า ชามีผลที่ดีหลายอย่าง สามารถนำมาใช้ประโยชน์ด้านการป้องกัน (chemoprevention) และบำบัดรักษา (chemotherapy) โรคบางอย่างได้ เช่น มีฤทธิ์ลดความดันโลหิตสูง (anti-hypertensive) (Henry JP and Stephens-Larson P., 1984) มีฤทธิ์เป็นสารต้านการเกิดมะเร็ง (anti-carcinogenic compounds) (Sadzuka et al., 2000) มีฤทธิ์เป็นสารต้านการอักเสบ (anti-inflammatory agents) (Hiller et al., 1983) เป็นสารที่ให้ความร้อนแก่ร่างกาย (thermogenic substances) (Dulloo et al., 2000) กระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ในลำไส้ (probiotics) (Hara Y., 1997) มีผลลดระดับไขมันไตรกลีเซอไรด์ในเลือด (anti-hyperlipidemic effect) (Yang et al., 2001) ลดระดับโคเลสเตอรอล (hypocholesterolaemic) (Ikeda et al., 1992; Yang and Koo 1997; Chen et al., 2001) และเป็นสารต้านการเจริญเติบโตของจุลชีพที่เป็นโทษ (anti-microbial agent) ที่น่าสนใจมากก็คือสาร คะเตชินจากชาเขียวที่ความเข้มข้นต่ำ ๆ (2-20 ไมโครโมลาร์) มีคุณสมบัติจับธาตุเหล็ก (iron-chelating agents) ได้ (Morel et al., 1993; Grinberg et al., 1997; Samman et al., 2001)

คุณสมบัติทางเภสัชวิทยาต่าง ๆของสารคะเตชินดังกล่าวข้างต้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งการลดปริมาณอนุมูลอิสระที่มากเกินและการจับธาตุเหล็ก (free-radicals scavenging and iron-chelating properties) น่าจะเกี่ยวข้องกับสารออกฤทธิ์ของกลุ่มสารคะเตชินที่มีอยู่เป็นจำนวนมาก โดยเฉพาะชนิด EGCG ซึ่งน่าจะมีบทบาทสำคัญเมื่อเทียบกับชนิดอื่น การศึกษาหาวิธีการเตรียมผลิตภัณฑ์ใบชาเขียวแห้งที่มีประสิทธิภาพเพื่อให้มีสารคะเตชินชนิด EGCG และชนิดอื่น ๆในปริมาณที่สูง จะนำไปสู่การพัฒนาในการผลิตใบชาแห้งที่มีคุณค่าสูงในการส่งเสริมสุขภาพ ป้องกันและรักษาโรคหรือภาวะความผิดปกติหลายอย่างของร่างกายได้ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหาวิธีการต่าง ๆ ในการเตรียมผลิตภัณฑ์ใบชาเขียวแห้งจากศูนย์ผลิตชาโครงการหลวงให้มีสารคะเตชินในปริมาณที่สูงโดยเปรียบเทียบกับใบชาจากแหล่งผลิตอื่น และศึกษาในหลอดทดลองเกี่ยวกับคุณสมบัติต้านออกซิเดชันและจับธาตุเหล็กของสารสกัดชาที่เตรียมได้จากวิธีการต่าง ๆ

2. วิธีการวิจัย

2.1 ตัวอย่างใบชา

2.1.1 ใบชาสดพันธุ์ต่าง ๆเก็บมาจากศูนย์ผลิตชาต่าง ๆของมูลนิธิโครงการหลวงที่

ดอยม่อนเงาะ อ.แม่แตง จ.เชียงใหม่เป็นชาพันธุ์ก้านอ่อน ชาพันธุ์เบอร์12และชาพันธุ์อัสสัม

แม่ปูนหลวง อ.พร้าว จ.เชียงใหม่เป็นชาพันธุ์ก้านอ่อนและชาพันธุ์เบอร์12

ขุนวาง อ.แม่แจ่ม จ.เชียงใหม่เป็นชาพันธุ์เบอร์12

ดอยอ่างขาง อ.ฝางจ.เชียงใหม่เป็นชาพันธุ์เบอร์12 และชาพันธุ์หยวนจืออู่หลง

ห้วยน้ำขุ่น อ.แม่สรวย จ.เชียงรายเป็นชาพันธุ์เบอร์12 ชาพันธุ์อัสสัม ชาพันธุ์หยวนจืออูหลง และชาพันธุ์ชิงชิง

ปางดะ อ.สะเมิง จ.เชียงใหม่เป็นชาพันธุ์ไซตามะ ชาพันธุ์เบอร์12 ชาพันธุ์ชิงชิงอูหลง ชาพันธุ์หยวนจืออูหลง ชาพันธุ์HK3 ชาพันธุ์ชิงชิงต้าพั่งและใบหม่อน

2.1.2 ใบชาเขียวแห้งเป็นผลิตภัณฑ์ชาเขียวดอยคำจากมูลนิธิโครงการหลวง จ.เชียงใหม่

2.2 การศึกษาประสิทธิภาพของกระบวนการเตรียมผลิตภัณฑ์ชา

เพื่อที่จะศึกษาผลของกระบวนการเตรียมผลิตภัณฑ์ชาแห้งเพื่อให้ได้ปริมาณสารโพลีฟีนอลกลุ่มคะเตชินในปริมาณที่สูง โดยนำใบชาสดที่เก็บได้มาผ่านกระบวนการอย่างใดอย่างหนึ่งดังนี้

- แช่เย็นที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส (ใบสด) เป็นเวลา 6 ชั่วโมง
- ผ่านความร้อนในเตาไมโครเวฟที่ระดับความร้อน 800 วัตต์ เป็นเวลา 2 และ 3 นาที
- ผ่านความร้อนโดยการคั่วแห้งในกระทะร้อน 2 นาที
- ผ่านความร้อนโดยการนึ่ง 2 นาที
- อบที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

นำใบชาสดตัวอย่างที่ผ่านกระบวนการต่าง ๆในข้อ 2.2 และใบชาแห้ง (ข้อ 2.1.2) มาสกัดด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารคะเตชินชนิดต่าง ๆด้วยวิธี High-performance liquid chromatography (HPLC)

2.3 การเตรียมสารสกัดชา

ชั่งชาตัวอย่างแห้งบดละเอียดจำนวน 2.0 กรัม เทลงในตัวทำละลายที่เป็นน้ำร้อน (อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ทำการสกัดเป็นเวลานาน 10 นาที กรองน้ำชาที่สกัดได้ด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 125 มิลลิเมตร นำสารสกัดชาที่ได้มาฉีดวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือ HPLC (ข้อ 2.4) หรือแบ่งเก็บแช่แข็งที่อุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียสเพื่อเก็บไว้ใช้ในการทดลองอื่น ๆต่อไป

2.4 การวิเคราะห์ปริมาณสารคะเตชินด้วยวิธี HPLC (Chen et al., 20001)

หลักการ

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารโพลีฟีนอลกลุ่มคะเตชิน (เช่น EGC, C, EC, EGCG และ ECG) ด้วยวิธี Reverse-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) อาศัยหลักการที่โมเลกุลสารคะเตชินต่าง ๆมีความมีขั้วหรือประจุที่แตกต่างกันและถูกชะด้วยตัวทำละลายให้หลุดออกมาจากคอลัมน์ที่เวลา (retention time) ต่างกันตามลำดับดังนี้ (EGC<C<EC<EGCG<ECG)

วิธีการ

นำสารสกัดชาเขียวที่ได้จากข้อ 2.3 มากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 cellulose acetate แล้วทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือ HPLC ยี่ห้อ LDC ภายใต้สภาวะที่กำหนดให้ดังนี้

- คอลัมน์ที่ใช้วิเคราะห์คือ Waters SpherosorbODS2 analytical column (4.7x250 mm, 5 μm) พร้อม SpherosorbODS2 guard column (4.7x10 mm, 5 μm)
- ตัวทำละลายเคลื่อนที่คือ 0.05%H_2SO_4:acetonitrile:ethylacetate = 86:12:2 (v/v/v)

ทำการฉีดสารละลายคะเตชินมาตรฐานชนิดต่าง ๆหรือสารสกัดชาจำนวน 50 ไมโครลิตรเข้าไปในช่องสำหรับฉีดสารละลายของเครื่องมือ HPLC แล้วทำการชะด้วยตัวทำละลายเคลื่อนที่ด้วยอัตราเร็วของการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที พร้อมกับวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารคะเตชินต่าง ๆที่ถูกชะออกมาที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรด้วยเครื่องมือ Flow cell UV-VIS detector (SpectraMonitor LDC)

เพื่อยืนยันว่าสารคะเตชินต่าง ๆในสารสกัดชาเขียวถูกแยกออกมาด้วยเครื่องมือ HPLC ในช่วงค่าเวลา (retention time) เดียวกันกับช่วงเวลาของสารคะเตชินมาตรฐานชนิดต่าง ๆถูกชะออกมา จึงได้ทำการเติมสารคะเตชินมาตรฐานชนิดต่าง ๆ (ความเข้มข้น 5-10 มิลลิโมลาร์) ลงไปในสารสกัดชาตัวอย่าง แล้วทำการวิเคราะห์ใหม่อีกครั้งหนึ่ง ซึ่งก็พบว่าสารคะเตชินต่าง ๆถูกชะออกมาที่ลำดับเวลาเดิมแต่มีความสูงและพื้นที่ใต้

กราฟเพิ่มขึ้นตามปริมาณที่เติมลงไป (ผลไม่ได้แสดงไว้) ดังนั้นการวิเคราะห์หาปริมาณสารคะเตชินต่าง ๆด้วยวิธีและสภาวะการทดลองที่ใช้นี้จึงมีความเชื่อถือได้ (reliability) ทำให้สามารถแยกสารคะเตชินต่าง ๆที่มีอยู่ในสารสกัดชาออกจากสารประกอบอื่นได้อย่างแม่นยำ (precision) และถูกต้อง (accuracy) นอกจากนี้ยังพบว่าค่าเวลาที่สารคะเตชินต่าง ๆที่ถูกชะออกมามีความแตกต่างกันน้อยมากในแต่ละวัน (day-to-day variations) เมื่อทำการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีดังกล่าวนี้

การหาค่าความเข้มข้นของสารคะเตชิน

นำค่าความสูง (Peak height) หรือพื้นที่ใต้รูปกราฟ (Peak area) ของสารคะเตชินชนิดต่าง ๆที่ถูกแยกออกมาในช่วงค่าเวลาเฉพาะไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารคะเตชิน (EGC, C, EC, EGCG และ ECG) ที่ถูกสร้างขึ้นมาที่ค่าความเข้มข้นต่าง ๆ (หน่วยเป็นมิลลิโมลาร์) แล้วทำการคำนวณหาปริมาณสารคะเตชินชนิดต่าง ๆที่มีอยู่ในใบชา (หน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักใบชา)

2.5 การวิเคราะห์คุณสมบัติต้านออกซิเดชัน

การวัดคุณสมบัติต้านออกซิเดชันใช้วิธีการหาค่า Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) ที่มีหลักการคือ สารเมทธิโมโกลบินจะเร่งการเปลี่ยนไฮโดรเจนเปอรอกไซด์ให้สลายตัวกลายเป็นน้ำและสาร reactive oxygen species (ROS) ซึ่งสาร ROS ที่เกิดขึ้นจะไปออกซิไดซ์สาร ABTS (2,2' azono-bis-(3-ethyl benzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt)) ให้กลายเป็น oxidized ABTS ($ABTS^{o}$) ซึ่งมีสีน้ำเงินเขียวและให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 414 นาโนเมตร สารที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันจะยับยั้งกระบวนการออกซิไดซ์สาร ABTS ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 414 นาโนเมตรลดลง ทำการคำนวณหาระดับการต้านออกซิเดชันของสารตรวจสอบได้โดยเทียบจากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง %inhibition กับความเข้มข้นต่าง ๆของสารละลายโทรลอกซ์ (Trolox) ซึ่งเป็นสารคล้ายคลึงกับไวตามินอี

วิธีการทดลอง

1) เตรียมหลอดคิวเวทพลาสติก (Path length 1 เซ็นติเมตร) เติมสารละลายต่าง ๆดังแสดงในตาราง

น้ำยาเคมี	หลอด Blank	หลอด Test
สารสกัดชาเขียวความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (ไมโครลิตร)	-	20
สารละลายมัยโอโกลบิน (ไมโครลิตร)	70	70
สารละลาย ABTS ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ (มิลลิลิตร)	0.5	0.5
สารละลาย PBS ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ค่าพีเอช 7.4 (มิลลิลิตร)	1.0	0.98

2) เติมสารละลายฮัยโดรเจนเพอรอกไซด์ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ค่าพีเอช 7.4 จำนวน 0.45 มิลลิลิตรลงไปในทุกหลอด ผสมให้เข้ากันและจับเวลาทันที ติดตามวัดการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 414 นาโนเมตรเป็นเวลานาน 180 วินาที

3) นำค่าการดูดกลืนแสงสุดท้ายที่เวลา 180 วินาที ไปหา %Inhibition ที่ได้มาจากสมการ

$$\%\text{Inhibition} = \frac{[OD_{414\ nm}(\text{negative control}) - OD_{414\ nm}(\text{positive control})] \times 100}{OD_{414\ nm}(\text{negative control})}$$

ซึ่งค่า $OD_{414\ nm}$(negative control) เป็นค่าการดูดกลืนแสงสารละลายที่ไม่มี Trolox หรือสารสกัดชา

$OD_{414\ nm}$(positive control) เป็นค่าการดูดกลืนแสงสารละลายที่มี Trolox หรือสารสกัดชา

4) กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง %Inhibition กับสารละลาย Trolox (ความเข้มข้น 0, 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.50, 2.0 และ 2.5 มิลลิโมลาร์) ที่ได้จากการนำมาทำปฏิกิริยาตามข้อ 1-2 นาน 180 วินาที

5) นำค่า %Inhibition ของสารสกัดชาตัวอย่างมาเทียบกับกราฟข้อ 4) เพื่อหาปริมาณ TEAC

2.6 การวิเคราะห์คุณสมบัติด้านการจับธาตุเหล็ก

2.6.1 การศึกษาเชิงวิเคราะห์สเปคตรัม

การตรวจวัดคุณสมบัติของสารคะเตชินจากสารสกัดชาเขียวในการจับธาตุเหล็ก โดยการบ่มสารสกัดชาเขียวกับสารละลายธาตุเหล็กรูปเฟอร์รัส (Fe^{2+}) โดยใช้สารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตและรูปเฟอร์ริก(Fe^{2+}) โดยใช้สารละลายเฟอร์ริกไนเตรทที่ความเข้มข้นต่าง ๆ จากนั้นทำการตรวจวัดสารประกอบเชิงซ้อน (iron-catechin complex) ที่เกิดขึ้นโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงคลื่น 800-400 นาโนเมตรด้วยเครื่องมือ Double-beam Scanning UV-VIS Spectrophotometer ยี่ห้อ Shimadsu

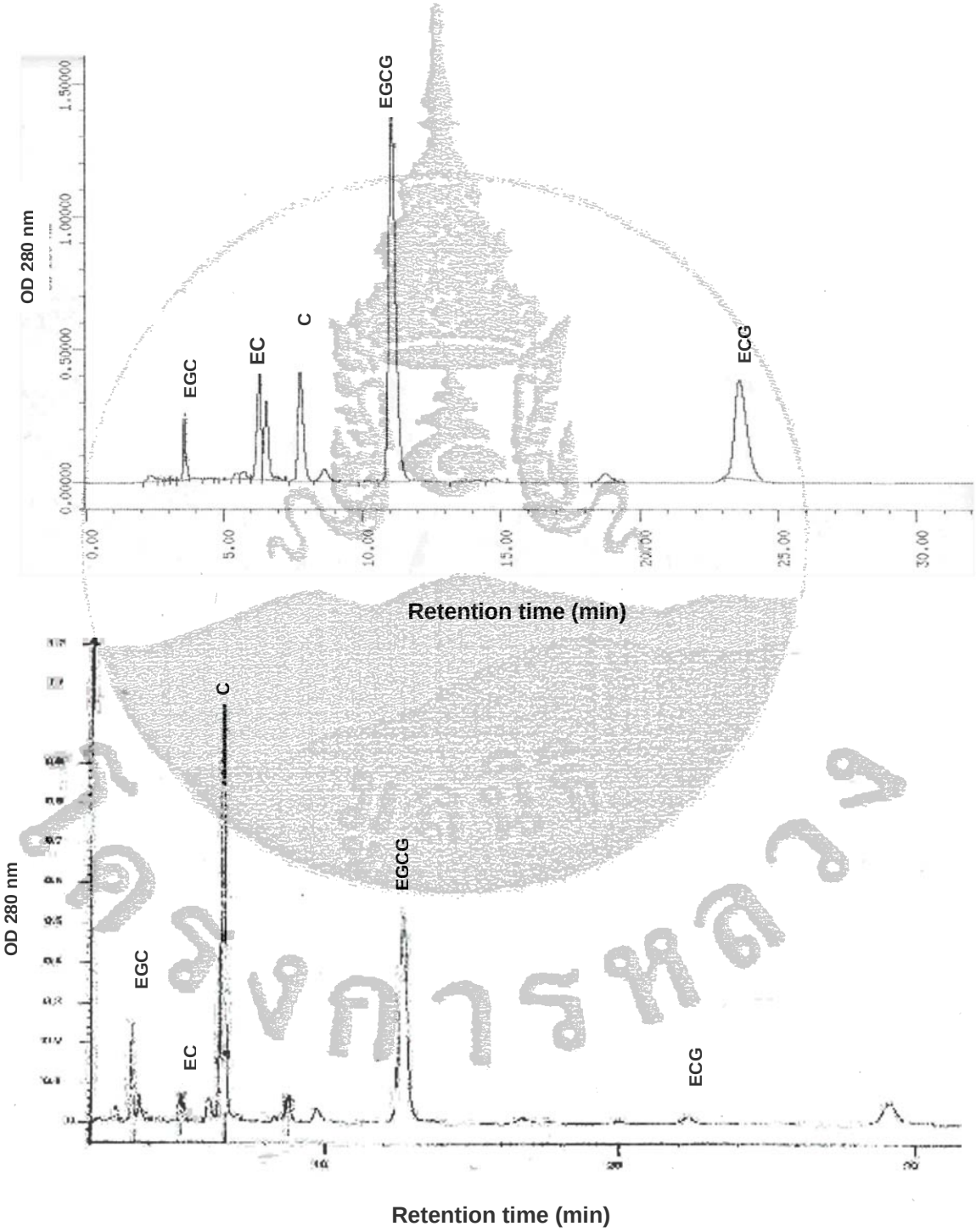
2.6.2 การศึกษาเชิงจลศาสตร์

จากการศึกษาที่ผ่านมาในข้อ 2.6.1 ถ้าสารคะเตชินในสารสกัดชาเขียวสามารถจับกับธาตุเหล็กแล้วได้สารประกอบเชิงซ้อนชนิดใหม่ขึ้นมาและมีการดูดกลืนแสงที่ค่าความยาวคลื่นจำเพาะ การกระทำกันระหว่างสารคะเตชินกับธาตุเหล็กนี้ควรจะขึ้นกับระยะเวลา (time-course) และความเข้มข้นของสารทั้งสองชนิด (dose response) ด้วย ดังนั้นจึงทำการศึกษาเชิงจลศาสตร์ของการจับธาตุเหล็กด้วยสารคะเตชินในสารสกัดชาเขียวโดยทำการบ่มสารสกัดชาเขียวเข้มข้น 2 กรัมเปอร์เซ็นต์กับสารละลายธาตุเหล็กรูปเฟอร์รัสและเฟอร์ริกที่ความเข้มข้นต่าง ๆเป็นเวลานาน 15 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 และ 540 นาโนเมตรด้วยเครื่อง ELISA reader

3 ผลการทดลอง

3.1 การตรวจวิเคราะห์สารคะเตชินต่างในสารสกัดเขียวด้วยวิธี HPLC

การวิเคราะห์สารสกัดชา (ความเข้มข้น 2 กรัมเปอร์เซ็นต์) ด้วยวิธี HPLC พบว่ามีสารคะเตชินต่าง ๆรวมทั้งสารประกอบอะโรมาติคอื่น ๆถูกชะด้วยตัวทำละลายออกมา โดยสารคะเตชิน 5 ตัวที่สนใจศึกษาถูกชะออกมาตามลำดับเวลา (retention time, RT) ดังนี้ EGC (5.3 นาที), C (RT 7.7 นาที), EC (RT 9.1 นาที), EGCG (RT 12.3 นาที) และ ECG (RT 22.5 นาที) (รูปที่ 1) ซึ่งความเข้มข้นของสารคะเตชินต่าง ๆที่มีอยู่ในใบชาจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความสูงและพื้นที่ใต้กราฟของกราฟ



รูปที่ 1 HPLC fingerprints ของสารคะเตชินต่าง ๆที่แยกได้จากสารสกัดชาเขียว (ความเข้มข้น 2 กรัมเปอร์เซ็นต์) ที่ผ่านขบวนการทำให้แห้งด้วยวิธีมาตรฐานสากล (รูปบน) และวิธีอบให้แห้งในตู้ไมโครเวฟกำลังไฟฟ้า 800 วัตต์เป็นเวลานาน 3 นาที (รูปล่าง)

3.2 การวัดปริมาณสารคะเตชินในใบชาที่เตรียมโดยขบวนการต่าง ๆ

ปริมาณสารคะเตชินต่าง ๆในสารสกัดชาตัวอย่าง (ความเข้มข้น 2 กรัมเปอร์เซ็นต์) ที่เตรียมจากกรรมวิธีต่าง ๆมีความแตกต่างกัน โดยพบว่าการอบใบชาสดในเครื่องไมโครเวฟด้วยกำลังไฟฟ้า 800 วัตต์เป็นเวลานาน 3 นาที สามารถรักษาสารคะเตชินต่าง ๆโดยเฉพาะอย่างยิ่งสาร EGCG ให้คงมีปริมาณสูงที่สุดเมื่อเทียบกับวิธีการอื่น ซึ่งเป็นไปได้ว่าการอบใบชาสดด้วยเครื่องไมโครเวฟเป็นเวลานาน 3 นาทีเป็นวิธีการที่สะดวกและเหมาะสมที่สุดในการทำลายหรือยับยั้ง (heat shock) กัมมันตภาพของเอนไซม์ polyphenol oxidase ในใบชา

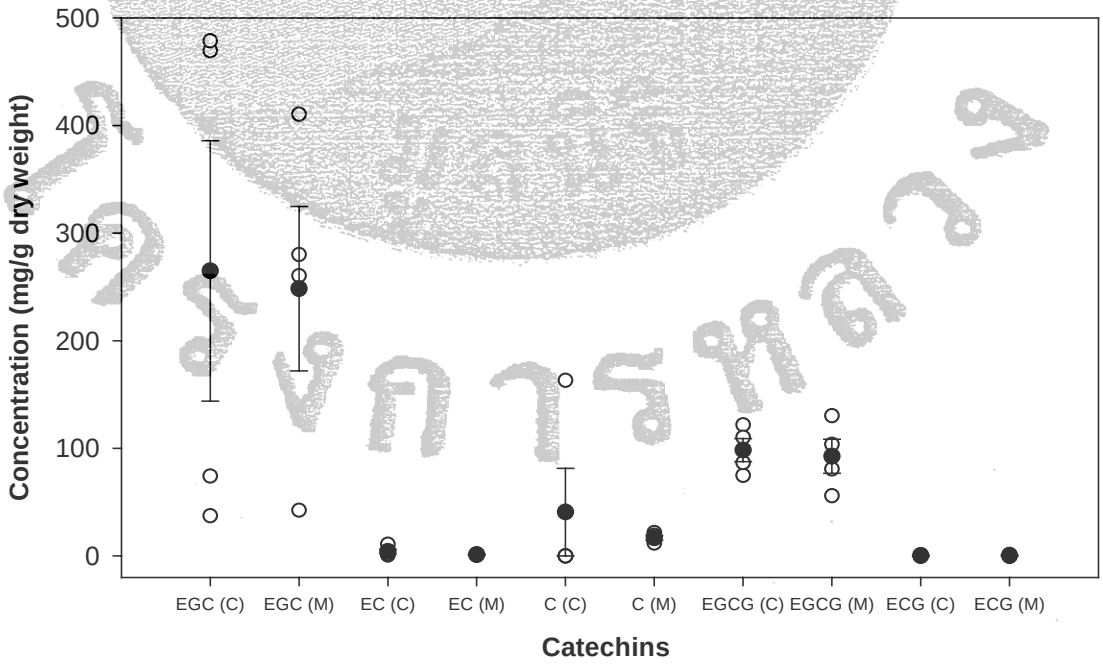
ตารางที่ 1 สารคะเตชินในผลิตภัณฑ์ชาเขียวแห้งที่เตรียมจากขบวนการต่าง ๆ

วิธีการเตรียม	ปริมาณสารคะเตชิน (มิลลิกรัมต่อกรัม ใบชาสด)				
	EGC	C	EC	EGCG	ECG
ศูนย์ม่อนเงาะ (3 พันธุ์)					
ใบชาสด	97.5±24.6	0.0±0.0	2.5±2.5	0.3±0.2	0.0±0.0
อบในตู้ไมโครเวฟ 3 นาที	14.4±7.0	0.5±0.5	6.3±5.4	8.7±0.8	0.0±0.0
คั่วบนกระทะร้อน 2 นาที	5.3±1.3	13.5±2.1	2.0±2.0	5.2±1.2	0.0±0.0
อบที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 16 ชั่วโมง	0.3±0.3	0.1±1.5	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
นึ่งนาน 2 นาที	130.7±67.4	0.0±0.0	2.5±2.5	7.6±1.8	0.0±0.0
ศูนย์แม่ปูนหลวง (2 พันธุ์)					
ใบชาสด	8.5±1.0	20.7±0.3	16.6±3.2	5.0±3.0	0.0±0.0
อบในตู้ไมโครเวฟ 3 นาที	24.0±5.4	17.7±3.4	19.6±7.1	0.8±0.1	0.8±0.1
คั่วบนกระทะร้อน 2 นาที	8.5±1.1	13.3±1.3	12.1±1.7	2.5±0.5	0.3±0.3
อบที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 16 ชั่วโมง	7.1±2.4	5.4±0.9	11.9±1.9	2.2±0.2	0.5±0.0
นึ่งนาน 2 นาที	8.9±2.2	21.6±7.7	12.1±1.4	4.3±1.3	0.0±0.0
ศูนย์ขุนวาง (2 พันธุ์)					
ใบชาสด	0.3±0.3	0.1±0.1	1.4±1.4	0.2±0.2	0.0±0.0
อบในตู้ไมโครเวฟ 3 นาที	3.2±3.0	0.3±0.2	1.5±0.7	2.7±2.2	0.1±0.0
คั่วบนกระทะร้อน 2 นาที	2.8±1.9	0.2±0.1	3.2±3.2	0.9±0.5	0.1±0.1
อบที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 16 ชั่วโมง	1.4±1.0	0.1±1.5	2.0±2.0	0.3±0.1	0.1±0.1
นึ่งนาน 2 นาที	0.3±0.0	0.1±0.1	1.6±1.6	0.2±0.0	0.0±0.0
ศูนย์ดอยอ่างขาง (2 พันธุ์)					
ใบชาสด	41.1±55.5	18.8±9.3	2.2±1.3	45.4±62.8	0.9±0.1
อบในตู้ไมโครเวฟ 3 นาที	22.5±18.4	4.9±4.1	8.4±9.8	40.6±13.7	0.6±0.1
ศูนย์ห้วยน้ำขุ่น (4 พันธุ์)					
ใบชาสด	2.5±0.8	2.3±0.7	33.5±41.0	22.4±8.5	1.7±1.6
อบในตู้ไมโครเวฟ 3 นาที	4.7±3.0	0.7±3.2	25.9±5.2	15.3±4.5	2.4±2.8
ศูนย์ปางดะ (7 พันธุ์)					
ใบชาสด	11.3±5.6	50.5±47.0	24.4±32.0	9.5±16.0	1.0±2.3
อบในตู้ไมโครเวฟ 3 นาที	15.5±12.6	76.0±35.8	1.0±1.6	93.2±33.6	12.6±4.4

ไม่ให้เปลี่ยนสารคะเตชินไปเป็นสารกลุ่มอื่น ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ใบชาแห้งที่มีสารคะเตชินเหลืออยู่ในปริมาณที่สูงเมื่อเทียบกับใบชาสด (ตารางที่ 1) ตลอดจนมีฤทธิ์ทางชีวภาพและเภสัชวิทยาที่สูงอีกด้วย อย่างไรก็ตามวิธีการอบใบชาด้วยการผ่านความร้อนในเตาไมโครเวฟ 3 นาที ยังคงทำให้มีปริมาณสารคะเตชินชนิดต่าง ๆใกล้เคียงกันหรือต่ำกว่าในใบชาเขียวแห้งดอยคำที่ผ่านการผลิตด้วยวิธีมาตรฐานสากลเชิงพาณิชย์ที่ใช้อยู่ในปัจจุบันเล็กน้อย (ตารางที่ 2 และรูปที่ 2) วิธีการผลิตเชิงพาณิชย์ดังกล่าวนี้ต้องใช้เครื่องมือขนาดใหญ่ที่มีราคาแพง ต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศ (เช่นไต้หวัน) อีกทั้งยังไม่สะดวกในการขนส่งเพื่อนำไปติดตั้งในโรงงานผลิตภัณฑ์ชาซึ่งส่วนใหญ่การคมนาคมไม่สะดวก นอกจากนี้ในการดำเนินการผลิตแต่ละครั้งยังต้องการใบชาสดเป็นจำนวนมากและใช้เวลาการผลิตผ่านขั้นตอนต่าง ๆหลายวัน แต่เนื่องจากวิธีการอบแห้งในตู้ไมโครเวฟกำลังไฟฟ้า 800 วัตต์เป็นระยะเวลาสั้น ๆเพียง 3 นาที มีความสะดวกรวดเร็ว ใช้ตัวอย่างใบชาสดจำนวนไม่มากนักในการอบให้แห้งก็สามารถทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ชาเขียวแห้งที่คงมีกลิ่นหอมและมีปริมาณสารคะเตชินต่าง ๆคงอยู่ใกล้เคียงกับวิธีการผลิตเชิงพาณิชย์ที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน

ตารางที่ 2 การตรวจวัดปริมาณสารคะเตชินต่าง ๆในใบชาเขียวแห้งดอยคำจำนวน 4 ตัวอย่างและใบชาเขียวแห้งที่ผ่านการอบในตู้ไมโครเวฟกำลังไฟฟ้า 800 วัตต์นาน 3 นาทีจำนวน 4 ตัวอย่าง

ตัวอย่างใบชาเขียวแห้ง	ปริมาณสารคะเตชิน (มิลลิกรัมต่อกรัม ใบชาแห้ง)				
	EGC	C	EC	EGCG	ECG
ใบชาเขียวแห้งดอยคำ	264.9±121.0	4.1±2.0	40.8±40.8	98.4±10.7	0.26±0.26
ใบชาเขียวผ่านการอบแห้งในตู้ไมโครเวฟ	248.4±76.3	1.2±0.2	16.7±2.2	92.6±15.9	0.35±0.35

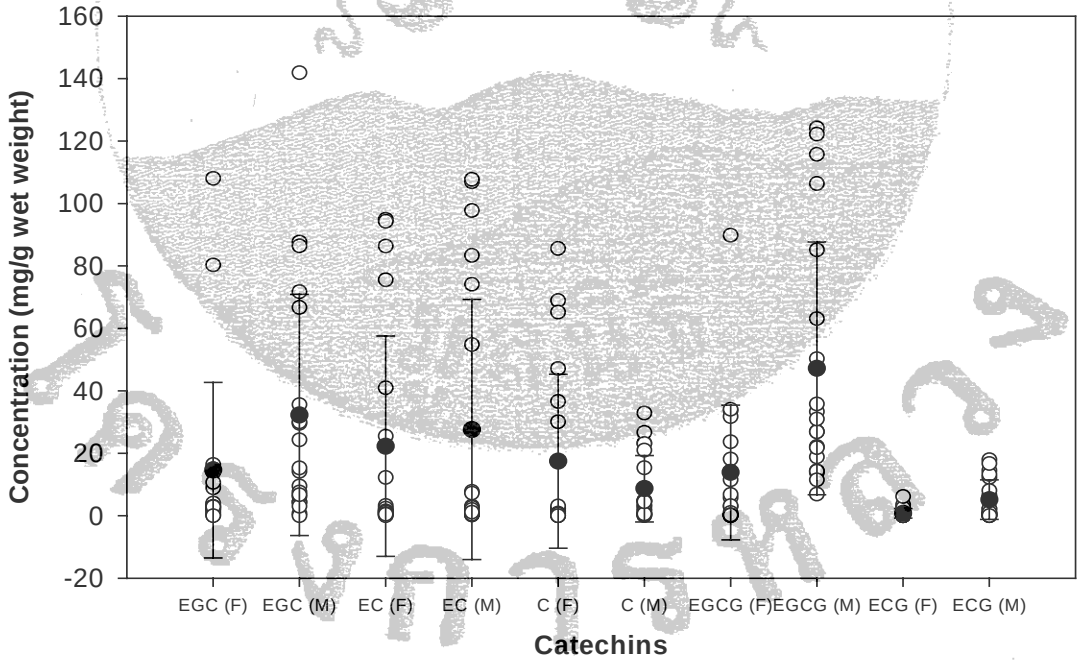


รูปที่ 2 ค่าเฉลี่ย±ค่าความคลาดเคลื่อนจากค่าเฉลี่ยของปริมาณสารคะเตชินชนิดต่าง ๆ (วงกลมปิด) ที่ตรวจวัดได้ในใบชาเขียวแห้งจำนวน 4 ตัวอย่าง (วงกลมเปิด) ที่ผลิตขึ้นโดยวิธีมาตรฐาน (C) และวิธีการอบในตู้ไมโครเวฟด้วยกำลังไฟฟ้า 800 วัตต์เป็นเวลานาน 3 นาที (M)

วิธีการอบด้วยตู้ไมโครเวฟเตรียมสามารถแปรรูปใบชาสดให้เป็นผลิตภัณฑ์ใบชาเขียวอบแห้งที่สามารถเก็บไว้ได้นาน เมื่อทำการดื่มบริโภคหรือสกัดด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสก็จะได้สารสกัดชาเขียวที่มีปริมาณสารคะเตชินหลายตัวได้แก่ EGC, C, EGCG และ ECG (ยกเว้น C) ซึ่งเป็นสารอนุมูลคะเตเชินที่มีหมู่แกโลอิลจำนวน 1-2 หมู่เพิ่มมากขึ้นประมาณ 2-5 เท่า (ตารางที่ 3 และรูปที่ 3) โดยเฉพาะอย่างยิ่งสาร EGCG และ ECG ดังนั้นในระหว่างที่ทำการอบใบชาสดในตู้ไมโครเวฟ คลื่นไฟฟ้าจะทำให้เกิดความร้อนในปริมาณที่สูงจากด้านในของใบชา อาจจะทำให้ถุงหรือโพรงอาหาร (food vacuole) ซึ่งมีความแข็งแรงและเก็บบรรจุสารคะเตชินต่าง ๆไว้ เกิดการแตกตัวและปล่อยสารคะเตชินต่าง ๆออกมาก็เป็นได้

ตารางที่ 3 ปริมาณสารคะเตชินต่าง ๆ (ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ที่มีอยู่ในใบชาสดจำนวน 20 ตัวอย่างที่ไม่ได้ผ่านและผ่านการอบในตู้ไมโครเวฟกำลังไฟฟ้า 800 วัตต์นาน 3 นาที

ตัวอย่างใบชา	ปริมาณสารคะเตชิน (มิลลิกรัมต่อกรัม ใบชาสด)				
	EGC	C	EC	EGCG	ECG
ใบชาก่อนผ่านการอบในตู้ไมโครเวฟ	14.6±28.1	22.3±35.3	17.5±27.8	13.9±21.6	0.8±1.6
ใบชาหลังผ่านการอบในตู้ไมโครเวฟ	32.3±38.7	27.6±41.7	8.7±10.6	47.2±40.5	5.1±6.3



รูปที่ 3 ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของปริมาณสารคะเตชินชนิดต่าง ๆ (วงกลมปิด) ที่ตรวจวัดได้ในใบชาสดจำนวน 20 ตัวอย่างที่ไม่ได้ผ่าน (F) และผ่านการอบในตู้ไมโครเวฟด้วยกำลังไฟฟ้า 800 วัตต์เป็นเวลานาน 3 นาที (M) (วงกลมเปิด)

3.3 การวิเคราะห์คุณสมบัติต้านออกซิเดชัน

คุณสมบัติสำคัญยิ่งอย่างหนึ่งของผลิตภัณฑ์ชาคือความสามารถต้านการออกซิเดชันได้ จากการตรวจวัดความสามารถต้านการออกซิเดชันโดยอนุมูลอิสระในตัวอย่างใบชาสดที่ผ่านการทำให้แห้งด้วยวิธีการต่าง ๆพบว่า ใบชาที่ผ่านการอบด้วยเครื่องไมโครเวฟนาน 3 นาทีมีค่า TEAC สูงที่สุด สารสกัดใบชาที่ผ่านการอบด้วยเครื่องไมโครเวฟนาน 3 นาทีมีค่า TEAC ต่ำกว่าที่ผ่านวิธีการมาตรฐานที่ใช้สำหรับการผลิตใบชาเขียวแห้งสำหรับจำหน่ายเล็กน้อย (ตารางที่ 4) การที่ใบชาที่ผ่านการอบด้วยเครื่องไมโครเวฟนาน 3 นาทีมีค่า TEAC สูงคงเนื่องมาจากมีสารคะเตชินในปริมาณที่สูง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาวิจัยที่ผ่านมาที่แสดงให้เห็นว่าสารคะเตชินชนิด EGCG มีฤทธิ์ต้านการออกซิเดชันสูงสุด

ตารางที่ 4 ค่า TEAC ในสารสกัดชา (ความเข้มข้น 2 กรัมเปอร์เซ็นต์) ที่เตรียมได้จากวิธีการต่าง ๆ

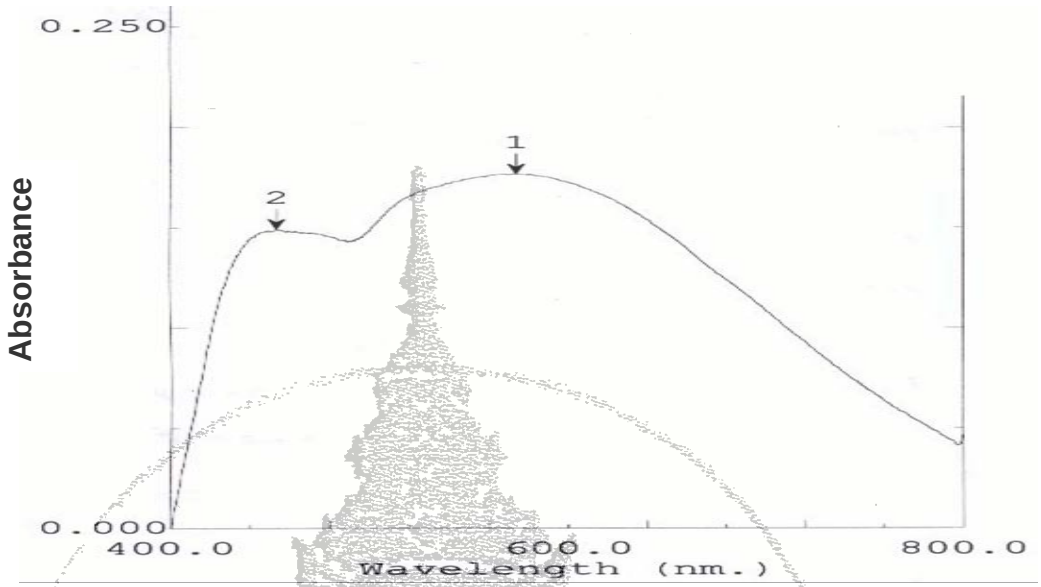
วิธีการเตรียมผลิตภัณฑ์ชาแห้ง	ค่า TEAC (มิลลิโมลาร์)
วิธีมาตรฐานสากลเชิงพาณิชย์	1.85±0.05
การอบในตู้ไมโครเวฟกำลังไฟฟ้า 800 วัตต์นาน 2 นาที	0.64±0.11
การอบในตู้ไมโครเวฟกำลังไฟฟ้า 800 วัตต์นาน 3 นาที	1.34±0.01
การคั่วบนกระทะร้อนนาน 2 นาที	0.39±0.14
การอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสนาน 16 ชั่วโมง	0.84±0.24
การนึ่งนาน 2 นาที	0.56±0.09

เมื่อนำปริมาณสารคะเตชินในสารสกัดชามาเปรียบเทียบหาความสัมพันธ์ร่วมกับกับความสามารถต้านทานการออกซิเดชันโดยอนุมูลอิสระโดยใช้ค่า TEAC เป็นตัวบ่งชี้ พบว่าค่า TEAC ที่วัดได้ค่อนข้างมีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณสาร EGCG ที่มีอยู่ในใบชา (r^2 = 0.377, n=4) เมื่อเทียบกับสารคะเตชิน ECG, EGC, C และ EC (r^2 = 0.222, 0.077, 0.026 และ 0.002 ตามลำดับ)

3.4 การวิเคราะห์คุณสมบัติด้านการจับธาตุเหล็ก

การศึกษาเชิงวิเคราะห์สเปคตรัม

เมื่อนำสารสกัดชาเขียวความเข้มข้น 2 กรัมเปอร์เซ็นต์มาบ่มกับสารละลายธาตุเหล็ก (100 μM Ferric nitrate in 0.1 N HNO_3) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นระหว่าง 400-800 นาโนเมตร โดยใช้หลอดที่บรรจุสารสกัดชาเขียวเป็นหลอด blank ผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่ามีสเปรคตรัมเกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 460 และ 560 นาโนเมตร (รูปที่ 4) ที่มีสาเหตุจากมีสารประกอบเชิงซ้อนใหม่ที่เกิดขึ้นระหว่างธาตุเหล็กกับสารที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดชาคาดว่าน่าจะเป็นสารคะเตชิน ซึ่งอาจจะเป็นสาร EGC, EGCG หรือ ECG และสอดคล้องกับรายงานวิจัยที่ผ่านมาว่าหมู่แกโลอิลในโมเลกุล EGC, ECG และ EGCG มีความสามารถในการจับกับธาตุเหล็กได้ (Morel et al., 1993; Grinberg et al., 1997; Samman et al., 2001)

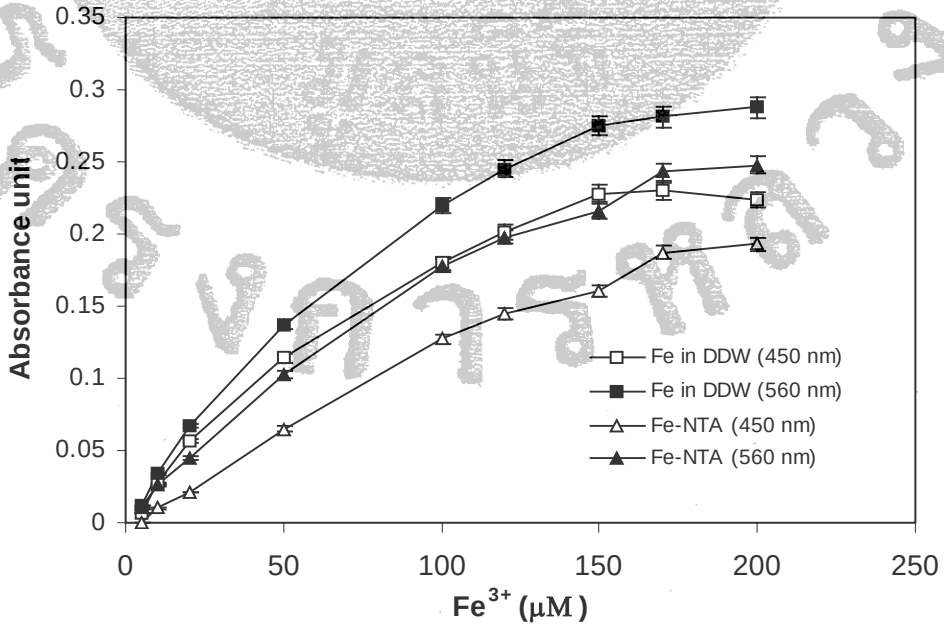


รูปที่ 4 สเปคตรัมการดูดกลืนแสงของสารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยาระหว่างสารสกัดชาเขียวความเข้มข้น 2 กรัมเปอร์เซ็นต์กับสารละลายเฟอร์ริคไนเตรทความเข้มข้น 100 ไมโครดมลาร์

การศึกษาเชิงจลศาสตร์

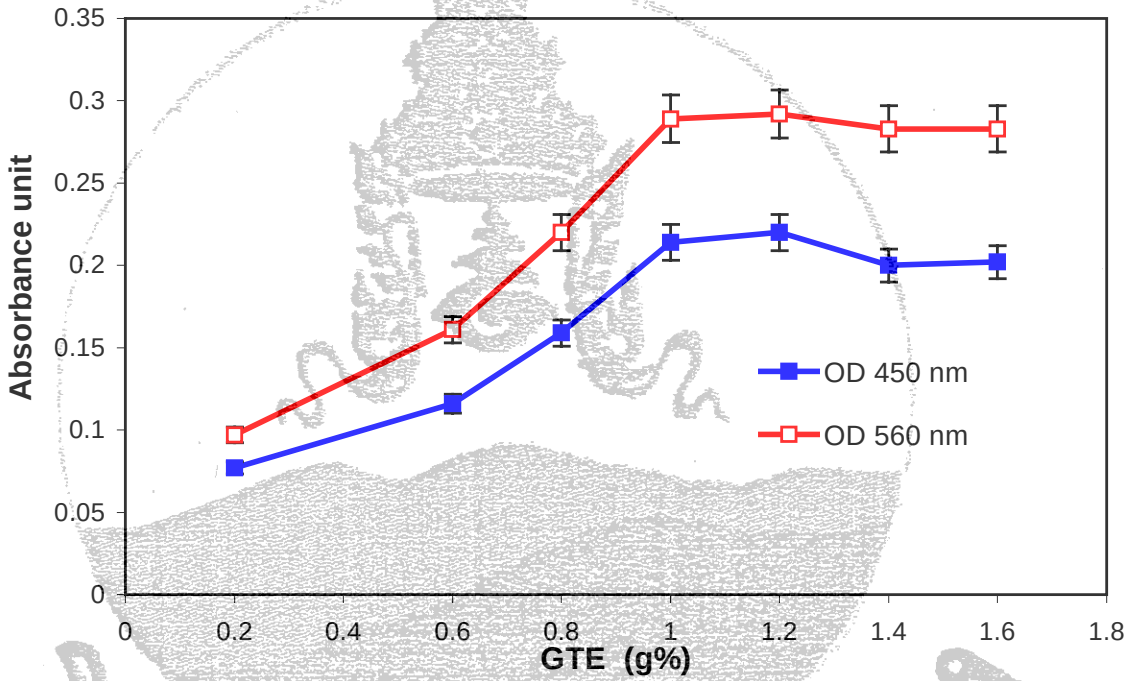
ผลิตภัณฑ์ใบชาเขียวแห้งดอยคำ

ในการศึกษาความสามารถของสารสกัดชาเขียวที่เป็นผลิตภัณฑ์ใบชาเขียวแห้งดอยคำในการจับธาตุเหล็กที่อยู่ในรูป Ferric nitrate (Fe-DDW)และรูป Ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA) ที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้สาร



รูปที่ 5 ผลความเข้มข้นของธาตุเหล็กในการทำปฏิกิริยากับสารสกัดชาเขียวความเข้มข้น 2 กรัมเปอร์เซ็นต์แล้วเกิดสารประกอบเชิงซ้อนซึ่งแสดงค่าดูดกลืนแสง (ค่าเฉลี่ย±ค่าความคลาดเคลื่อนจากการทดลอง 3 ครั้ง) ได้ดีที่ความยาวคลื่น 450 และ 560 นาโนเมตร

สกัดชาเขียวความเข้มข้น 2 กรัมเปอร์เซ็นต์ทำปฏิกิริยากับสารละลายธาตุเหล็กความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่ามีสารประกอบเชิงซ้อนใหม่ซึ่งมีคุณสมบัติดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 450 และ 560 นาโนเมตรเกิดขึ้นเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณความเข้มข้นของธาตุเหล็ก (dose-dependent manner) (รูปที่ 5) นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารสกัดชาเขียวที่ใช้ สารประกอบที่มีอยู่ในสารสกัดชาเขียวมีความสามารถในการจับกับธาตุเหล็กรูปเฟอร์ริคได้ดีกว่ารูปเฟอร์รัส (รูปที่ 6) ซึ่งความสามารถและศักยภาพดังกล่าวของสารสกัดชาเขียวที่มีอยู่คล้ายคลึงกับคุณสมบัติทางเคมีเบื้องต้นของยาขับเหล็กเดสเฟอริออกซามีน (desferrioxamine หรือ DFO) และดีเฟอริโพรน (deferiprone หรือ L1)

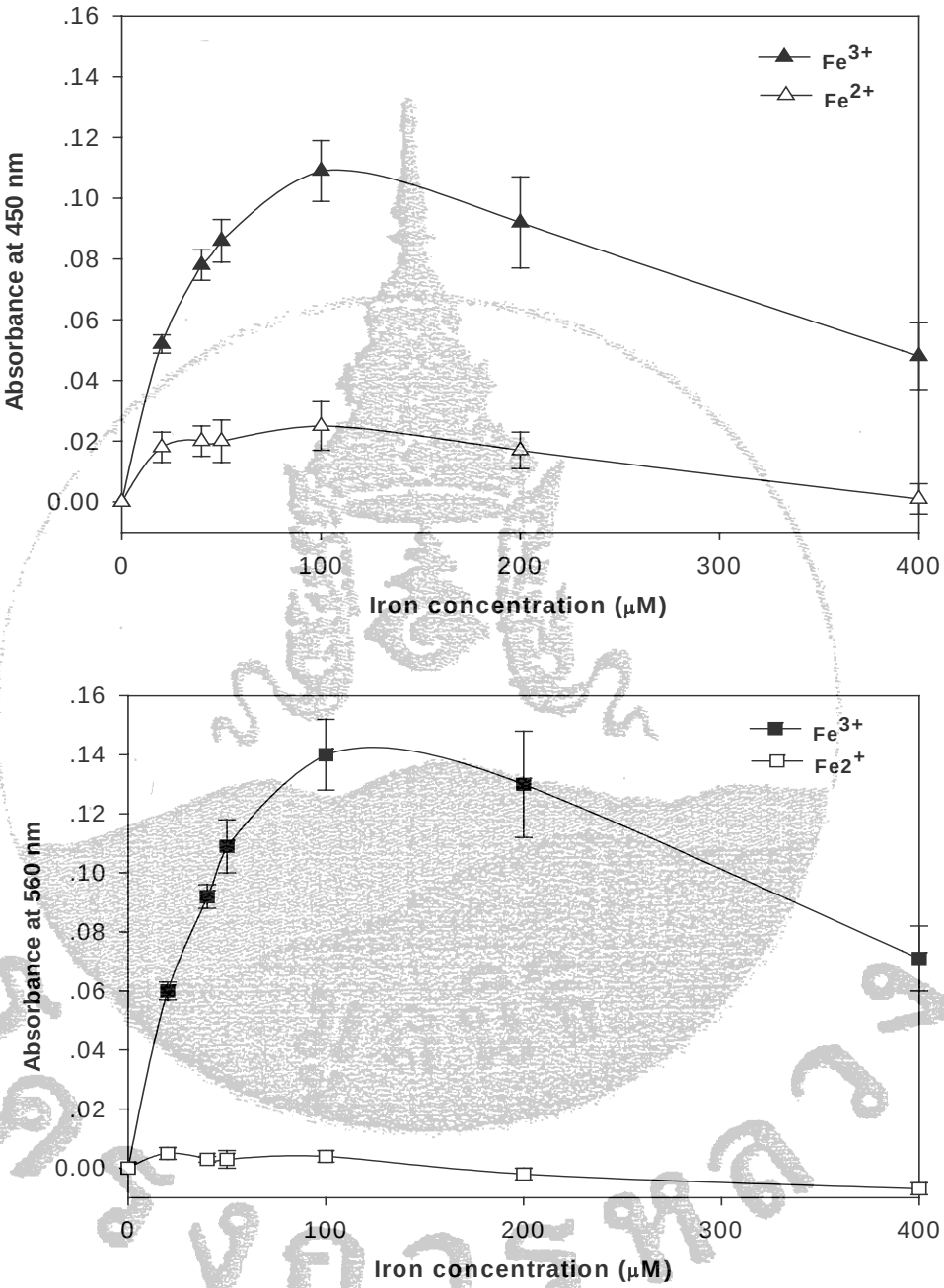


รูปที่ 6 ผลความเข้มข้นของสารสกัดชาเขียวในการทำปฏิกิริยากับสารละลายธาตุเหล็ก (100 μM Ferric nitrate in 0.1 N HNO_3) แล้วเกิดสารประกอบเชิงซ้อนซึ่งแสดงค่าดูดกลืนแสง (ค่าเฉลี่ย±ค่าความคลาดเคลื่อนจากการทดลอง 3 ครั้ง) ได้ดีที่ความยาวคลื่น 450 และ 560 นาโนเมตร

ผลิตภัณฑ์ชาเขียวแห้งจากกรรมวิธีการต่าง ๆ

งานวิจัยครั้งนี้มุ่งเน้นถึงกรรมวิธีการต่าง ๆเพื่อผลิตชาเขียวแห้งที่มีสารคะเตชินต่าง ๆโดยเฉพาะ EGCG คงอยู่ในปริมาณที่สูงและมีความสามารถในการจับธาตุเหล็กได้ดีด้วย การศึกษาที่ผ่านมาเบื้องต้นพบว่าชาเขียวแห้งที่เตรียมโดยการผ่านความร้อนในเตาไมโครเวฟที่ระดับความร้อน 800 วัตต์เป็นเวลา 3 นาที มีสารคะเตชินต่าง ๆโดยเฉพาะอย่างยิ่ง EGCG อยู่ในปริมาณที่สูงกว่าวิธีอื่น ดังนั้นจึงเลือกใช้ใบชาเขียวแห้งที่เตรียมโดยการผ่านความร้อนในเตาไมโครเวฟที่ระดับความร้อน 800 วัตต์เป็นเวลา 3 นาทีเพื่อสกัดเป็นสารละลายชาเขียวความเข้มข้น 2 กรัมเปอร์เซนต์ และนำมาใช้ในการศึกษาหาความสามารถในการจับธาตุเหล็ก (iron-chelating capacity) ทั้งที่อยู่ในรูปไอออนเฟอร์รัส(Fe^{2+}) และไอออนเฟอร์ริค (Fe^{3+})

ผลการทดลองในรูปที่ 7 ชาสกัดชาเขียวนี้มีความสามารถในการจับกับธาตุเหล็กรูปเฟอร์ริคได้ดีกว่ารูปเฟอร์รัสได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 และ 450 นาโนเมตร ลักษณะ



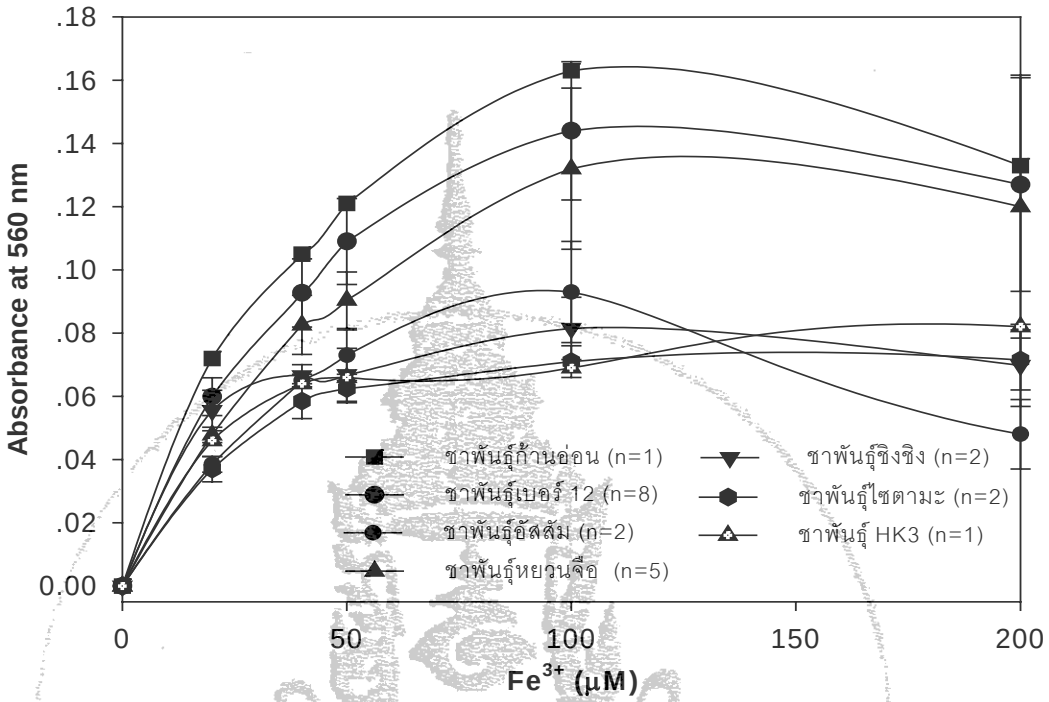
รูปที่ 7 ผลความเข้มข้นของธาตุเหล็กรูปเฟอร์รัส (สามเหลี่ยมและสีเหลี่ยมโปร่ง) และรูปเฟอร์ริค (สามเหลี่ยมและสีเหลี่ยมทึบ) ในการทำปฏิกิริยากับสารสกัดชาเขียวความเข้มข้น 2 กรัมเปอร์เซ็นต์ที่เตรียมจากใบชาเขียวที่ผ่านการอบแห้งในตู้ไมโครเวฟจำนวน 23 ตัวอย่าง ทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนซึ่งแสดงค่าดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 450 และ 560 นาโนเมตร

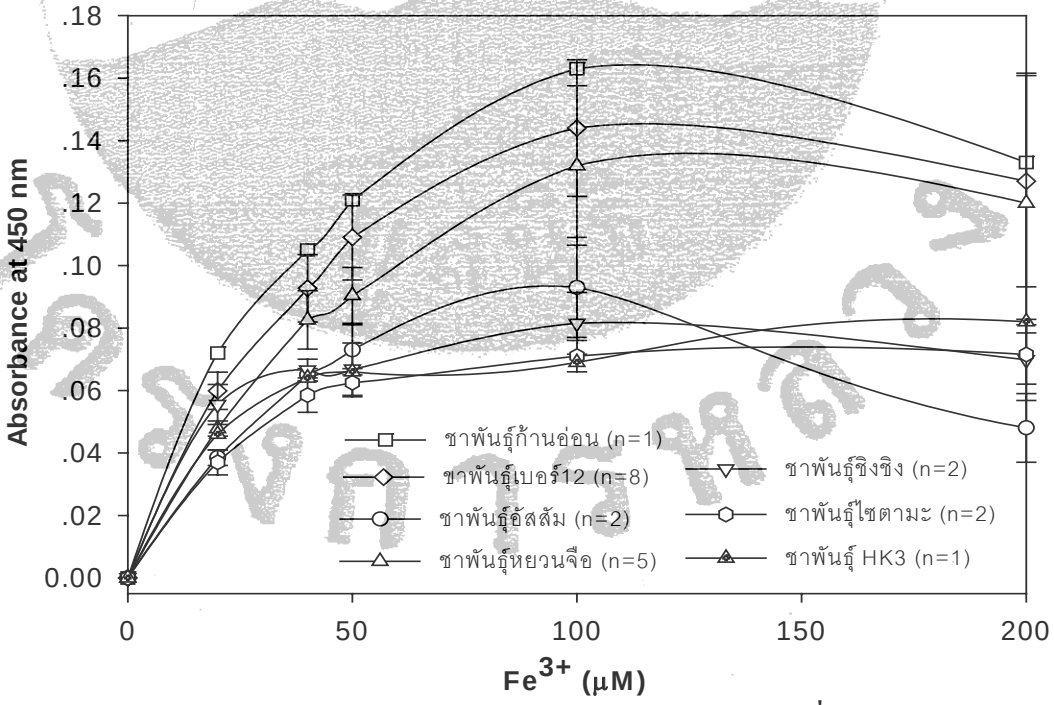
การจับกันนี้ขึ้นอยู่กับปริมาณธาตุเหล็ก (dose-dependent manner) ในช่วงระหว่าง 0-100 ไมโครโมลาร์ และที่ค่าความเข้มข้นของธาตุเหล็กสูงกว่า 100 ไมโครโมลาร์ค่าการดูดกลืนแสงที่ทั้งสองความยาวคลื่นนี้หรือความสามารถในการจับกันระหว่างธาตุเหล็กกับสารประกอบในสารสกัดชาจะลดลงเป็นสัดส่วนกับปริมาณธาตุเหล็ก

ที่เติมลงไป ซึ่งเป็นไปได้ว่าปริมาณธาตุเหล็กที่สูงเกินนี้อาจเหนี่ยวนำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับสารประกอบในสารสกัดชาโดยเฉพาะอย่างยิ่งกลุ่มสารคะเตชิน ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเป็นรูปอนุมูลอิสระขึ้น ทำให้ความสามารถในการเกิดพันธะกระทำร่วม (co-ordination bond) ระหว่างไอออนธาตุเหล็กกับหมู่ต่าง ๆบนโมเลกุลสารประกอบนั้นลดลงก็เป็นได้ ผลที่ได้นี้สอดคล้องกับผลการศึกษาที่ใช้สารสกัดชาเขียวที่เป็นผลิตภัณฑ์ดอยคำ (รูปที่ 5) อาจกล่าวได้ว่าสารสกัดชาเขียวทั้งที่เป็นผลิตภัณฑ์พาณิชย์และผลิตภัณฑ์ที่พัฒนากรรมวิธีการผลิตโดยการอบในตู้ไมโครเวฟมีความสามารถในการจับกับธาตุเหล็กรูปเฟอร์ริคได้ดีในลักษณะที่ขึ้นกับปริมาณที่ได้และมีความสามารถที่ดีอยู่ในช่วงระดับความเข้มข้นหนึ่ง

ผลของชาสายพันธุ์ต่าง ๆต่อความสามารถในการจับธาตุเหล็กในหลอดทดลอง

คณะผู้วิจัยยังได้ศึกษาหาความแตกต่างของสารพันธุ์ชาต่าง ๆกับความสามารถในการจับธาตุเหล็กรูปเฟอร์รัสโดยสารสกัดชาเขียวที่ได้จาการนำใบชาพันธุ์ต่าง ๆมาอบให้แห้งในตู้ไมโครเวฟนาน 3 นาที ผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่า ชาพันธุ์ก้านอ่อน (1 ตัวอย่าง) สามารถจับธาตุเหล็กได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับชาพันธุ์อื่น ๆ รองลงมาตามลำดับดังนี้พันธุ์เบอร์12 (8 ตัวอย่าง)>พันธุ์หยวนจืออู่หลง (5 ตัวอย่าง)>พันธุ์อัสสัม (2 ตัวอย่าง)>พันธุ์ชิงชิง (2 ตัวอย่าง)>พันธุ์ไซตามะ (1 ตัวอย่าง)=พันธุ์HK3 (1 ตัวอย่าง) ความสามารถในการจับกับธาตุเหล็กโดยสารสกัดชาเขียวพันธุ์ต่าง ๆ (ความเข้นข้น 2 กรัมเปอร์เซ็นต์) เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของธาตุเหล็กที่ใช้ (dose-dependent manner) และมีค่าสูงสุดอยู่ที่ค่าความเข้มข้นของธาตุเหล็กเท่ากับ 100 ไมโครโมลาร์ แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของธาตุเหล็กขึ้นไปเป็น 200 ไมโครโมลาร์พบว่าความสามารถในการจับธาตุเหล็กโดยสารสกัดชาเขียวทุกตัวอย่างลดน้อยลง ดังนั้นจึงพอสรุปได้ว่าสายพันธุ์ชาชนิดต่าง ๆที่นำมาเตรียมเป็นใบชาเขียวแห้งโดยการอบในตู้ไมโครเวฟอาจมีปริมาณสารที่มีคุณสมบัติในการจับธาตุเหล็ก (iron-chelating property) อยู่ในปริมาณที่แตกต่างกัน จึงทำให้มีคุณสมบัติหรือความสามารถในการจับกับธาตุเหล็กรูปเฟอร์ริคได้แตกต่างกัน แต่ยังไม่สามารถบอกได้ว่าสารประกอบตัวใดหรือสารคะเตชินตัวใดในสารสกัดชาเขียวที่มีบทบาทหรือมีความสามารถอีกอย่างหนึ่งที่ดีในการจับธาตุเหล็ก นอกเหนือจากการมีคุณสมบัติต้านการออกซิเดชันหรือทำลายอนุมูล





รูปที่ 8 ความสามารถของสารสกัดชาเขียว (ความเข้มข้น 2 กรัมเปอร์เซ็นต์) ที่เตรียมจากใบชาพันธุ์ต่าง ๆที่ผ่านการอบแห้งในตู้ไมโครเวฟในการทำปฏิกิริยากับธาตุเหล็กรูปเฟอร์ริคที่ความเข้มข้นต่าง ๆและทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนซึ่งแสดงค่าดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 450 และ 560 นาโนเมตร

4. สรุปผลการทดลอง

การเตรียมผลิตภัณฑ์ใบชาแห้งจากใบชาสดที่เก็บได้จากศูนย์ผลิตชาโครงการหลวงโดยการอบด้วยเครื่องไมโครเวฟที่ระดับความร้อน 800 วัตต์ (ประมาณ 600 องศาเซลเซียส) เป็นเวลานาน 3 นาที จะทำให้ได้ใบชาที่มีสารคะเตชินต่าง ๆโดยเฉพาะอย่างยิ่งสาร EGCG ในปริมาณที่สูง มีคุณสมบัติต้านการออกซิเดชันและการจับธาตุเหล็กรูปเฟอร์ริคได้ดีกว่าวิธีการคั่วในกระทะร้อนและการนึ่งด้วยไอน้ำเวลาเท่า ๆกัน รวมถึงการอบที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสนาน 16 ชั่วโมงและแแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สารสกัดชาเขียวจากผลิตภัณฑ์ชาเขียวดอยคำและผลิตภัณฑ์ชาเขียวแห้งผ่านการอบในตู้ไมโครเวฟที่คณะผู้วิจัยพัฒนามีความสามารถในการจับธาตุเหล็กรูปเฟอร์ริคได้ดีกว่ารูปเฟอร์รัส โดยมีลักษณะการกระทำที่ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารสกัดชาและธาตุเหล็กที่ใช้ สายพันธุ์ชาที่นำมาเตรียมเป็นผลิตภัณฑ์ชาเขียวอบแห้งอาจเป็นปัจจัยอีกอย่างหนึ่งที่มีผลต่อความสามารถในการจับกับธาตุเหล็ก แม้ว่าคุณสมบัติต่าง ๆเหล่านี้ที่วัดได้ในสารสกัดใบชาแห้ง (ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์) ที่เตรียมจากการอบด้วยเครื่องไมโครเวฟที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 3 นาทีจะต่ำกว่าในสารสกัดใบชาแห้ง (ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์) ที่เตรียมขึ้นมาจากวิธีเชิงพาณิชย์ที่ใช้ในปัจจุบัน แต่ก็มีความสะดวก รวดเร็วและประหยัดกว่า สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในระดับครัวเรือนเพื่อเป็นกรรมวิธีการผลิตใบชาแห้งที่มีคุณสมบัติต้านการออกซิเดชันได้ดี และมีความเหมาะสมกับอาชีพเกษตรกรไร่ชาที่มีรายได้ต่ำ การศึกษาที่จะทำต่อไปเกี่ยวข้องกับคุณสมบัติของสารสกัดชาในการต้านภาวะอนุมูลอิสระมากเกินและจับธาตุเหล็กในหนูทดลอง เซลล์ตับปฐมภูมิและเซลล์ตับเพาะเลี้ยง การศึกษาเปรียบเทียบปริมาณของสารคะเตชินและจลศาสตร์ของสารคะเตชินแต่ละชนิดในสารสกัดชาเขียวต่อการต้านการเกิดอนุมูลอิสระและการจับธาตุเหล็ก

เอกสารอ้างอิง

1. Bronner WE. and Beecher GR. (1998) Method for Determining the Content of Catechins in Tea Infusions by High-Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A.* 805(1-2);137-144
2. Chen ZY, Zhu QY, Tsang D and Huang Y. (2001) Degradation of green tea catechins in tea drinks. *J. Agric. Food Chem.* 49;477-482
3. Cutter H, Wu LY, Kim C, Morre DJ and Morre DM. (2001) Is the Cancer Protective Effect Correlated with Growth Inhibitions by Green Tea (-)-Epigallocatechin gallate Mediated Through an Antioxidant Mechanism? *Cancer Lett.* 162(2);149-154
4. Graham HN. (1992) Green Tea Composition, Consumption, and Polyphenol Chemistry. *Prev. Med.* 21(3);334-350
5. Grinberg LN, Newmark H, Kitrossky N, Rahamim E, Chevion M and Rachmilewitz EA. (1997) Protective Effects of Tea Polyphenols Against Oxidative Damage to Red Blood Cells. *Biochem Pharmacol.* 54(9);973-9
6. *de* Groot,H. and Rauen,U. (1998) Tissue Injury by Neactive Oxygen Species and the Protective Effects of Flavonoids. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 12(3);249-255
7. Guo Q, Zhao B, Li M, Shen S and Xin W. (1996) Studies on protective mechanisms of four components of green tea polyphenols against lipid peroxidation in synaptosomes. *Biochim. Biophys. Acta* 1304(3);210-222

8. Higuchi A, Yonemitsu K, Ako Koreeda and Tsunenari S. (2003) Inhibitory activity of epigallocatechin gallate (EGCg) in paraquat-induced microsomal lipid peroxidation-a mechanism of protective effects of EGCg against paraquat toxicity. *Toxicol.* 183;143-149
9. Iwahashi H, Ishii T, Sugata R and Kido R. (1990) The Effects of Caffeic Acid and Its Related Catechols on Hydroxyl Radical Formation by 3-hydroxyanthranilic Acid, Ferric Chloride, and Hydrogen Peroxide. *Arch. Biochem. Biophys.* 276(1);242-247
10. Kostyuk VA, Potapovich AI, Vladykovskaya EN and Hiramatsu M. (2000) Protective Effects of Green Tea Catechins Against Asbestos-Induced Cell Injury. *Planta Med.* 66(8);762-764
11. Kumamoto M, Sonda T, Nagayama K and Tabata M. (2001) Effects of pH and Metal Ions on Antioxidative Activities of Catechins. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65(1);126-132
12. Mira L, Fernandez MT, Santos M, Rocha R, Florencio MH and Jennings KR. (2002) Interactions of Flavonoids with Iron and Copper Ions: a Mechanism for Their Antioxidant Activity. *Free Radic. Res.* 36(11);1199-1208
13. Miyazawa T. (1999) Tea Catechin Supplementation Increases Antioxidant Capacity and Prevents Phospholipid Hydroperoxidation in Plasma of Humans. *J. Agric. Food Chem.* 47(10);3967-3973
14. Morel I, Lescoat G, Cogrel P, Sergent O, Pasdeloup N, Brissot P, Cillard P and Cillard J. (1993) Antioxidant and Iron-Chelating Activities of the Flavonoids Catechin, Quercetin and Diosmetin on Iron-Loaded Rat Hepatocyte Cultures. *Biochem. Pharmacol.* 45(1);13-19
15. Nakagawa K, Ninomiya M, Okubo MT, Aoi N, Juneja LR, Kim M, Yamanaka K and Samman S, Sandstrom B, Toft MB, Bukhave K, Jensen M, Sorensen SS and Hansen M. (2001) Green tea or rosemary extract added to foods reduces nonheme-iron absorption. *Am. J. Clin. Nutr.* 73(3);607-612
16. Ouanjaijean,S., Khansuwan,U. and Srichairatanakool,S. Analysis of Antioxidant and Iron-Chelating Properties of Tea Catechins. 28th Congress on Science and Technology of Thailand. October 24-26, 2002. Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok.
17. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M and Rice-Evans C. (1999) Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26(9-10);1231-1237
18. Roy M, Chakrabarty S, Sinha D, Bhattacharya RK and Siddiqi M. (2003) Antilastogenic, antigenotoxic and apoptotoc activity of epigallocatechin gallate: a green tea polyphenol. *Mutat. Res.* 523;33-41
19. Toschi TG, Bordoni A, Hrelia S, Bendini A, Lercker G and Biagi PL. (2000) The protective role of different green tea extracts after oxidative damage is related to their catechin composition. *J. Agric. Food Chem.* 48(9);3973-3978
20. Wang H. and Joseph JA. (1999) Quantifying Cellular Oxidative Stress by Dichlorofluorescein Assay Using Microplate Reader. *Free Radic. Biol. Med.* 27(5-6); 612-616

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้ทำการวิจัยขอขอบคุณมูลนิธิโครงการหลวงที่ได้กรุณาอนุเคราะห์จัดสรรงบประมาณทุนวิจัยในการศึกษาทำวิจัยนี้ อีกทั้งขอแสดงความขอบคุณอย่างยิ่งต่อเจ้าหน้าที่มูลนิธิโครงการหลวงแผนกต่าง ๆได้แก่ ฝ่ายวิจัย ศูนย์ผลิตชาที่ม่อนเงาะ ขุนวาง แม่ปูนหลวง ดอยอ่างขาง ห้วยน้ำขุ่นและปางดะ ตลอดจนแผนกยานพาหนะทุกท่านที่ได้มีส่วนร่วมและอำนวยความสะดวก ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงลงได้ตามเวลาและวัตถุประสงค์ทุกประการ

โครงการหลวง