การพัฒนาสารสกัดจากชาอัสสัมเพื่อประยุกต์ใช้ในเครื่องสำอาง

Development of Assam Tea Extraction for Cosmetic Application

ระหงษ์ วงศ์เกียรติขจร

อีเมล์: rahong09@hotmail.com

หลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

อาจารย์ ดร.ณัตฐาวุฒิ ฐิติปราโมทย์ อาจารย์ที่ปรึกษา

อีเมล์: natthawut.thi@mfu.ac.th

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มุ่งศึกษาการพัฒนาสารสกัดชาอัสสัมที่มีมาตรฐาน เพื่อประยุกต์ใช้ในเครื่องสำอาง โดยสกัดชาอัสสัมใบแก่ด้วยวิธีเขย่า ที่ 150 รอบต่อนาที อัตราส่วนตัวอย่าง ต่อ ตัวทำละลาย (70 % อะซิโตน) 1:50 w/v ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พร้อมทั้งศึกษาองค์ประกอบของสารสกัด เพื่อหาเอกลักษณ์ของสารสกัด ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง(High performance liquid chromatography, HPLC) ผลการศึกษาพบว่าได้ร้อยละผลผลิตของสารสกัดชาอัสสัมเท่ากับ 1.26±0.0224 ของน้ำหนักแห้งของสารสกัด โดยมีปริมาณรวมของสารกลุ่มฟีนอลิก เท่ากับ 2.822±0.031 mg GAE/g extract ปริมาณรวมสารกลุ่มฟลาโวนอยล์ เท่ากับ 0.973±0.004 mg QE/g extract และมีปริมาณรวมสารกลุ่มโปรแอนโทไซยานิดิน เท่ากับ 0.729±0.039 mg ECE/g extract ประกอบกับผลการศึกษาโครมาโทแกรมของสารสกัดชาอัสสัม พบว่ามีลักษณะโครมาโทแกรมคล้ายคลึงกัน ดังนั้นสารสกัดจึงมีองค์ประกอบสารและปริมาณสารที่คล้ายคลึงกัน นอกจากนี้ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดชาอัสสัม พบว่าสารสกัดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระใกล้เคียงกัน โดยมีฤทธิ์ DPPH radical scavenging เท่ากับ 92.16 ± 0.46 mg TEAC/g extract ,ฤทธิ์ ABTS activity เท่ากับ 86.53±0.265 mg TEAC/g extract และฤทธิ์ FRAP เท่ากับ 22.96±0.36 mg mg TEAC/g extract ผลการศึกษา แสดงให้เห็นว่า สารสกัดชาอัสสัมใบแก่ถูกสกัดด้วยวิธีมาตรฐาน ทำให้ได้สารออกออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นสารออกฤทธิ์ในเครื่องสำอางได้และยังเป็นการเพิ่มมูลค่าใบชาแก่ที่เหลือจากการเก็บเกี่ยวอีกด้วย

คำสำคัญ : ชาอัสสัม/ฟลาโวนอย/ฟีนอลิก/โปรแอนโทไซยานิดิน/ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ABSTRACT

The objective of this study was to develop the standard extract from mature leaf of assam tea by using the shaking method with 70% acetone at ratio sample: solvent 1:50 w/v at 150 round per minute, 30 degree celsius for 3 hours. Extract was repeated three times at the same condition for standardized the extraction method. All extracts were determined the bioactive compounds (total of phenolic, flavonoid and proanthocyanidin contents) and investigated the chromatogram of these extracts by high performance liquid chromatography (HPLC) as well as determined their antioxidant activity (DPPH, ABTS radical scavenging and FRAP activities). The results showed that the extractable yield 1.26±0.0224 dry basis . The bioactive compounds were similar values that their total of phenolic compounds were 2.822±0.031 mg GAE/g extract and their total flavonoid content were 0.973±0.004 mg QE/g extract as well as the proanthocyanidin content of these extracts were 0.729±0.039 mg ECE/g extract . Moreover, the investigation on chromatogram of these extracts by HPLC showed that chromatogram of these extracts was similar together with composed of catechin, epicatechin and other. In the determination of antioxidant activity, these assam tea leaf extracts exhibited the similar antioxidant activity that the DPPH radical scavenging of these extracts were 92.16 ± 0.46 mg TEAC/g extract and ABTS activity were 86.53±0.265 mg TEAC/g extract as well as FRAP were 22.96±0.36 mg TEAC/g extract . The results suggested that the method of extraction for preparation the mature leaf of assam tea extract can be used as standard method. It resulted the extract which composed of high bioactive compounds (phenolic, flavonoid and proanthocyanidin) and antioxidant capacity. It can be applied as active ingredient in cosmetic and other products.

Keyword: antioxidant/assam tea/flavonoid/ phenolic/proanthocyanidin

บทนำ

ชาอัสสัม (*Camellia sinensis* var. *assamica*) เป็นชา 1ใน 2 สายพันธุ์ที่ปลูกมากในภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย โดยเฉพาะที่จังหวัดเชียงราย แต่เป็นพืชที่มีมูลค่าต่ำ เนื่องจากนิยมปลูกเพื่อนำใบส่วนบนมาผ่านกระบวนการหมักผลิตเป็นผลิตภัณฑ์เมี่ยง โดยใช้ใบชาอัสสัมที่มีความแก่ของใบในระยะปานกลาง ด้วยการเด็ดจากยอดชา นับจากยอดชาและนับจากยอดลงมาจนถึงใบที่ 3-4 หากใช้ใบที่แก่กว่านี้ จะได้เมี่ยงที่มีรสชาติขมและฝาดจนเกินไป ไม่นิยมรับประทาน ทำให้มีใบชาอัสสัมส่วนที่เหลือใช้จำนวนมาก จากการศึกษาที่ผ่านมา ในการศึกษาการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ จากใบชาอัสสัม ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ต่างๆ พบว่า ใบชาอัสสัมมีสารต้านอนุมูลอิสระสูง นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในใบชาอัสสัม ที่มีความแก่ของใบที่แตกต่างกัน พบว่าชาอัสสัมใบแก่บริเวณโคนต้นก็ยังมีสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระอยู่ และสารออกฤทธิ์เหล่านั้นเป็นสารกลุ่มโพลีฟีนอล และสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ฉะนั้นชาอัสสัมใบแก่ จึงสามารถนำมาสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เพื่อนำมาใช้เป็นสารสำคัญในเครื่องสำอาง แต่อย่างไรก็ตาม การกำหนดมาตรฐานการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เพื่อให้ได้ฤทธิ์และปริมาณสารดังกล่าวข้างต้น จึงเป็นสิ่งสำคัญเพื่อให้ได้สารสำคัญในการประยุกต์ใช้ในเครื่องสำอาง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงพัฒนาและกำหนดมาตรฐานการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากชาอัสสัมใบแก่เพื่อให้ได้มาตรฐานซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในเครื่องสำอางได้ และยังเป็นการเพิ่มมูลค่าชาท้องถิ่นของภาคเหนือและใช้ประโยชน์ใบชาอัสสัมที่เหลือจากกระบวนการผลิตชา

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อกำหนดมาตรฐานการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากชาอัสสัมใบแก่
2. เพื่อวิเคราะห์หาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดที่ได้ซึ่งจะสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในเครื่องสำอาง

ขอบเขตการวิจัย

1. กำหนดมาตรฐานการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในชาอัสสัมใบแก่
2. การวิเคราะห์หาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัด
3. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด
4. การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

การทบทวนวรรณกรรม

1. แนวคิด หลักการทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

1.1 อนุกรมวิธาน (Taxonomy) ของชาอัสสัม

Carl von Linne นักวิทยาศาสตร์ชาวสวิสเซอร์แลนด์ ใช้ชื่อวิทยาศาสตร์ของต้นชาอัสสัมในหนังสือของเขาเป็นคนแรกในปี ค.ศ. 1753 ว่า *Thea sinensis* (L.) (คำว่า sinensis เป็นชื่อเรียกประเทศจีนในภาษาละติน) (ธีรพงษ์ เทพกรณ์, 2555)

Kingdom:	Plantae- Planta, plantes, plants, Vegeta
Subkingdom:	Tracheobionta- vascular plants
Division:	Magnoliophyta – angiosperms, flowering plants
Class:	Magnoliophyta- dicots, dicotyledons
Subclass:	Dileniidae
Order:	Theales
Family:	Theaceae- tea
Genus:	Camellia L- camellia
Spicies:	*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze-tea
Variety:	*Camellia sinensis* var.*assamica* (J. Masters) Kilam-Assam tea

ที่มา ธีรพงษ์ เทพกรณ์, 2555

ตารางที่ 1 ตารางแสดงอนุกรมวิธานของชาอัสสัม

.

1.2 ความสำคัญของชาอัสสัมในประเทศไทย

พันธุ์ชาที่ปลูกทางการค้าของไทย โดยทั่วไป แบ่งได้เป็น 2 พันธุ์ใหญ่ ๆ ได้แก่ กลุ่มชาพันธุ์อัสสัม (Assam tea) และกลุ่มชาพันธุ์จีน (Chinese tea) (ธีรพงษ์ เทพกรณ์,2557)

ผลผลิตชาอัสสัม ในปี พ.ศ.2550 นักวิจัยได้ทำการสำรวจพื้นที่ปลูกเมี่ยงของประเทศไทยซึ่งอยู่ในพื้นที่ จังหวัดภาคเหนือตอนบน ได้แก่ เชียงราย เชียงใหม่ น่าน แพร่ แม่ฮ่องสอน และลำปาง มีพื้นที่รวมประมาณ 41,946 ไร่ เมื่อคำนวณได้ผลผลิตเมี่ยงเฉลี่ย จำนวน 18,622 ตันต่อปี สร้างรายได้เฉลี่ยมูลค่า 229,360,251 บาทต่อปี แม้ว่าแนวโน้มการบริโภคเมี่ยงจะลดลง เนื่องจากกลุ่มคนที่บริโภคเมี่ยงส่วนใหญ่ โดยมากจะเป็นผู้สูงอายุ แต่ก็คาดว่าปริมาณการผลิตเมี่ยงจะยังคงอยู่ที่ประมาณปีละเกือบสองหมื่นตัน

1.3 การใช้ประโยชน์จากชาอัสสัม

1.3.1 การทำเมี่ยง การเก็บใบเมี่ยงสดมักจะมี 2 แบบ คือ แบบแรก จะเก็บในส่วนของใบเมี่ยงอ่อน (ใบที่ 4-6) โดยตัดเอาส่วนปลายใบประมาณ 2 ในสามส่วน มัดเป็นก้อน ให้ได้ขนาดประมาณ 400-500 กรัม จะพบได้ ในแหล่งผลิตเมี่ยง ในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่และเชียงราย อีกแบบหนึ่งคือ การเก็บใบเมี่ยงทั้งใบ เก็บทั้งส่วนที่เป็นใบอ่อนและการเก็บส่วนยอด มารวบมัดเป็นกำๆ เรียงใบ เรียกว่า เก็บเป็นแหลบ เรียกว่า เมี่ยงแหลบ ส่วนยอดสามารถเก็บรวมมากับใบเมี่ยงให้ได้ขนาดประมาณ 150 – 200 กรัม จะพบได้ในแหล่งผลิตเมี่ยงในพื้นที่จังหวัดแพร่และน่าน การเก็บใบเมี่ยงสด จะเก็บในตอนเช้าตรู่ของแต่ละวัน แล้วนำใบสดมานึ่งในตอนสายหรือตอนเย็นของวันนั้นๆ หมุนเวียนเปลี่ยนไปในแต่ละวันตามจุดต่างๆ ภายในสวน (สถาบันชา มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง, 2558)

1.3.2 การเก็บเกี่ยวชา (Tea plucking) ใช้แรงงานคนในการแก็บ โดยจะต้องเลือกเก็บเฉพาะยอดชาที่ตูมและใบที่ต่ำจากยอดตูมลงมา 2-3 ใบ (เก็บ 1 ยอด 2-3ใบ) เนื่องจากสารประกอบโพลิฟีนอลซึ่งเป็นสารสำคัญที่ส่งผลต่อสี กลิ่น และรสชาติของชาจะมีอยู่มากเฉพาะในยอดชาเท่านั้น การเก็บชา จะเริ่มตั้งแต่เดือนมีนาคม จนถึงเดือนพฤศจิกายน โดยเฉลี่ย จะเก็บยอดชา 10 วันต่อครั้ง ช่วงเวลาที่เหมาะสมประมาณ 05.00-14.00 น. การเก็บยอดชาจะต้อง ไม่อัดแน่นในตะกร้าหรือกระสอบ เพราะ จะทำให้ยอดชาช้ำ และคุณภาพใบชาเสียได้เนื่องจากความร้อนที่เกิดขึ้น จากการหายใจของใบชา หลังจากเก็บเกี่ยวใบชาแล้ว จะต้องรีบนำส่งโรงงานผลิตภายใน 3-4 ชั่วโมง เพื่อจะได้สามารถผลิตชาคุณภาพดี (ธีรพงษ์ เทพกรณ์,2556)

1.3.3 ใช้ประโยชน์ทางผิวหนังและด้านเครื่องสำอาง พบว่า สารกลุ่มกาโลคาเทชินช่วยป้องกันอันตรายจากรังสีอุลต้าไวโอเล็ตที่ผิวหนัง จึงช่วยป้องกันมะเร็งผิวหนัง ช่วยป้องกันผิวหนังจากรังสียูวีบี โดย EGCG จะไปป้องกันการกระตุ้น AP-1 transcription factor และในขณะเดียวกัน ECGC จะไปป้องกันเซลล์เหล่านี้จากรังสียูวีเอ โดยไปยับยั้งการกระตุ้นเอนไซม์ไซโครจีเนส และป้องกันการหลั่งสารอินเตอร์ลูคิน ได้แก่ IL-1,IL-10 และIL-12นอกจากนี้ยังพบว่า EGCG ช่วยกระตุ้นเอนไซม์Capsase-14 ซึ่งจะช่วยเสริมการเปลี่ยนแปลงเซลล์ผิวหนัง ไปเป็นชั้นผิวหนังกำพร้า นอกจากนี้ยังพบว่า EGCG ยังช่วยยับยั้งการเกิดภาวะเครียด โดยไปทำให้เอนไซม์ Capase-3หมดฤทธิ์ การยับยั้งCapsase-14 ที่จะทำให้การเปลี่ยนแปลงเซลล์ผิวหนัง ไปเป็นชั้นผิวหนังกำพร้า เพราะถ้าเซลล์ผิวหนังผิดปกติไป จะทำให้เกิดภาวะโรค เช่น Psoriasis ดังนั้นจึงสามารถใช้ร่วมกับการใช้ UVB therapy ในการรักษา Psoriasis ได้ นอกจากนี้ EGCG สามารถยับยั้งเอนไซม์ 5-α-Reductase

type-1 พบอยู่ในต่อมไขมัน ซึ่งเอนไซม์นี้จะช่วยยั้บยั้งการหลั่ง Dehydrotestosterone ซึ่งกระตุ้นการหลั่งไขมันที่ก่อให้เกิดรังแคและนำไปสู่ภาวะผมร่วงในชาย (Androgenic alopecia) จึงมีการนำ EGCG ไปใช้ในการป้องกันโรค Seborrheic dermatitis ด้วย (พิมพร ลีลาพรพิสิฐ.2554ก)

1.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1.2.1 การหาปริมาณสาร Epicatechin gallate และอนุพันธ์ของคาเทชินในชาจีนและชาอัสสัม พบว่าใบชาอัสสัมมีสารสำคัญกลุ่มคาเทชิน 7 ชนิด ได้แก่ Epigallocatechin gallate (EGCG) และอนุพันธ์ของคาเทชินอีก 6 ชนิด ได้แก่ Gallocatechin (GC),-(-)Epigallocatechin (EGC),-(-)Epicatechin, gallocatechin gallaqte (GCG),-(-)Gallocatechin gallate (GCG),(-)Catechin gallate (CG) พบว่าใบชาอัสสัมมีสารสำคัญทั้ง 7 ชนิด มีปริมาณระหว่าง 3.07-2.43 mg/g น้ำหนักแห้ง โดยพบสาร GCในปริมาณสูงสุดเท่ากับ 12.43 mg/g น้ำหนักแห้ง และพบปริมาณต่ำที่สุดคือ ECGโดยพบเท่ากับ 3.07 mg/gน้ำหนักแห้ง(นภาพร แซ่ลี้, อรพิน เกิดชูชื่น และณัฏฐา เลาหกุลจิตต์, 2552)

1.2.2 การหาปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากใบชาอัสสัมต่างวัย โดยผลการศึกษาเปรียบเทียบปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสกัดได้จากใบชาอัสสัม ที่มีอายุของใบแตกต่างกัน 3 ช่วงวัย ได้แก่ ยอดอ่อน ซึ่งเป็น 1-3 ใบแรกที่เพิ่งแตกออกมา, ใบอ่อน ซึ่งเป็นใบที่ 4-6 ถัดลงมาจากยอดอ่อน, ใบแก่ ซึ่งเป็น 1-3 ใบจากโคนล่างของพุ่มต้นชาโดยใช้การสกัดด้วยสารละลาย 4 ชนิด ได้แก่ DI water ,Hot DI water (80ºC), 70 % Ethyl alcohol, 70% Acetone ด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำมาระเหยตัวทำละลายด้วย Rotary evaporator พบว่าสามารถสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่สารประกอบฟีนอลิก ,สารประกอบฟลาโวนอยด์ และสารประกอบโปรแอนโทรไซยานิดินและพบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ในปริมาณสูง โดยมีปริมาณที่ได้ ในสารประกอบแต่ละชนิด จะแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับสารละลายที่ใช้และวัยของใบชา โดยยอดอ่อนที่สกัดด้วยน้ำร้อนจะให้ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสูงสุด (21.33 %น้ำหนักของสารสกัดแห้ง) และพบว่ายอดอ่อนจะให้สารประกอบฟีนอลิกสูงกว่าถ้าสกัดด้วย 70 % เอทานอล โดยสูงกว่าสกัดด้วยน้ำ น้ำร้อนและ 70% อะซีโตน ในขณะเดียวกันพบว่าการสกัดด้วยสารละลาย 70% เอทานอล และ สารละลาย 70% อะซีโตนของการสกัดในใบอ่อนและใบแก่ จะให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงเช่นกัน และพบว่าการสกัดใบแก่ด้วย 70% อะซีโตนจะให้สารประกอบ ฟลาโวนอยด์สูงสุด ในขณะเดียวกันการสกัดด้วย 70% เอทานอลของยอดอ่อนและใบอ่อนจะให้สารประกอบ ฟลาโวนอยด์ที่สูงกว่า และพบ สารประกอบโปรแอนโทรไซยานิดิน ในการสกัดยอดอ่อนและใบอ่อน ด้วย เอทานอล และพบในสารสกัดจากใบแก่ที่สกัดด้วย 70% อะซี

โตน(Nantamon Dorkbuakaew,Phanipuk Ruengnet, Prinyaporn Pradmeeteekul, Junniphaporn Pimkamnerd,Witayapan Nantitanon and Natthawut Thitipramote.2014)

จึงนำมาซึ่งการศึกษาโดยกำหนดมาตรฐานการสกัดชาอัสสัมใบแก่เพื่อให้ได้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพทั้งปริมาณสารสำคัญและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

วิธีดำเนินการวิจัย

1. ระเบียบวิธีวิจัย การเก็บตัวอย่างชาโดยใช้ชาอัสสัมใบแก่ซึ่งเลือกเก็บเฉพาะใบชาแก่นับจากโคนล่างของต้นขึ้นไปไม่เกิน 4 ใบจากไร่ชาอัสสัม ในพื้นที่จังหวัดเชียงราย

2. ขั้นตอนการวิจัย

2.1 การเตรียมตัวอย่างชา นำใบชาที่ได้มาตากแห้งจนน้ำหนักคงที่ จากนั้นนำไปบดให้เป็นผงละเอียดและเก็บที่อุณหภูมิลบ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการศึกษาต่อไป

2.2 สกัดสารสกัดจากชาอัสสัมใบแก่ด้วยวิธีแช่ย่า โดยใช้ตัวทำละลายเป็น 70% อะซีโตน ใช้อัตราส่วน ใบชาบดละเอียด : 70 % Acetone = 1:50 w/v แช่แช่ย่าใน Water bath shaker ที่ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 3ชั่วโมง โดยทำการสกัด 3 ชุด

2.3 วิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของใบชา(ศูนย์วิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเพื่อปกป้องและส่งเสริมสุขภาพ,2558)

2.3.1 วิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิคด้วย Folin-Ciocalteau reagent โดยใช้ Gallic acid เป็นสารมาตรฐาน และรายงานผลเป็นปริมาณ Gallic acid equivalent (mg GAE/g extract)

2.3.2 วิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ด้วย Aluminium chloride colorimetric method โดยใช้ Quercetin เป็นสารมาตรฐานและรายงานผลเป็นปริมาณ Quercetin equivalent (mg QE/g extract)

2.3.3 วิเคราะห์หาปริมาณสารโปรแอนโทไซยานิดิน โดยวิธี Vanillin-sulfuric acid method โดยใช้ Epicatechin เป็นสารละลายมาตรฐาน และรายงานผลเป็นปริมาณ Epicatechin equivalent (mg ECE/g extract) ของสารสกัด

2.4 วิเคราะห์ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

2.4.1 ทดสอบด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity assay (DPPH assay)ซึ่งเป็นการวัดค่าที่สารละลายไปทำลายอนุมูลอิสระของDPPH$^{\cdot}$ โดยใช้ Trolox(6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchlorman-2-carboxylic acid)เป็นสารละลายมาตรฐาน และรายงานผลเป็นปริมาณ Trolox equivalent antioxidant capacity (mg TEAC/g extract)

2.4.2 ทดสอบด้วย ABTS radical cation decolorization assay (ABTS assay)เป็นการวัดการฟอกสีของอนุมูลอิสระโดยใช้ Trolox เป็นสารละลายมาตรฐาน เพื่อหาค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ และรายงานผลเป็นปริมาณ Trolox equivalent antioxidant capacity (mg TEAC/g extract)

2.4.3 ทดสอบด้วยวิธี Ferric reducing antioxidant power assay (FRAP assay) ซึ่ง เป็นการวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวส์เฟอร์ริกของสารต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้ Trolox เป็นสารละลายมาตรฐาน และรายงานผลเป็นปริมาณ Trolox equivalent antioxidant capacity (mg TEAC/g extract)

2.5 ทำการศึกษา องค์ประกอบทางเคมี ด้วยการ วัดโครมาโตแกรม ของ สารสกัดด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยนำสารสกัดหยาบชาอัสสัมมาวิเคราะห์หาโครมาโตแกรมโดยใช้สภาวะการศึกษา Column platinum EPS C18 (100A, 3um, 53 mmx7mm) ที่อุณหภูมิ 30˚C Flow rate 2.0 ml/min และ Detector 210 nm โดยใช้ 0.5% Trifluoroacetic acid:acetonitrile (8713) เป็นตัวชะ

3. การวิเคราะห์ข้อมูล: นำผลการศึกษาที่ได้ มาวิเคราะห์ทางสถิติ ตัวแปรชนิดตัวเลข (Numerical variable) ถูกนำเสนอในรูป mean±SD การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (Analysis of variance, ANOVA) ถูกใช้เพื่อหาค่านัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยโปรแกรม IBM SPSS version 21

ผลการทดลอง

จากการศึกษาการสกัดชาอัสสัมใบแก่ด้วยวิธีเขย่า 150 รอบต่อนาที อัตราส่วนตัวอย่าง ต่อตัวทำละลาย (70 % อะซิโตน) 1:50 w/v ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง โดยสกัด 3 ชุดพบว่า

1. สารสกัดที่ได้เป็นผงลักษณะค่อนข้างหยาบสีเขียวเข้มจนคล้ายสีดำ แต่เมื่อเกลี่ยออกจะเห็นเป็นสีขียว มีกลิ่นคล้ายกลิ่นชาเขียว (ตารางที่ 2) โดยมีร้อยละผลผลิตเฉลี่ยของสารสกัด เท่ากับ 1.26±0.224 % ของน้ำหนักแห้ง

2. ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัด พบว่า

2.1 ผลการหาปริมาณรวมสารกลุ่มฟีนอลิค โดยใช้ Gallic acid เป็นสารละลายมาตรฐาน พบว่า มีปริมาณรวมสารกลุ่มฟีนอลิค เท่ากับ 2.822±0.031 mg GAE/g extract ซึ่งปริมาณฟีนอลิค ดังกล่าวไม่แตกต่างกันในสารสกัด ดังนั้นแสดงให้เห็นว่าวิธีการสกัดสารสกัด

ชาอัสสัมใบแก่มีมาตรฐาน ซึ่งมีงานวิจัยก่อนหน้านี้ ที่สกัดชาอัสสัมใบแก่ ด้วย 70% อะซีโตนได้ปริมาณสารฟีนอลิค 39.35 ±2.13 mg GAE/g extract (Dorkbuakaew et al.,2014)

2.2 ผลการหาปริมาณสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ โดยใช้ Quercetin เป็นสารละลายมาตรฐาน มีปริมาณสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ เท่ากับ 0.973±0.004 mg QE/g extract ซึ่งปริมาณดังกล่าวไม่แตกต่างกันในสารสกัด ดังนั้นแสดงให้เห็นว่าวิธีการสกัดสารสกัดชาอัสสัมใบแก่ที่สกัดได้มีมาตรฐาน ซึ่งมีงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่สกัดสารสกัดจากชาอัสสัมใบแก่ ด้วย 70%อะซีโตน พบกลุ่มฟลาโวนอยในปริมาณ 57.37 ±16.68 mg QE/g extract (Dorkbuakaew et al.,2014)

2.3 ผลการหาปริมาณสารกลุ่มโปรแอนโทไซยานิดินโดยใช้ Epicatechin เป็นสารละลายมาตรฐาน มีปริมาณสารโปรแอนโทไซยานิดิน เท่ากับ 0.729±0.039 mg ECE/g extract ซึ่งปริมาณดังกล่าวไม่แตกต่างกันในสารสกัด ดังนั้นแสดงให้เห็นว่าวิธีการสกัดสารสกัดชาอัสสัมใบแก่มีมาตรฐาน ซึ่งงานวิจัยก่อนหน้านี้ ที่สกัดชาอัสสัมใบแก่ด้วย 70% อะซีโตนได้สารโปรแอนโทไซยานิดินในปริมาณ28.45 ± 0.90 mg ECE/g extract (Dorkbuakaew et al.,2014)

3 ผลการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

3.1 ผลการทดสอบด้วย DPPH assay พบว่า มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 92.16 ± 0.46 mg TEAC/g extract ซึ่งทำให้เห็นว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระดังกล่าวไม่แตกต่างกัน ดังนั้นวิธีการสกัดดังกล่าวจึงมีมาตรฐานโดยได้สารที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระใกล้เคียงกัน ซึ่งงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่สกัดสารสกัดจากชาอัสสัมใบแก่ใน 70%อะซีโตนได้ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ25.40 ± 1.21 mg TEAC/g extract (Dorkbuakaew et al.,2014)

3.2 ผลการทดสอบด้วย ABTS assay พบว่าสารสกัดมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ 86.53±0.265 mg TEAC/g extract ซึ่งทำให้เห็นว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระดังกล่าวไม่แตกต่างกัน ดังนั้นจะเห็นได้ว่าวิธีการสกัดดังกล่าวจึงเป็นวิธีที่มีมาตรฐานโดยให้ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่ใกล้เคียงกัน ซึ่งมีงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่สกัดสารสกัดจากชาอัสสัมใบแก่ ด้วย 70% อะซีโตน ได้ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ 36.80 ± 0.04 mg TEAC/g extract (Dorkbuakaew et al.,2014)

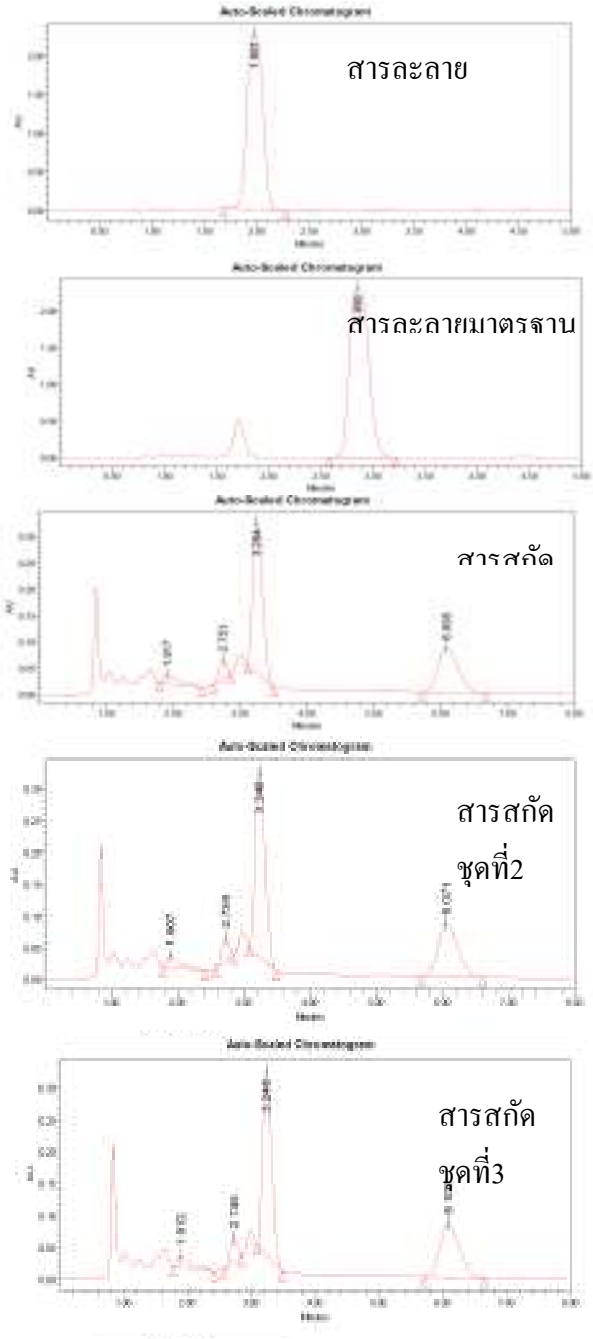
3.3 ผลการทดสอบด้วย FRAP พบว่า สารสกัดมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 22.96±0.36 mg TEAC/g extract ซึ่งทำให้เห็นว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระดังกล่าวไม่แตกต่างกัน ดังนั้นวิธีการสกัดดังกล่าวจึงมีมาตรฐานโดยให้ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระใกล้เคียงกัน ซึ่งมีงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่สกัดชาอัสสัมใบแก่ด้วย70%อะซีโตน ได้

ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ 1.938 ± 0.067 mg TEAC/g extract (Dorkbuakaew et al.,2014)

ตารางที่ 2 ตารางแสดงรายละเอียดของสารสกัดมาตรฐานของชาอัสสัมใบแก่ที่ได้

ลักษณะ	คำบรรยาย
ภาพสารสกัดชาอัสสัม	
ลักษณะของสารสกัด	เป็นผงลักษณะค่อนข้างหยาบ มีสีเขียวเข้มจนคล้ายสีดำ แต่เมื่อเกลี่ยออกจะเห็นเป็นสีขียว มีกลิ่นคล้ายกลิ่นชาเขียว
ร้อยละผลผลิต	1.26±0.224
ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	
Total phenolic content	2.822±0.031 mg GAE/g sample
Total flavonoid content	0.973±0.004 mg QE/g sample
Total proantocyanidine	0.729±0.039 mg ECE/g sample
ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	
DPPH assay	92.16±0.46 mg TEAC/g sample
ABTS assay	86.53±0.265 mg TEAC/g sample
FRAP assay	22.96±0.36 mg TEAC/g sample

2. ผลของโครมาโทแกรมจากการวิเคราะห์องค์ประกอบด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยทำการวิเคราะห์สารที่ได้จากการสกัดในแต่ละครั้ง พบว่าผลโครมาโทแกรม มี peak ที่ Relation time เหมือนกันทั้ง 3 ชุด โดยพบสารที่เหมือนกับสารมาตรฐาน Catechin และ Epicatechin (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 Chromatogram ของสารที่สกัดมาตรฐานและสารสกัดชาอัสสัมทั้ง3ชุดที่สกัดโดยใช้ Acetone

ข้อเสนอแนะ

วิธีการสกัดนี้ได้มาตรฐานสามารถสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากใบชาอัสสัมเป็นการทำการทดลองเพื่อเป็นแนวทางโอกาสในการพัฒนาการสกัดสารสกัดจากชาอัสสัมใบแก่ เพื่อประยุกต์ใช้ในเครื่องสำอาง

การศึกษาต่อไปในอนาคต ควรมีการศึกษาต่อถึงความคงตัวของตัวสารสกัดที่ได้ว่าอยู่ได้นานเท่าไร และควรศึกษาด้าน ความคุ้มค่าของการลงทุนในการสกัดสารสกัดดังกล่าว

รายการอ้างอิง

ธีรพงษ์ เทพกรณ์.(2557). *ชา*. กรุงเทพ:สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ธีรพงษ์ เทพกรณ์.(2555, พฤษภาคม).*เรื่องน่ารู้เกี่ยวกับชา ตอนที่ 1 สายพันธุ์ชา*.สืบค้นเมื่อ 1 กุมภาพันธ์ 2558 ,จาก hppt://www.mfu.ac.th/school/agro2012/node/284

ธีรพงษ์ เทพกรณ์.(2556, มีนาคม).*เรื่องน่ารู้เกี่ยวกับชา ตอนที่ 4 ประเภทของชา*.สืบค้นเมื่อ 1 กุมภาพันธ์ 2558 , จาก hppt://www.mfu.ac.th/school/agro2012/en/node/395

นภาภรณ์ แซ่ลี้ ,อรพิน เกิดชูชื่น และ ณัตฐา เลาหกุลจิตต์.(2552). *ปริมาณสาร Epigallocatechin* gallate (EGCG) และอนุพันธ์ของ Catechins ในชาจีนและชาอัสสัม , วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร ปีที่ 40 ฉบับที่ 3 (พิเศษ) กันยายน-ธันวาคม 2552 หน้า 9-12. กรุงเทพ : สมาคมวิทยาศาสตร์การเกษตร แห่งประเทศไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์

พิมพร ลีลาพรพิสิฐ.(2554 ก). *การนำสารสกัดมาใช้ในเครื่องสำอาง*. กรุงเทพ : สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์

ศูนย์วิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเพื่อปกป้องและส่งเสริมสุขภาพ. (2558). *คู่มือขั้นตอนการวิเคราะห์ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ*.เชียงราย:มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

สถาบันชา,มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง.(2558). *เมี่ยง*. สืบค้นเมื่อ 2 กุมภาพันธ์ 2558 , จาก hppt;//teainstituemfu.com/main/block/ผลิตภัณฑ์เมี่ยง

Jiranun Chaiwarit.(2015,July). High performance liquid chromatography (HPLC). Retrived July, 2015, from Scientific and Technological Instrument Center from hppt;//www.mfu.ac.th/center/stic/index.php/chemical-analysis-instrument

Nantamon Dorkbuakaew, Phanipuk Ruengnet, Prinyaporn Pradmeeteekul, Junniphaporn Primkamnerd, Witayapan Nantitanon and Natthawut Thitipramote.(2014). *Bioactive* compounds and Antioxidant Acticities of Camellia sinensis var. assamica in Different *Leave Maturity from Northern Thailand*. The 2nd International Conference on Agriculture and Agro-Industry 2014 (ICAAI2014) Fresh Produce,Novel Process and Health Product,November 20-21,2014.Chiangrai:Mae Fah Luang University.

VCharKarn. (2554, มกราคม). *เครื่องกลั่นระเหยแบบหมุน(Rotary Evaporator)*. สืบค้น เมื่อ 21 กุมภาพันธ์ 2558 , จาก http://share.psu.ac.th/blog/sci-discus/18437