Original Article

นิพนธ์ต้นฉบับ

สารเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในเครื่องดื่มชาเขียวพร้อมบริโภค

นิทรา เนื่องจำนงค์

ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์พิษณุโลก กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

บทคัดย่อ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและหาปริมาณสารคาเฟอีนในเครื่องดื่มชาเขียว โดยเก็บตัวอย่างเครื่องดื่มชาเขียวพร้อมบริโภคในเดือนมกราคม ถึงพฤษภาคม ๒๕๔๘ รวม ๒๔ ตัวอย่าง จาก ๑๑ ผู้จำหน่าย จำแนกเป็นชาเขียวผสมน้ำผลไม้ จำนวน ๙ ตัวอย่าง ชาเขียวใส่นมจำนวน ๒ ตัวอย่าง และชาเขียวเปล่าจำนวน ๑๓ ตัวอย่าง นำมาประเมินฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH (diphenylpicrylhydrazyl) assay และหาสูตรโครงสร้างของสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระโดยใช้เครื่องวิเคราะห์ชนิดมวลโมเลกุลของสาร Liquid chromatography - electrospray ionization -mass spectrometer-mass spectrometer (LC-ESI-MS-MS) และหาปริมาณสารคาเฟอีน โดยใช้ High performance liquid chromatography (HPLC) ผลการประเมินฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของเครื่องดื่มชาเขียวพบว่ามีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าร้อยละ ๘๐ จำนวน ๒๑ ตัวอย่าง (ร้อยละ ๘๗.๕) วิเคราะห์หาสารสำคัญในเครื่องดื่มชาเขียวเปล่าจำนวน ๑๓ ตัวอย่าง โดยสกัดด้วยสารเอทิลอะซิเตต (ethyl acetate) นำสารสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์หาสารสำคัญโดยฉีดเข้าระบบ LC-ESI-MS-MS แบบ flow injection analysis (FIA) ใช้สารละลายเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) เป็น acetonitrile: ๐.๑% formic acid, ๕๐:๕๐ v/v ในหมวด full scan negative ionization พบว่าเครื่องดื่มชาเขียวเปล่าทั้ง ๑๓ ตัวอย่าง มีมวลโมเลกุล $[M-H]^{-1}$ ที่ *m/z* ๑๖๙, ๒๘๙, ๓๐๕, ๔๔๑ และ ๔๕๗ เมื่อแตกมวลโมเลกุล (fragmentation) โดยทำ product-ion scan เทียบกับสารมาตรฐานและข้อมูลที่มีรายงานมาแล้ว สารสำคัญที่พบในชาเขียวคือ gallic acid (GA), epicatechin (EC), epicatechin gallate (ECG), epigallocatechin (EGC) และ epigallocatechin gallate (EGCG) สำหรับปริมาณคาเฟอีนที่พบอยู่ในช่วง ๔-๑๗ มิลลิกรัม/๑๐๐ มิลลิลิตร มีค่าเฉลี่ย ๙.๗ มิลลิกรัม/๑๐๐ มิลลิลิตร

คำสำคัญ: **ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, เครื่องดื่มชาเขียว, LC-ESI-MS-MS, catechins, คาเฟอีน**

บทนำ

ปัจจุบันประชาชนสนใจดูแลรักษาสุขภาพของตนเองมากขึ้น อีกทั้งเลือกกินอาหารและแสวงหาอาหารเสริมที่มีผลป้องกันโรคต่าง ๆ โดยเฉพาะโรคที่เกิดจากความเสื่อมหรือผิดปกติของเซลล์ เช่น มะเร็ง โรคหัวใจ โรคอัลไซเมอร์ และที่สำคัญคือ ทำอย่างไรให้ดูอ่อนกว่าวัย การชะลอความแก่ และลดรอยเหี่ยวย่นบนผิวหนัง สารที่จะมีผลในการป้องกัน ยับยั้ง หรือ

Scanned by CamScanner

ชะลอเหตุดังกล่าวได้ คือสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) สารตัวใดที่สามารถจับกับอนุมูลอิสระได้มากเรียกว่ามีฤทธิ์ต้านสูง อนุมูลอิสระมีหลายชนิด ถูกสร้างขึ้นมาทั้งจากภายนอก เช่น การได้รับรังสีจากแสงแดด[๑,๒] หรือควันพิษจากสิ่งแวดล้อม[๓] หรือภายในจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของร่างกายเอง[๑] การออกกำลังกายที่หักโหม[๓] และในภาวะที่ผิดปกติ เช่น เป็นโรค[๑] ส่งผลให้ร่างกายสะสมอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น ตัวอย่างของอนุมูลอิสระ เช่น superoxide ion (O_2^-) Hydroxyl radical (OH) peroxyl radical (ROO)

การประเมินฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) มีหลายวิธีขึ้นอยู่กับการเลือกชนิดของตัวกำเนิด และตัวตรวจวัดอนุมูล โดยทั่วไปอาศัยหลักการสร้างอนุมูลอิสระขึ้นมาก่อน แล้วจึงเติมสารต้านลงไป จากนั้นทำการตรวจวัดหาส่วนที่เหลือหลังจากการเกิดปฏิกิริยา วิธีที่นิยมใช้ได้แก่ การใช้อนุมูลอิสระ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazy (DPPH)[๔-๖] หรือใช้ 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS)[๗] การแสดงค่าฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างที่ทดสอบจะรายงานในรูปของร้อยละ หรือจะเทียบความแรงว่าเป็นกี่เท่าของสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน เช่น Trolox (วิตามินอีในรูปที่ละลายน้ำ) วิตามินซี[๖] หรือในรูป IC_{50} (ปริมาณความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ทำให้การเปลี่ยนแปลงสีลดลงร้อยละ ๕๐)[๖]

ชาเขียวเป็นเครื่องดื่มที่นิยมบริโภคในประเทศแถบเอเชีย เช่น จีน ญี่ปุ่น สารสำคัญในชาเขียวจะเป็นพวกโพลีฟีนอล (polyphenol) ที่ทำให้มีรสฝาดและขม สารโพลีฟีนอลที่สำคัญคือ สารกลุ่ม catechins ได้แก่ (-)-epigallocatechin gallate, (-)-epicatechin gallate, (-)-epigallocatechin และ (-)-epicatechin ในการผลิตชา สารกลุ่มนี้สามารถเปลี่ยนรูป (epimer) จาก epicatechin เป็น catechin มีรายงานว่าสารกลุ่มนี้ในชาเขียวมีฤทธิ์ในหลาย ๆ ด้าน เช่น เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ป้องกันการเกิดมะเร็ง ลดความดันโลหิต ลดน้ำตาล ป้องกันการสะสมของไขมัน เป็นสารที่จับกับโลหะได้ ป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นที่มีโลหะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา[๘-๑๓]

ในใบชามีคาเฟอีนประมาณร้อยละ ๑.๕-๔ คาเฟอีนมีฤทธิ์ในการกระตุ้นระบบประสาทส่วนกลาง ทำให้รู้สึกกระปรี้กระเปร่า เกิดการตื่นตัวไม่ง่วงซึม ถ้าได้รับปริมาณมากมีผลต่อการเต้นของหัวใจ และเพิ่มการขับถ่ายปัสสาวะ[๑๔] ในบางรายอาจเกิดอาการแพ้ เช่น ปวดศีรษะ ชีพจรเต้นเร็วและตกใจง่าย[๑๖] คาเฟอีนมีผลต่อทารกในครรภ์[๑๗] ปริมาณคาเฟอีนที่ได้รับไม่ควรเกิน ๒๐๐ มิลลิกรัมต่อวัน เนื่องจากเป็นปริมาณที่ออกฤทธิ์ทางยา[๑๘] ดังนั้นคาเฟอีนจะเป็นสารเคมีที่ผู้บริโภคกังวลว่าจะมีผลกระทบต่อสุขภาพ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในเครื่องดื่มชาเขียวพร้อมบริโภค หาสูตรโครงสร้างของสารที่ออกฤทธิ์ ในตัวอย่างที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงและตรวจหาปริมาณคาเฟอีน (caffeine) ซึ่งเป็นสารที่มีอยู่ในธรรมชาติของพืชตระกูลนี้

วิธีการศึกษา

เครื่องดื่มชาเขียวพร้อมบริโภคในที่นี้เป็นเครื่องดื่มที่ได้จากชา *(Camellia sinensis)* ไม่ใช่ชาเขียวใบหม่อน หรือชาสมุนไพรอื่น ๆ

สารเคมีและสารมาตรฐาน

สารเคมี

ethyl acetate AR grade (Reidel de Haen, Germany), acetonitrile (ACN) HPLC grade, methanol (MeOH) HPLC grade, formic acid, potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) (Merck, Germany), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazy (DPPH) (Sigma, Germany) และ nylon membrance 0.45µ (Millipore, USA)

สารมาตรฐาน

Caffeine HPLC grade (Fluka, Switzerland)

Scanned by CamScanner

epigallocatechin gallate (Sigma, Germany)

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องระเหยสุญญากาศ (Heidolph, Germany), UV-Vis spectrophotometer (Perkin Elmer Lamda II, USA), LC-MS-MS system ประกอบด้วย HPLC part: Binary pump, Vacuum membrane degasser, Autosampler, Column oven (Agilent 1100 series, Agilent Technologies, USA.) MS part: Triple quadrupole (AB sciex API 4000, Canada) interface: ESI negative mode และ HPLC system สำหรับวิเคราะห์คาเฟอีน ประกอบด้วย Quaternary pump, UV detector, Chem station software (Agilent 1100 series, Agilent Technologies), Column oven (Timberline, USA.)

ตัวอย่าง

เครื่องดื่มชาเขียวพร้อมบริโภค ๒๔ ตัวอย่าง แบ่งเป็น ชาเขียวผสมน้ำผลไม้ จำนวน ๙ ตัวอย่าง ชาเขียวใส่นม ๒ ตัวอย่าง และชาเขียวเปล่า ๑๓ ตัวอย่าง เก็บตัวอย่างจากร้านสะดวกซื้อในจังหวัดพิษณุโลก ทำการศึกษาวิจัยในเดือนมกราคมถึงพฤษภาคม ๒๕๔๘

วิธีวิเคราะห์

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

๑. นำสารละลาย ๐.๑ mM techical term ทางเคมี DPPH จำนวน ๒.๙ มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดสอบ และนำตัวอย่างเครื่องดื่มชาเขียว ๐.๑ มิลลิลิตรใส่ลงไปเขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด ณ อุณหภูมิห้อง นาน ๓๐ นาที เพื่อให้ปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์

๒. นำสารละลายจากข้อ ๑ ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น ๕๑๗ นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (UV-Vis spectrophotometer) และวัดค่าตัวควบคุมที่ใช้สารละลายเมทานอล (methanol) ๐.๑ มิลลิลิตร แทนตัวอย่าง ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างละ ๓ ครั้ง ประเมินฤทธิ์ของสารต้านอนุมูลอิสระเป็นร้อยละ ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (ร้อยละ)

= [(ค่าดูดกลืนแสงตัวควบคุม-ค่าดูดกลืนแสงตัวอย่าง)/ค่าดูดกลืนแสงตัวควบคุม] × ๑๐๐

สารเคมีในเครื่องดื่มชาเขียว

ชนิดสารต้านอนุมูลอิสระ

นำตัวอย่างเครื่องดื่มชาเขียวจำนวน ๑๐๐ มิลลิลิตร สกัดด้วยสารเอทิลอะซิเตต (ethyl acetate) จำนวน ๕๐ มิลลิลิตร ๒ ครั้ง นำชั้น เอทิลอะซิเตต ไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ นำของแข็ง (residue) ที่ได้ละลายในเมทานอล ให้มีความเข้มข้นประมาณ ๑๐๐ นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปฉีดเข้าเครื่อง LC-ESI-MS-MS แบบ flow injection มีสภาวะของเครื่อง LC-ESI-MS-MS ดังนี้ เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase): acetonitrile: 0.1% formic acid 50:50 v/v, อัตราการไหล (flow rate): ๒๐๐ ไมโครลิตร/นาที, อุณหภูมิของคอลัมน์ (column oven): ๒๕ องศาเซลเซียส, ปริมาณที่ฉีด (injection volume): ๑๐ ไมโครลิตร, Curtain gas (CUR) 10, Ion source gas (GS1) 45, Ion source gas (GS2) 45, temperature (TEM) 400, Ion spray voltage (IS) -4,500 volt, Collision gas (CAD)* 6 Declustering potential (DP) -80 volt, Entrance potential (EP) -10, Collision cell exit potential (CXP)*-6 นำสารมาตรฐานฉีดเข้าระบบทำเช่นเดียวกับตัวอย่างเปรียบเทียบ mass spectrum ของสารตัวอย่างกับสารมาตรฐาน

การวิเคราะห์ปริมาณคาเฟอีนโดย HPLC

นำตัวอย่างเครื่องดื่มชาเขียว กรองผ่านเยื่อกรอง (membrane) ขนาด ๐.๔๕ ไมโครเมตร นำไปวิเคราะห์โดยตรง เครื่องดื่มชาเขียวใส่นม เตรียมตัวอย่างแบบ dialysis วิเคราะห์ปริมาณคาเฟอีนในตัวอย่างเทียบความเข้มข้นกับกราฟมาตรฐาน โดยตั้งสภาวะของ

*เฉพาะทำ product-ion scan

Scanned by CamScanner

เครื่อง HPLC ดังนี้

คอลัมน์ : Prevail C18 ๕ ไมโครเมตร ขนาด ๒๕๐ มิลลิเมตร x ๔.๖ มิลลิเมตร (Alltech, USA)

เฟสเคลื่อนที่ : 0.025M KH_2PO_4 (pH3.5):MeOH 6:4(v/v)

อัตราการไหล (flow rate): ๑ มิลลิลิตร/นาที

อุณหภูมิของคอลัมน์ : ๔๐ องศาเซลเซียส

ปริมาณที่ฉีด : ๒๐ ไมโครลิตร

เครื่องตรวจวัด (detector) :UV ๒๗๒ นาโนเมตร

วิเคราะห์ตัวอย่างละ ๒ ครั้ง รายงานเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ผลการศึกษา

๑. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

เครื่องดื่มประเภทชาเขียวผสมน้ำผลไม้ มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมากกว่าร้อยละ ๘๐ (๘๔-๙๕%) จำนวน ๘ ตัวอย่าง จาก ๙ ตัวอย่าง (ตารางที่ ๑) ในขณะที่เครื่องดื่มชาเขียวเปล่ามีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมากกว่าร้อยละ ๘๐ (๘๐-๙๒%) ทุกตัวอย่าง (ตารางที่ ๒) สำหรับชาใส่นมมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระต่ำ (ตารางที่ ๓)

๒. ชนิดสารต้านอนุมูลอิสระ

นำเครื่องดื่มชาเขียวเปล่าที่ไม่ผสมน้ำผลไม้ จำนวน ๑๓ ตัวอย่าง มาสกัดด้วยสารเอทิลอะซิเตด ทำให้แห้งและละลายสารสกัดด้วยสารเมทานอล นำไปวิเคราะห์มวลโมเลกุลพบว่า เครื่องดื่มชาเขียว ๑๐ ตัวอย่างมี mass spectrum ตามรูปที่ 1a มี ๒ ตัวอย่าง ที่มี mass spectrum ตามรูปที่ 1b ตัวอย่างทั้งหมดมีมวลโมเลกุล $[M-H]^{-1}$ ที่ mass/charge, (*m/z*) ๑๖๙, ๒๘๙, ๓๐๕, ๔๔๑ และ ๔๕๗ ทำการแตกมวลโมเลกุลของสารแต่ละตัวเทียบกับสารมาตรฐานตามตารางที่ ๔ และรูปที่ ๒ และ ๓

๓. ปริมาณคาเฟอีน

ปริมาณคาเฟอีนที่พบอยู่ในช่วง ๔.๔-๑๗.๑ มิลลิกรัม/๑๐๐ มิลลิลิตร มีค่าเฉลี่ย ๙.๗ มิลลิกรัม/๑๐๐ มิลลิลิตร (ตารางที่ ๑-๓)

วิจารณ์

ในการศึกษาครั้งนี้ได้แบ่งเครื่องดื่มชาเขียวเป็น ๓ ประเภท โดยพิจารณาจากสูตรตำรับ ตัวอย่างกลุ่มที่ ๑

ตารางที่ ๑ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณคาเฟอีนในชาเขียวผสมน้ำผลไม้

ผู้ผลิต/จำหน่าย	ชนิดตัวอย่างชาเขียวผสมน้ำผลไม้	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (ร้อยละ)	ปริมาณคาเฟอีน (มก./๑๐๐ มล.)	
			ปริมาณที่พบ	ฉลากระบุ
A	น้ำผึ้งผสมมะนาว	๘๕.๕๘±๐.๔๔	๘.๐๘±๐.๐๒	-
B	มะนาว	๘๕.๑๐±๐.๐๘	๑๐.๕๗±๐.๐๓	๑๑.๕
C	น้ำผึ้งผสมมะนาว	๘๕.๐๕±๐.๑๒	๘.๒๗±๐.๐๒	๘.๕๘
D	เลมอน	๘๕.๐๒±๐.๑๓	๗.๗๒±๐.๐๒	๑๒.๐
E	พีช	๘๔.๕๔±๐.๐๓	๑๑.๔๐±๐.๐๐๓	๑๐.๐
E	น้ำผึ้งผสมเลมอน	๘๔.๔๘±๐.๐๘	๘.๕๐±๐.๐๐๗	๑๐.๐
F	น้ำผึ้งผสมมะนาว	๘๓.๗๘±๐.๐๗	๗.๑๒±๐.๐๐๖	-
G	น้ำผึ้งผสมมะนาว	๘๓.๘๘±๐.๖๒	๔.๔๕±๐.๐๒	๗.๒
D	เลมอน	๕๗.๖๑±๐.๘๑	๗.๑๘±๐.๐๐๔	๗.๗๐

Scanned by CamScanner

ตารางที่ ๒ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณคาเฟอีนในชาเขียวเปล่า และใส่น้ำตาลหรือน้ำผึ้ง

ผู้ผลิต/จำหน่าย	ชนิดตัวอย่างชาเขียว	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (ร้อยละ)	ปริมาณคาเฟอีน (มก./๑๐๐ มล.)	
			ปริมาณที่พบ	ฉลากระบุ
G	รสน้ำผึ้ง	๕๑.๕๐±๐.๑๓	๕.๑๔±๐.๐๒	๕.๗๕
F	เปล่า	๕๑.๘๘±๐.๘๕	๘.๔๕±๐.๐๓	-
G	เปล่า	๘๘.๗๗±๐.๕๕	๑๐.๒๗±๐.๐๒	๕.๖๗
H	เปล่า	๘๘.๖๔±๐.๓๓	๑๐.๕๖±๐.๐๑	๑๒.๐
B	รสน้ำผึ้ง	๘๗.๖๑±๐.๔๕	๘.๗๓±๐.๐๑	๑๔.๓
C	ผสมเก๊กฮวย	๘๖.๒๖±๐.๑๘	๑๑.๓๕±๐.๐๖	๑๗.๒๖
C	กลิ่นมะลิ	๘๕.๓๕±๐.๑๕	๑๓.๓๖±๐.๐๔	-
A	เปล่า	๘๔.๘๔±๐.๒๔	๘.๑๖±๐.๐๑	-
I	ญี่ปุ่น	๘๔.๔๕±๐.๗๔	๑๒.๒๕±๐.๐๐๑	-
A	เปล่า	๘๔.๒๓±๐.๑๖	๕.๖๕±๐.๐๐๔	-
E	จัสมิน	๘๔.๑๖±๐.๒๑	๑๐.๑๗±๐.๐๐๘	๑๐.๐
I	ไต้หวัน	๘๓.๒๒±๐.๓๑	๑๔.๔๕±๐.๑๓	-
J	เปล่า	๘๐.๑๕±๑.๑๕	๑๑.๘๒±๐.๐๕	๑๔.๕

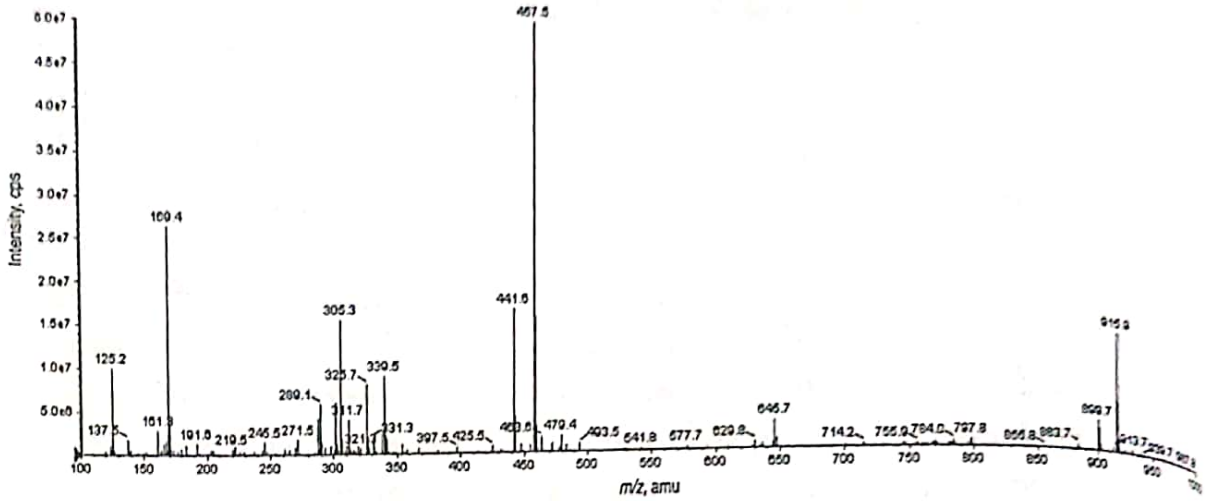
ตารางที่ ๓ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณคาเฟอีนในชาเขียวใส่นม

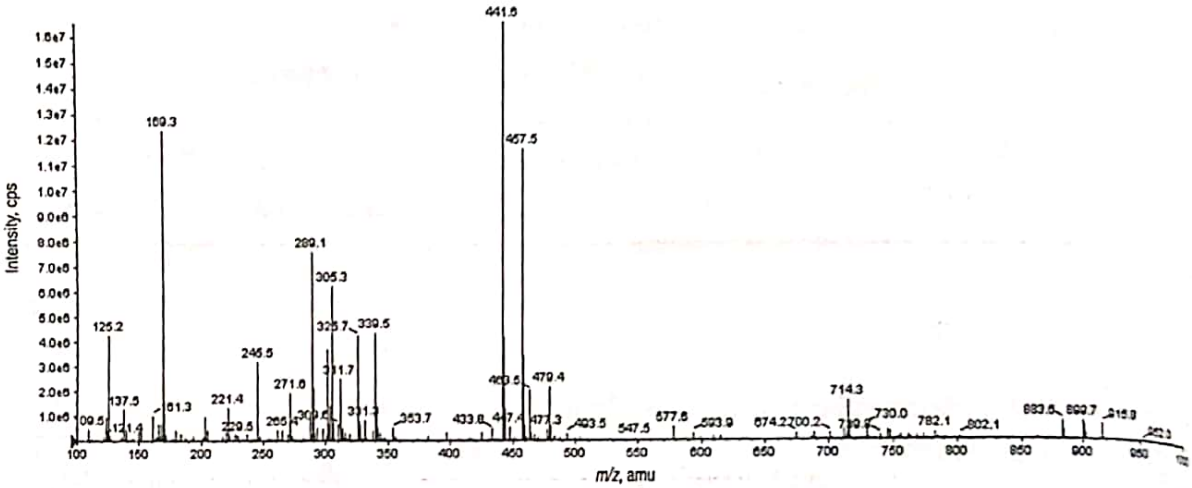
ผู้ผลิต/จำหน่าย	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (ร้อยละ)	ปริมาณคาเฟอีน (มก./๑๐๐ มล.)	
		ปริมาณที่พบ	ฉลากระบุ
G	๔๒.๕๕±๐.๔๔	๑๗.๐๓±๐.๑๖	๒๗.๐
K	๓.๖๗±๐.๓๕	๑๖.๖๒±๐.๐๓	๑๖.๖๕

จะมีส่วนผสมของน้ำผลไม้ซึ่งมีกรดซิตริกหรือกรดแอสคอร์บิก กลุ่มที่ ๒ เป็นเครื่องดื่มชาเขียวที่ผสมนม และกลุ่มที่ ๓ เป็นเครื่องดื่มชาเขียวเปล่าไม่ผสมน้ำผลไม้แต่มีรสน้ำผึ้งหรือน้ำตาล พบว่าเครื่องดื่มชาเขียวกลุ่มที่ ๑ และ ๓ มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงมากกว่าร้อยละ ๘๐ ในขณะที่ เครื่องดื่มในกลุ่ม ๒ ที่ให้สารอาหารและพลังงานมากกว่าที่จะดื่มเพื่อความสดชื่น มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระต่ำ

สารที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จากการวิเคราะห์มวลโมเลกุล และการแตกมวลโมเลกุลของสารแสดงในรูปที่ ๒ ซึ่งจะใช้รูปแบบในการแตกตัวนี้เทียบกับสารมาตรฐานและทำนายโครงสร้างของสารตัวอย่าง โดยเทียบกับสารมาตรฐานและรายงานที่มีผู้วิจัยไว้แล้ว[๑๙-๒๒] พบว่าสารที่มีในเครื่องดื่มชาเขียวมีมวลโมเลกุล $[M-H]^{-1}$ ที่ *m/z* ๑๖๙, ๒๘๙, ๓๐๕, ๔๔๑ และ ๔๕๗ คือ gallic acid (GA), epicatechin (EC), epigallocatechin (EGC), epicatechin gallate (ECG) และ epigallocatechin gallate (ECGC) ตามลำดับ

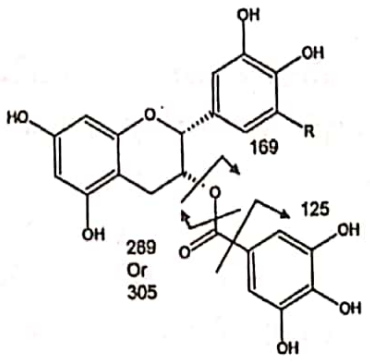
Scanned by CamScanner





หมายเหตุ cps = count per second amu = atomic mass unit *m/z* = mass/charge

รูปที่ ๑ Deprotonated elctrospray ionization mass spectrum ของสารสกัดจากเครื่องดื่มชาเขียวใน mode full scan 1a) mass spectrum ของเครื่องดื่มชาเขียว ๑๑ ตัวอย่าง 1b) mass spectrum ของเครื่องดื่มชาเขียว ๒ ตัวอย่าง

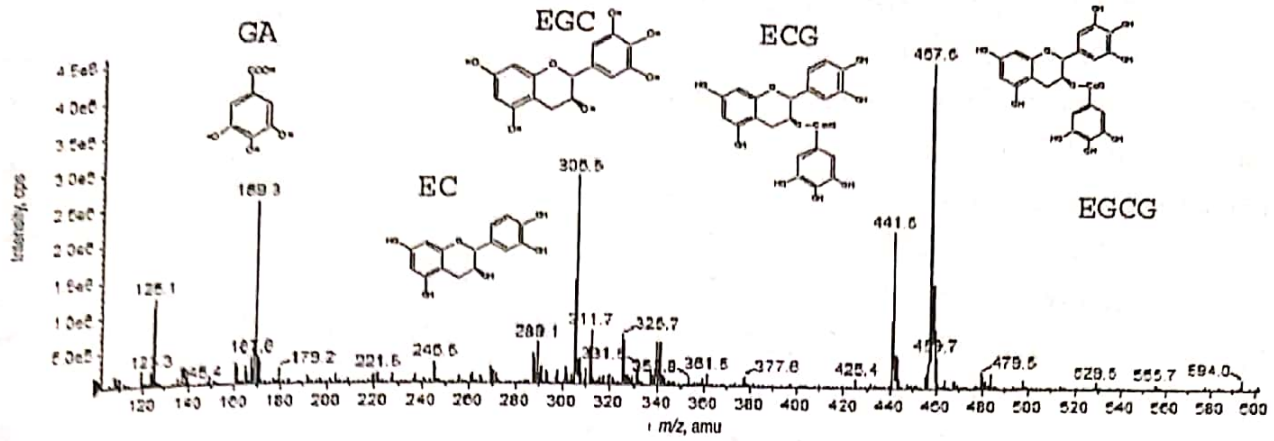


รูปที่ ๒ การแตกมวลโมเลกุลของสาร epicatechin gallate (ECG:R=H, MW=442) และ epigallocatechin gallate (EGCG:R=OH, MW=458)

ความแตกต่างของความเข้มใน mass spectrum รูปที่ 1a และ 1b ขึ้นกับองค์ประกอบของสารที่มีอยู่กล่าวคือ ในรูปที่ 1a จะมีสาร epigallocatechin gallate *m/z* 457 มากกว่าสาร epicatechin gallate *m/z* 441 ในขณะที่ตัวอย่างในรูปที่ 1b มีสาร epicatechin gallate มากกว่าสาร epigallocatechin gallate

เครื่องดื่มชาเขียวที่นำมาวิจัยนี้มีสารในกลุ่ม catechins เป็นส่วนประกอบเป็นไปตามที่มีรายงานวิจัยของพืชประเภทชาเขียว สารในกลุ่มนี้จะมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูง จากรายงานของ Rice-Evans และ

Scanned by CamScanner



รูปที่ ๓ Mass spectrum และการทำนายสูตรโครงสร้างสารที่พบในชาเขียว

ตารางที่ ๔ LC-MS-MS ของสารสำคัญที่พบในสารสกัดเอทิลอะซิเตต จากเครื่องดื่มชาเขียว

สาร	$[M-H]^{-1}$	Fragment ion (m/z)	โครงสร้างของสาร
๑	๑๖๙	-	Gallic acid
๒	๒๘๙	๑๒๕,๒๐๕	Epicatechin
๓	๓๐๕	๑๒๕	Epigallocatechin
๔	๔๑๑	๒๘๙,๑๖๙	Epicatechin gallate
๕	๔๕๗	๑๖๙,๓๐๕	Epigallocatechin gallate

คณะ[๓๓] พบว่าฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสาร ECG (๔.๙๓±๐.๐๒), ECGC (๔.๗๕±๐.๐๖), EGC (๓.๘๒±๐.๐๖), GA (๓.๐๐±๐.๐๕) และ EC (๒.๔±๐.๐๕) เท่าของสาร Trolox (วิตามินอีในรูปที่ละลายน้ำ) สำหรับเครื่องดื่มชาเขียวที่ผสมน้ำผลไม้ เช่น มะนาว พีช หรือผงเลมอน ซึ่งมีกรดซิตริกหรือกรดแอสคอร์บิก (วิตามินซี) ผสมอยู่ จากสูตรโครงสร้างของกรดซิตริกและกรดแอสคอร์บิกมีหมู่ไฮดรอกซี (OH group) จึงสามารถให้ไฮโดรเจนอะตอมกับอนุมูลอิสระ ดังนั้นสารพวกนี้มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วย จึงทำให้เครื่องดื่มชาเขียวกลุ่มนี้มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่ากลุ่มที่ไม่ผสมน้ำผลไม้ (ชาเขียวเปล่า) แต่จากการศึกษาการสลายตัวของสาร catechins เมื่อเก็บไว้ในเวลา ๖ เดือน ชาเขียวที่ผสมมะนาว สาร catechins จะสลายตัวได้มากกว่าชาเขียวที่ไม่ผสมมะนาว สาร catechins จะไม่คงตัวเมื่ออยู่ในสารละลายที่มีน้ำตาลและกรดซิตริกหรือกรดแอสคอร์บิกผสมอยู่[๒๓] เครื่องดื่มชาเขียวในขวดขนาด ๒๕๐ มิลลิลิตร จะมีปริมาณสาร catechins ประมาณ ๓-๖๐ มิลลิกรัม[๒๓] ขึ้นกับชนิดและคุณภาพของใบชาที่นำมาชง ถ้าชงชาเขียวตามปกติ (ใบชามีปริมาณสาร catechins ประมาณ ๑๐% ของน้ำหนักแห้ง) จะได้สาร catechins ประมาณ ๔๐๐-๕๐๐ มิลลิกรัมต่อถ้วย (๑ ถ้วยปริมาตร ๑๐๐ มิลลิลิตร)[๒๓,๒๔] ปริมาณที่ร่างกายต้องการต่อวันของสารพวกโพลีฟีนอลจากพืชประมาณ ๒๐ มิลลิกรัม -๑ กรัม[๑๓] ขึ้นกับสภาวะร่างกายของแต่ละคน การดื่มน้ำชาที่ชงจากใบชาไม่ควรเกินวันละ ๓ ถ้วย[๒๔] และไม่ควรดื่มพร้อมอาหาร เนื่องจากคุณสมบัติของการเป็นสารที่จับกับโลหะได้ดีทำให้การดูดซึมของแร่ธาตุบางชนิดลดลง และไม่ควรดื่มชาแทนการกินผักและผลไม้ เพราะผักและผลไม้จะมีแร่ธาตุ วิตามิน สารอาหารอื่น ๆ รวมทั้งเส้นใยอาหารที่ร่างกายต้องการ

สำหรับปริมาณคาเฟอีนในเครื่องดื่มชาเขียวไม่มีมาตรฐานกำหนด เพียงแต่ต้องแสดงปริมาณบนฉลาก[๒๕]

Scanned by CamScanner

ปริมาณคาเฟอีนที่พบในเครื่องดื่มชาเขียวอยู่ในช่วง ๔.๔-๑๗.๐ มิลลิกรัม/๑๐๐ มิลลิลิตร มีค่าเฉลี่ย ๙.๗ มิลลิกรัม/๑๐๐ มิลลิลิตร มีตัวอย่างเพียงร้อยละ ๖๗ ที่แสดงปริมาณคาเฟอีนบนฉลาก ซึ่งค่าที่แสดงและผลการวิเคราะห์แตกต่างกัน ๖ ตัวอย่าง โดยพบน้อยกว่าที่ระบุไว้ ๓-๑๐ มิลลิกรัม/๑๐๐ มิลลิลิตร อาจขึ้นกับวิธีวิเคราะห์ที่ใช้แตกต่างกัน ในเครื่องดื่มประเภทโคลา กฎหมายกำหนดปริมาณคาเฟอีนมิได้ไม่เกิน ๑๕ มิลลิกรัม/๑๐๐ มิลลิลิตร[๒๖] ในขณะที่เครื่องดื่มให้พลังงานกำหนดปริมาณคาเฟอีนไม่เกิน ๕๐ มิลลิกรัม/ภาชนะบรรจุ[๒๗] เมื่อเปรียบเทียบปริมาณคาเฟอีนในเครื่องดื่มชาเขียวกับเครื่องดื่มให้พลังงาน จึงไม่ควรบริโภคเครื่องดื่มชาเขียวเกินวันละ ๒ ขวด (ขวดละ ๕๐๐ มิลลิลิตร มีคาเฟอีนเฉลี่ย ๕๐ มิลลิกรัม)

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของชาเขียวเพื่อหาปริมาณสารเคมีหรือกลุ่มสารที่มีผลกระทบต่อสุขภาพ และกำหนดให้มีการแสดงข้อมูลบนฉลาก จะเป็นการควบคุมคุณภาพของชาและเป็นข้อมูลในการตัดสินใจซื้อของผู้บริโภคอย่างสมประโยชน์

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ผศ.ดร.กรกนก อิงคนินันท์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร สำหรับสารมาตรฐาน และคำแนะนำในการเตรียมต้นฉบับ

เอกสารอ้างอิง

๑. Halliwell B, Gutteridge JMC, Cross CE. Free radicals antioxidants and human disease. Where are we now? J Lab Clin Med 1992; 6:598-620.

๒. Jacobson HN. Dietary standard and future developments. Free Radical Biol Med 1987; 3:209-13.

๓. Dekkers JC, van Doornen LJ, Kemper HC. The role of antioxidant vitamins and enzymes in the prevention of exercise induced muscle damage. Sport Med 1996; 21:213-38.

๔. Nuengchamnong N, Hermans ACJ, Ingkaninan K. Separation and detection of the antioxidant flavonoids, rutin and quercetin, using HPLC coupled on-line with colorimetric detection of antioxidant activity. Naresuan Univ J 2004; 12:25-37.

๕. Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakarin J Sci Technol 2004; 26:211-9.

๖. du Toit R, Volsteedt Y, Apostolides Z. Composition of the antioxidant content of fruits,vegetables and teas measured as vitamin C equivalents. Toxicology 2001; 166:63-9.

๗. ไมตรี สุทธจิตต์, กรรณิการ์ แซ่เตียว, จันทร์จิรา มีคำ, ปาริชาติ ฤทธิ์ฉิ่ม, ปองพล วรปราณี, อภิญญา วงศ์แก้ว และคณะ. ฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นในผักและเมล็ดพืชที่ใช้เป็นอาหาร. เอกสารประกอบการประชุมวิชาการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ครั้งที่ ๕ เรื่องวิทยาศาสตร์การแพทย์เพื่อชีวิตและเศรษฐกิจไทย; ๔-๕ มิถุนายน ๒๕๔๑; ณ โรงแรมเจ้าพระยาปาร์ค, กรุงเทพมหานคร. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์; ๒๕๔๑.

๘. Yang CS, Wang ZY. Tea and cancer: review. J Natl Cancer Inst 1993; 85:1045-9.

๙. Graham HN. Green tea composition, consumption and polyphenol chemistry. Prev Med 1992; 21:334-50.

๑๐. Stensvold I, Tverdal A, Solvoll K, Fodd OP. Tea consumption. Relationship to cholesterol, blood pressure and coronary and total mortality. Prev Med 1992; 21:546-53.

๑๑. Rimersma RA, Rice-Evans CA, Tyrrell RM, Cliffords MN, Lean MEJ. Tea flavonoids and cardiovascular health. QJ Med 2001; 94:277-82.

๑๒. Hasegawa N, Mori M. Effect of powered green tea and its caffeine content on lipogenesis and lipolysis in 3T3-L1 cell. J Health Sci 2000; 46:153-5.

๑๓. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids: review. Free Radic Biol Med 1996; 20: 933-56.

๑๔. Finger A, Kuhr S, Engelhardt UH. Chromatography of tea constituents: review. J Chromatogr 1992; 624:293-315.

๑๕. Graham DM. Caffeine: its identity, dietary sources, intake and biological effects. Nutr Rev 1978; 36:97-102.

๑๖. Finn R, Cohen HN. Food allergy: fact or fiction? Lancet 1978; 311:426-8.

๑๗. Ral TW. Central nervous system stimulants:the methylxanthines. In: Gilman AG, Goodman LS, Rall TW, Murad F, editors. Goodman and Gilman's the pharmacological basic of therapeutics. 7th ed. New York: Macmillan Publishing; 1985. p. 589-603.

Scanned by CamScanner

๑๙. ภัทดี ไพริศิริ. คาเฟอีน.....อันตราย. แพทยสภาสาร ๒๕๒๑; ๗:๕๘๑-๕.

๑๙. Poon GK. Analysis of catechins in tea extracts by liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry. J Chromatogr A 1998; 794:63-74.

๒๐. Miketova P, Schram KH, Whitney J, Li M, Huang R, Kerns E, et al. Tandem mass spectrometry studies of green tea catechins. Identification of three minor components in the polyphenolic extract of green tea. J Mass Spectrom 2000; 35:860-9.

๒๑. Zeeb DJ, Nelson BC, Albert K, Dalluge J. Separation and identification of twelve catechins in tea using liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. Anal Chem 2000; 72: 5020-6.

๒๒. Perez-Magarino S, Revilla I, Gonzalez-SanJose ML, Beltram S. Various application of liquid chromatography -mass spectrometry to the analysis of phenolic compounds. J Chromatogr A 1999; 847:75-81.

๒๓. Chen Z-Y, Zhu QY, Tsang D, Huang Y. Degradation of green tea catechins in tea drinks. J Agric Food Chem 2001; 49:477-82.

๒๔. วรนันท์ ศุภพิพัฒน์. ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับชาเขียว สารออกฤทธิ์ที่สำคัญ และปริมาณการบริโภคที่เหมาะสม. เอกสารประกอบการเสวนาเรื่องการดื่มชาเขียวในประเทศไทย; ๑๕ สิงหาคม ๒๕๔๘; ณ โรงแรมเดอะทวินเทาว์เวอร์, กรุงเทพมหานคร. กรุงเทพมหานคร: สวทช.; ๒๕๔๘.

๒๕. พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. ๒๕๒๒. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ ๒๑๗ พ.ศ. ๒๕๔๖ เรื่อง ชา (ฉบับที่ ๒), ราชกิจจานุเบกษา ฉบับประกาศทั่วไป เล่มที่ ๑๒๐, ตอนพิเศษ ๑๔๔ง. (ลงวันที่ ๑๗ ธันวาคม พ.ศ. ๒๕๔๖).

๒๖. พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. ๒๕๒๒. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่๒๑๐ พ.ศ. ๒๕๔๔ เรื่อง เครื่องดื่มในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท (ฉบับที่ ๓), ราชกิจจานุเบกษา ฉบับประกาศทั่วไป เล่มที่ ๑๒๒, ตอนพิเศษ ๓๗ง. (ลงวันที่ ๕ พฤษภาคม พ.ศ. ๒๕๔๘).

๒๗. พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. ๒๕๒๒. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ ๒๑๔ พ.ศ. ๒๕๔๓ เรื่อง เครื่องดื่มในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท, ราชกิจจานุเบกษาฉบับประกาศทั่วไป เล่มที่ ๑๑๔, ตอนพิเศษ ๖ ง. (ลงวันที่ ๒๔ มกราคม พ.ศ. ๒๕๔๗).

Scanned by CamScanner

Abstract **Chemical Constituents and Antioxidant Activity in Green Tea Beverages**

Nitra Nuengchamnong

Regional Medical Sciences Center, Phitsanulok, Department of Medical Sciences, Amphoe Mueang, Phitsanulok

Journal of Health Science **2006; 15:233-42.**

Twenty four samples of green tea beverages from 11 distributors were collected and categorized into 3 groups of the drinks either mixed with fruit juice (9 samples), mixed with milk (2 samples) or plain (13 samples). The antioxidant activity of all samples was evaluated using DPPH (diphenylpicrylhydrazy) assay and the ones reported with high activity were further analysed by liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometer-mass spectrometer (LC-ESI-MS-MS). The quantity of caffeine in the samples was also determined by using high performance liquid chromatography (HPLC). The experiment was carried out during January-May 2005. The results showed that twenty one of the twenty four (87.5%) samples actually had more than 80 percent of antioxidant activity. Thirteen green tea samples were extracted with ethyl acetate and the crude extract was reconstitued with methanol and injected to LC-MS system by flow injection analysis (FIA). The mobile phase consisted of acetronitrile: 0.1% formic acid, 50:50 v/v in full scan mode negative ionization. The result showed that all samples had deprotonated molecular ions $[M-H]^{-1}$ at *m/z* 169, 289, 305, 411 and 457 amu. The product-ion scan of each *m/z* was undertaken and compared the mass spectrum with standard compounds. Gallic acid, epicatechin, epigallocatechin, epicatechin gallate and epigallocatechin gallate were identified as active chemical compounds in green tea. The range of caffeine content in green tea beverages was 4-17 mg/100 ml with the average of 9.7 mg/100 ml.

Key words: **antioxidant activity, green tea beverage, LC-MS-MS, catechins, caffeine**

Scanned by CamScanner