

การตรวจวัดและหาปริมาณสารโปรแอนโทไซยานิดินในชาเขียว
ใบหม่อนและชาอื่นๆ

**The Measurement and The Extraction of Proanthocyanidins
from Mulberry green tea and other tea**

มณฑนา นครเรียบ

ครูณี พ่วงพรพิทักษ์

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

ปีการศึกษา 2545



บทคัดย่อ

ในการวิจัยในครั้งนี้เป็นการตรวจวัดและหาปริมาณสารโปรแอนโรไซยานิดินส์ในชาเขียวใบหม่อนและชาอื่นๆ ได้แก่ ชาจีน โดยใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) จะได้ผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน จากนั้นนำไปทดสอบคุณสมบัติทางเคมีเพื่อตรวจหาสารโปรแอนโรไซยานิดินส์ และวิเคราะห์หาปริมาณของสารโปรแอนโรไซยานิดินส์ในชาเขียวใบหม่อนและชาจีน โดยใช้เทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (Tin layer chromatography ; TLC) ในชาเขียวใบหม่อนและชาจีน พบว่ามีปริมาณของสารโปรแอนโรไซยานิดินส์ 0.12% และ 1.14% โดยน้ำหนัก ตามลำดับ



Abstract

This study was the measurement and the extraction of proanthocyanidins from mulberry green tea and other tea ; Chinese tea. These samples were extraction by column chromatography method. Give Yellow solid was product. Properties and measured proanthocyanidins by testing chemical. For determined proanthocyanidins from mulberry green tea and Chinese tea by Tin layer chromatography ; TLC. The result found 0.12% and 1.14% by weight , respectively.



กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคามที่ให้ความสนับสนุนโครงการวิจัย
งบประมาณจากเงินรายได้ประจำปี 2545 ในการวิจัยในครั้งนี้ ขอขอบคุณนิสิตภาควิชาเคมี ดังมีรายชื่อ
ดังต่อไปนี้ นาย พรทยา ตาลทรัพย์ นายมนชัย สงวนรัตน์ นางสาวสง่า พรรณมา นางสาวนิตยาอิน
จันทร์ ที่ช่วยทำการวิจัย

ขอขอบคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่เอื้อเฟื้อสารเคมี
วัสดุอุปกรณ์และสถานที่ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

มัทนา นครเรือบ

ครูณี พ่วงพรพิทักษ์



สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญภาพ	จ
สารบัญตาราง	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	7
บทที่ 3 วิธีการวิจัย	9
บทที่ 4 ผลการวิจัย	14
บทที่ 5 สรุป อภิปราย และข้อเสนอแนะ	17
บรรณานุกรม	18
ภาคผนวก	19



สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 องค์ประกอบของชาโดยหลักทางชีวเคมี	2
ภาพที่ 2 โครงสร้างพื้นฐานของโปรแอนโรไซฮานตินส์	5
ภาพที่ 3 แสดงสมการที่ 1 ไฮโดรไลซ์เอเบิลแทนนิน	6



สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 แร่ธาตุและวิตามินในชาจากชาใบหม่อนชนิดต่างๆ	3
ตารางที่ 2 กรดอะมิโนที่พบในชาจากชาใบหม่อนชนิดต่างๆ	4



บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ชาเป็นเครื่องดื่มที่เก่าแก่ของโลกแพร่หลายมานานกว่า 2,000 ปี (ศุภนารถ, 2538) แหล่งกำเนิดชาตามธรรมชาติมีจุดศูนย์กลางอยู่ทางตะวันออกเฉียงใต้ของจีนใกล้ต้นน้ำ อิระวดี แล้วได้แพร่พันธุ์ไปยังพื้นที่ต่างๆ ทั่วกับรูปพัด จากด้านทิศตะวันตกระหว่างเทือกเขานากา มานีบุรีและลูโซ ตามแนวชายแดนของ อัสมัม และ สหภาพพม่าไปยังมณฑลชี่เกียงของจีนทางด้านทิศตะวันออกแล้วลงสู่ทิศใต้ตามเทือกเขาของสหภาพพม่าลงมาตอนเหนือของประเทศไทยไปสิ้นสุดที่เวียดนาม โดยมีพื้นที่ทิศตะวันออกจรดทิศตะวันตกกว้างถึง 1,500 ไมล์ หรือ 2,400 กิโลเมตรระหว่างเส้นลองจิจูด 95 -120 องศาตะวันออกและจากทิศเหนือจรดทิศใต้ยาว 1,200 ไมล์ หรือ 1,920 กิโลเมตรระหว่างเส้นละติจูด 29-11 องศาเหนือ

การดื่มชาครั้งแรกได้เริ่มขึ้นที่ประเทศจีนคาดว่าไม่น้อยกว่า 2,167 ปี ก่อนคริสตกาลตำนานของการดื่มชามีหลายตำนานเรื่องชาได้บันทึกไว้ในหนังสือจีนชื่อ “เอ้อหย่า” (Er Ya :On Tea) โดยขุนนางในจักรพรรดิ Znou โดยใช้คำจำกัดความของชาว่า “ สมุนไพรรสขมชนิดหนึ่ง ”

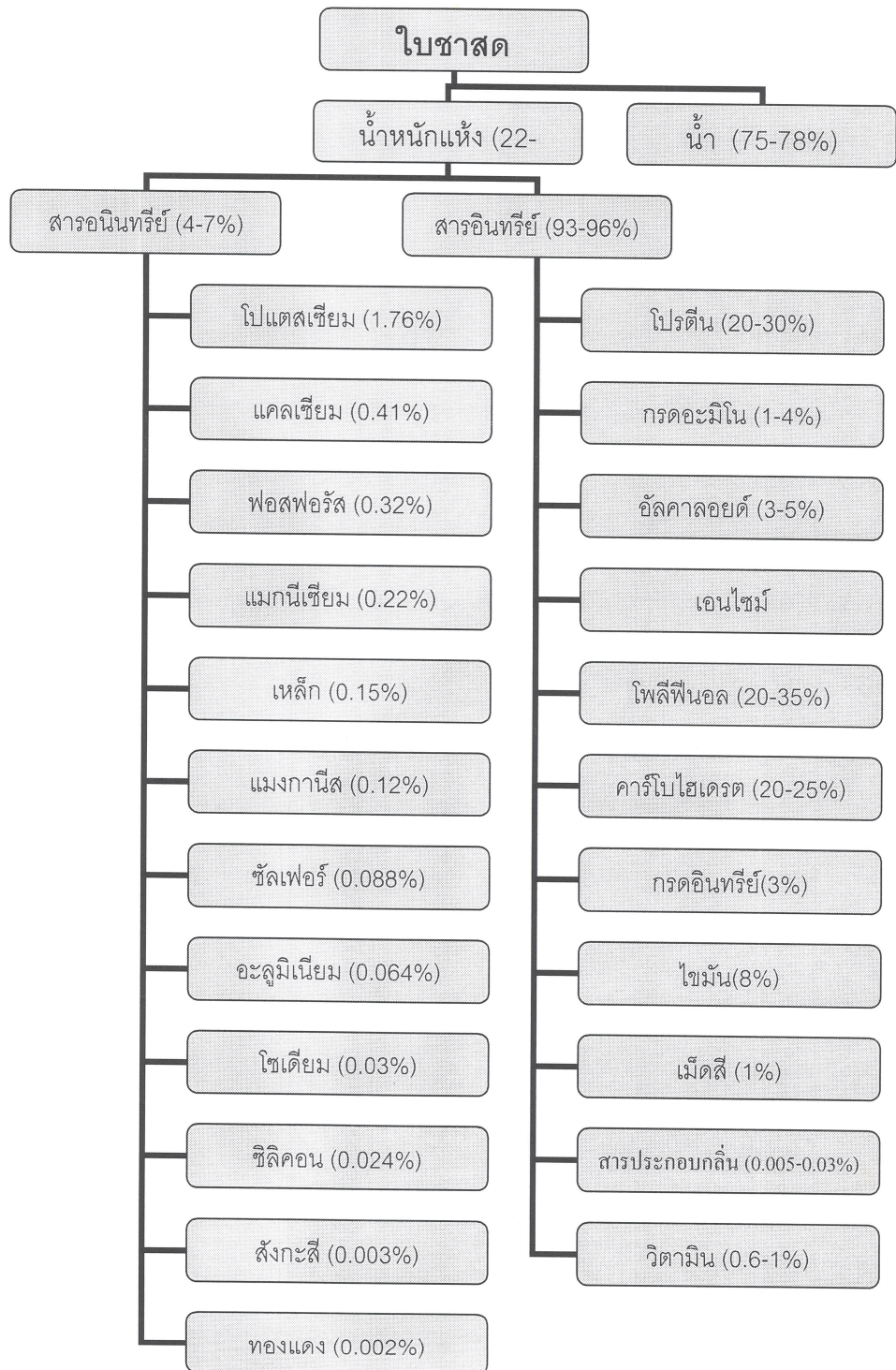
ในเอเชีย ชาได้ถูกเผยแพร่เข้ามาโดยได้เริ่มมีการรู้จักและได้นำเข้ามาปลูกที่ประเทศญี่ปุ่นโดยพระญี่ปุ่นได้เดินทางไปประเทศจีนเพื่อศึกษาคำสอนของพระพุทธศาสนาและได้นำเมล็ดชากลับมาปลูกที่ shinggaken ซึ่งประสบความสำเร็จได้ผลเป็นอย่างดี จากนั้นในปี ค.ศ. 1191 การปลูกชาได้เผยแพร่ไปทั่วประเทศ แล้วพระญี่ปุ่นที่ชื่อ “ELsai” ได้ไปเยือนจีนในปี ค.ศ. 1192 และได้เขียนหนังสือเกี่ยวกับการรักษาสุขภาพโดยการดื่มชาเป็นหนังสือเล่มแรกเกี่ยวกับชาที่เกิดขึ้นในญี่ปุ่น และได้มีประเพณีการดื่มชาและชงชามาจนถึงปัจจุบัน

สำหรับในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2535 และ 2536 มีพื้นที่การปลูกชา 34,104 และ 33,907 ไร่ มีผลผลิตชาสดรวม 45,340 และ 40,847 ตัน ตามลำดับ โดยจังหวัดที่มีการปลูกชามากที่สุดและให้ผลผลิตมากที่สุด คือ จังหวัด เชียงรายรองลงมา คือ จังหวัด ลำปาง แพร่ เชียงใหม่ ลักษณะโดยทั่วไปของ เป็นพืชกึ่งร้อน สามารถขึ้นได้ดีในเขต อบอุ่น และมีฝน จึงทำให้แหล่งปลูกชากระจายไปทั่วทวีปเอเชียและผลผลิตส่วนใหญ่อยู่ใน เอเชีย

ชาสมุนไพรเป็นเครื่องดื่มของภูมิปัญญาไทยโบราณ ซึ่งมีคนรู้จักในสมัยก่อนและใช้ดื่มเพื่อสุขภาพเป็นประจำโดยใช้ดื่มแทนน้ำและดื่มเพื่อสุขภาพร่างกายที่แข็งแรงไม่เจ็บป่วยง่าย จากผลการวิจัยในปัจจุบันก็สนับสนุนถึงความเชื่อดังกล่าว โดยสมุนไพรจะมีผลในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกาย ขับปัสสาวะ ขับเหงื่อ บำรุงกำลังแก้ปวดเมื่อยตามร่างกาย ฯลฯ ปัจจุบันเราแบ่งชาออกเป็น 3 ชนิดได้แก่ ชาเขียว ชาจีน ชาฝรั่งและแต่ละชนิดจะต่างกันตรงกรรมวิธีการผลิต แต่ชาที่มีคุณค่าต่อร่างกายมากที่สุด คือ ชาเขียว ซึ่งปัจจุบันชาเขียวก็มีมากมายหลายชนิด เช่น ชาเตย ชาเขียวใบหม่อน เป็นต้น



องค์ประกอบของชาโดยหลักทางชีวเคมี



ใบชาเขียวมีสารที่สำคัญชนิดหนึ่งคือ แทนนิน หรือฝาคชา (tea tannin) ซึ่งมีอยู่หลายชนิด พบในใบชาแห้งร้อยละ 20 – 30 โดยน้ำหนัก เป็นสารที่มีรสฝาด ที่ใช้บรรเทาอาการท้องเสียได้ และช่วยเพิ่มความยืดหยุ่นของกล้ามเนื้อหัวใจ และขยายผนังหลอดเลือดโลหิต จึงทำให้ชาเขียวเหมาะสำหรับผู้ที่มีความดันเลือดสูงด้วย ชาเขียวใบหม่อนจากใบหม่อนก็เช่นเดียวกัน โดยนักวิทยาศาสตร์ Shimmisu et al. (1992), Tsushida et al.(1987) ได้ตรวจสอบสารกาบา(GABA = Gamma aminobutyric acid) ในใบชาที่ทำจากใบหม่อน ซึ่งมีคุณสมบัติในการปรับระดับความดันโลหิตและลดการอักเสบในสมองของผู้ที่ได้รับอุบัติเหตุทางสมอง (Patric et al.,1997) นอกจากนี้ยังพบ ดี เอ็น เจ (DNJ = 1-deoxymojirimycin) ในใบหม่อนที่สามารถลดปริมาณน้ำตาลในเลือดของหนู (Chen et al., 1995) แต่ในประเทศไทยยังไม่เคยมีการนำใบหม่อนมาทำชาหรือใช้ประโยชน์ทางด้านเภสัชกรรม เมื่อเร็วๆนี้นักวิทยาศาสตร์ชาวไทยและชาวญี่ปุ่นพบว่าหม่อนมีแร่ธาตุสำคัญหลายชนิดและวิตามินที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย ซึ่งโดยรวมมีมากกว่าชาชนิดอื่น อาทิเช่น แคลเซียม โพแทสเซียม แมกนีเซียม เหล็ก สังกะสี วิตามิน เอ วิตามิน บี 1 วิตามิน บี 2 และวิตามินซี (วิโรจน์และคณะ, 2540)

ตาราง 1.1 แร่ธาตุและวิตามิน ในชาจากใบหม่อนชนิดต่างๆ ที่ได้จากการผลิตในระดับโรงงาน และระดับครัวเรือน

แร่ธาตุ	ชาเขียว โรงงาน	ชาฝรั่ง โรงงาน	ชาเขียว ครัวเรือน	เฉลี่ย	ความต้องการ/คน/ วัน (มิลลิกรัม)
แคลเซียม (มก./100 ก.)	ND	ND	2639	2639	400-500
โพแทสเซียม (มก./100ก.)	2580	2610	1573	2254	2000-3000
โซเดียม (มก./100 ก.)	84	51	51	62	2000-5000
แมกนีเซียม (มก./100 ก.)	388	398	424	403	300-350
เหล็ก (มก./100 ก.)	30	25	13	21	10-12
สังกะสี (มก./100 ก.)	3	2	2	2.3	10-15
วิตามิน					
วิตามินเอ (IU/100 ก.)	26.1	37.9	24.5	29.5	4000-5000
วิตามินบี 1 (มก./กก.)	<0.8	2.9	<0.6	1.4	1.0-1.5
วิตามินเอ 2 (มก./กก.)	4.6	3.5	5.2	4.4	1.1-1.6
วิตามินซี (มก./กก.)	17.79	26.41	7.56	17.3	45.0

ND = ไม่มีข้อมูล

NF = ตรวจไม่พบ

ที่มา: สถาบันอาหารและสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย



ตาราง 1.2 กรดอะมิโน (amino acid) ที่พบในชาจากใบหม่อนชนิดต่างๆ และที่ได้จากการผลิตในระดับโรงงานระดับครัวเรือน

กรดอะมิโน	ชาเขียว โรงงาน	ชาฝรั่งโรง งาน	ชาเขียวครัว เรือน	เฉลี่ย	ความ ต้องการ/ คน(500 กก)/วัน (มิลลิกรัม)
1. อาร์จินีน(Arginine)*	808.97	802.40	1318.55	977	?
2. ฮิสติดีน(Histidine)*	381.88	387.71	511.10	427	16500
3. ไอโซลิวซีน(Isoleucine)	693.98	686.52	970.27	784	600
4. ลูซีน(Lucine)	1323.56	1274.28	2036.09	1545	800
5. เมไทโอนีน(Methionine)	172.06	137.67	180.48	163	500
6. ซีสทีน(Cystine)	28.68	30.21	96.34	45	800
7. ฟีนิลอะลานีน(Phenylalanine)	805.60	769.42	1309.43	961	400
8. ไทโรซีน(Tyrosine)	430.24	490.57	781.61	567	150
9. ธรีโอนีน(Theonine)	688.54	690.22	1061.00	813	600
10. ทริปโตเฟน(Tryptophan)	189.15	162.43	159.04	170	700
11. ลิซีน(Lisine)	858.15	811.10	137.67	602	-
12. วาลีน(Valine)	891.89	879.13	1229.98	1000	-
13. อะลานีน(Alanine)	934.50	954.47	1400.62	1097	-
14. กลัยซีน(Glycine)	842.51	859.29	1262.10	988	-
15. กรดแอสปาร์ติก(Aspartic acid)	1681.98	1770.21	2201.74	1885	-
16. กรดกลูตามิก(Glutamic acid)	2078.05	1845.38	2843.41	2256	-
17. โพรลีน(Proline)	715.39	740.67	1162.87	873	-
18. เซรีน(Serine)	670.28	638.07	1059.63	789	-

ND = ไม่มีข้อมูล

* มีความจำเป็นเฉพาะในเด็กทารก

? ไม่ทราบปริมาณความต้องการ

ที่มา: สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย



ชาเขียวใบหม่อนจะมีรสชาติเฉพาะตัวคือ จะมีรสฝาดน้อยกว่าชาที่ทำจากใบชา จะให้น้ำชาสีเขียวอ่อนปนน้ำตาลมีกลิ่นหอมเฉพาะและในรสฝาดของชา นั้นคือแทนนินนั่นเอง

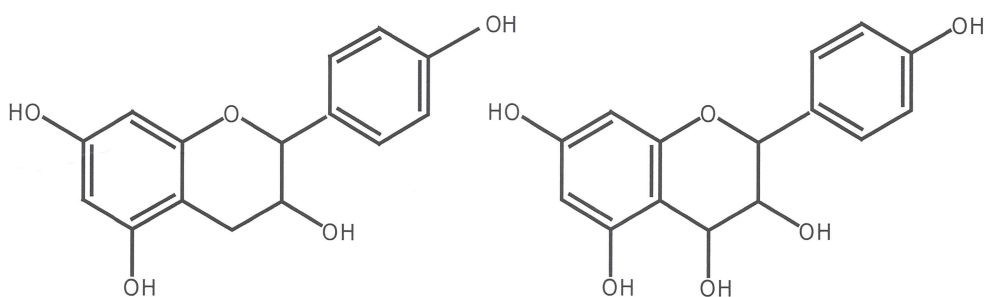
> แทนนิน หรืออาจเรียกว่า กรดแทนนิก (Tannic acid) หรือ กรดแกลโลแทนนิก (Galotannic acid) ซึ่งมีปนอยู่ในพืชและส่วนใหญ่เป็นพวกไกลโคไซด์ (Glycosides) แทนนินเป็นสารไม่มีสีและไม่มีผลึก สามารถเกิดเป็นสารละลายคอลลอยด์ในน้ำ มีมากในเปลือกต้นโอ๊ก ฝางและ Nutgall แทนนินเป็นสารที่มีรสขมและฝาด ในพืชมักจะเป็นของเหลวที่ขับออกมาจากเปลือก ลำต้นและส่วนต่างๆของพืช โดยเฉพาะทางใบ ปุ่มปม แทนนินที่มีอยู่ในชา กาแฟ และ โกโก้ ทำให้สารที่มีรสฝาดซึ่งเป็นที่ต้องการ แต่แทนนินที่อยู่ในผลไม้ดิบ เช่น ถั่วลิสงดิบ ฝรั่งดิบ เป็นรสที่ไม่พึงปรารถนา แทนนินยังมีบทบาทสำคัญในการเกิดสีน้ำตาลที่มีเอ็นไซม์เกี่ยวข้องในผักผลไม้ (รัชณี ตัณฑพานิชกุล,2542)

แทนนินประกอบด้วยสารประกอบ 2 ชนิด ได้แก่

1. คอนเดนส์แทนนิน (Condensed tannin) หรือ โปรแอนโทไซยานิดินส์ (Proanthocyanidins) ซึ่งเป็นคอนเดนส์เซชัน โพลีเมอร์ (Condensation polymer) ของคาเทชิน (Catechin) โพลีเมอร์เหล่านี้มีโครงสร้างสม่ำเสมอ แต่โมเลกุลของคาเทชินมักมาเชื่อมที่ตำแหน่ง 4 และ 8 ของวง

2. แทนนินที่ไฮโดรไลส์ได้ (Hydrolysable tannin) หรือ (Gallotannin) แทนนินเหล่านี้เป็นอนุพันธ์ของกลูโครสโดยมีกรดแกลลิก (Gallic acid) สร้างพันธะเอสเทอร์ (ester bound) กับกลูโครส เมื่อไฮโดรไลส์แทนนินประเภทนี้ด้วยกรดหรือเอ็นไซม์ จะกลายเป็นหน่วยย่อยได้กลูโครสและกรดแกลลิก (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย,2544)

สารโปรแอนโทไซยานิดินส์เป็น oligomers ของ 3 – Flavanols (คาเทชินส์) และ 4-Flavadiols (ลิวโคแอนโทไซยานิดินส์) (รูปที่ 1.1)



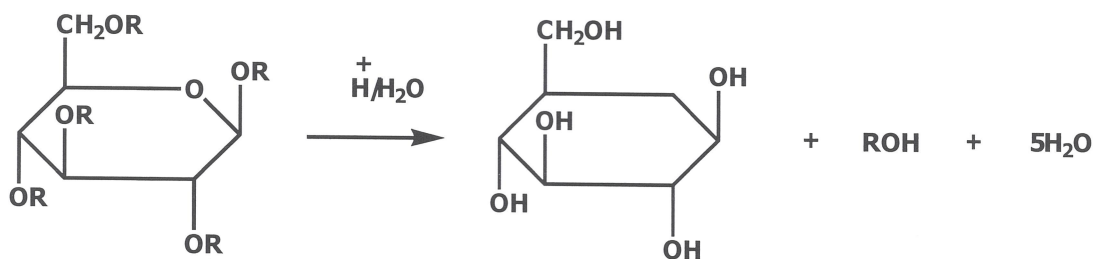
3-ฟลาโวนอล

3,4ฟลาแวนดิออล

รูปที่ 1.1 โครงสร้างพื้นฐานของโปรแอนโทไซยานิดินส์ (Proanthocyanidins)



๔ โปรแอนโทไซยานิดิน แทนนิน(Proanthocyanidin Tannins)สามารถนำไปใช้ในการผลิตแผ่นขึ้นไม้อัดแทนการใช้ฟีนอลสังเคราะห์ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากปิโตรเคมี และมีการใช้ประโยชน์แพร่หลายในเกษตรกรรม ใช้เป็นตัวยาในการรักษาโรคเบาหวาน โดยทำหน้าที่ควบคุมความสมดุลของการหลั่งฮอร์โมนจากตับอ่อน เป็นยารักษาโรคที่เกิดจากไวรัส และเป็นยาปฏิชีวนะ (Henry Trimble and Herma J.Schuchard,1985) เป็นต้น



รูปที่ 1.2 แสดงสมการที่ 1 แสดงไฮโดรไลซิสเอเบิลแทนนินด้วยกรด

วัตถุประสงค์และขอบเขต

1. เพื่อศึกษาวิธีการสกัดสารโปรแอนโทไซยานิดินส์จากชาเขียวใบหม่อนและชาอื่นๆ
2. เพื่อตรวจสอบคุณสมบัติทางเคมีและแยกชนิดของสารโปรแอนโทไซยานิดินส์ในชาเขียวใบหม่อนและชาอื่นๆ

ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถทราบถึงปริมาณของสารโปรแอนโทไซยานิดินส์ที่มีอยู่ในชาเขียวใบหม่อน ชาอื่นๆ และเผยแพร่เพื่อเป็นประโยชน์สำหรับผู้สนใจค้นคว้าต่อไป
2. เพื่อเป็นการส่งเสริมการผลิตและแปรรูปใบชาเป็นผลิตภัณฑ์พื้นบ้าน เช่นการผลิตชาเขียวชาจีน การสกัดเป็นอาหารเสริม การผลิตยา เครื่องสำอาง เป็นต้น



บทที่ 2

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ชาสมุนไพรเป็นเครื่องดื่มปัญหาไทยโบราณ ซึ่งผู้มีความรู้สมัยก่อนจะดื่มเป็นประจำแทนน้ำ เพื่อสุขภาพร่างกายที่แข็งแรง ไม่เจ็บป่วยง่าย ซึ่งจากผลการวิจัยในปัจจุบันก็สนับสนุนถึงความเชื่อดังกล่าวโดยสมุนไพรส่วนใหญ่จะมีผลในด้านการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในร่างกาย ขับปัสสาวะ ขับเหงื่อ บำรุงกำลัง แก้ปวดเมื่อยตามร่างกาย ฯลฯ ปัจจุบันอาจแบ่งชาได้เป็นสามชนิดใหญ่ๆ คือ ชาจีน ชาเขียว และ ชาฝรั่ง ชาแต่ละชนิดจะแตกต่างกันตรงกรรมวิธีการผลิตแต่ชาที่มีประโยชน์ต่อร่างกายมากที่สุด คือ ชาเขียว ใบชาเขียวมีสารสำคัญชนิดหนึ่ง คือ แทนนินหรือรสฝาด (tea tannin) ซึ่งมีหลายชนิด พบในใบชาแห้งประมาณร้อยละ 20 – 30 โดยน้ำหนัก เป็นสารที่มีรสฝาดบรรเทาอาการท้องเสียได้ และยังช่วยเพิ่มความยืดหยุ่นของกล้ามเนื้อหัวใจและขยายหลอดเลือด จึงทำให้ชาเขียวเหมาะสำหรับผู้ที่มีความดันโลหิตสูงด้วย

แทนนิน อาจเรียกว่ากรดแทนนิก (tannic acid) หรือกรดแกลโลแทนนิก (Gallotannic acid) ซึ่งมีอยู่มากในพืชและส่วนใหญ่เป็นพวกไกลโคไซด์ (Glycosides) แทนนินเป็นสารที่ไม่มีสีและไม่ตกผลึก สามารถเกิดเป็นสารคอลลอยด์ในน้ำ แทนนินเป็นสารที่มีรสขมแลฝาด ในพืชมักเป็นของเหลวที่ขับออกมาจากเปลือก ลำต้น และส่วนต่างๆ ของพืช โดยเฉพาะ ใบ ผล และปมปม (รัชนี ตันหาพานิชกุล, 2542) ในปี ค.ศ. 1920 K. Freudenberg ได้แบ่งแทนนินออกเป็น 2 จำพวกใหญ่ๆ ได้แก่ Hydrolysable Tannins และ Condensed Tannins ซึ่ง Hydrolysable Tannins หรือ Pyrogallotannins นี้ เป็นอนุพันธ์ของกลูโคส โดยมีกรดแกลลิก (Gallic acid) สร้างพันธะเอสเทอร์ (ester bond) กับกลูโคส สามารถถูกไฮโดรไลซ์ด้วยกรดหรือเอนไซม์กลายเป็นหน่วยย่อย ส่วน Condensed Tannins หรือ Proanthocyanidins ซึ่งเป็น Condensation polymer ของคาเทชิน (Catechin) (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, 2544) ซึ่งไม่สามารถถูกไฮโดรไลซ์ด้วยกรด แต่จะให้ผลิตภัณฑ์ที่ไม่ละลายน้ำและโครงสร้างสลับซับซ้อน องค์ประกอบพื้นฐานที่พบในแทนนิน นอกเหนือจากน้ำตาล ได้แก่ กรดแกลลิก กรดแอลลาจิก ฟลาโวนอยด์ ลิกแนนส์ สทิลบินอยด์ และคีโตน เป็นต้น รวังกุ่มหักที่มีความสำคัญได้แก่ กลุ่มแกลโลแทนนิน แอลลาจิกแทนนิน และโปรแอนโทไซยานิดินส์ (A.Y. Leung, 1980)

สารโปรแอนโทไซยานิดินส์ (Proanthocyanidins) หรือ โอซีพี (OCP) (Haslam, E. 1989) เป็นสารแทนนินชนิดหนึ่งที่มีคุณสมบัติเป็นสารแอนติออกซิเดนต์ (antioxidant) หรือสารต้านอนุมูลอิสระได้ดี ซึ่งจะช่วยกำจัดอนุมูลอิสระไม่ให้ไปส่งผลกระทบต่อกระบวนการเร่งความแก่ก่อนวัย จึงทำให้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในวงการเครื่องสำอางค์และใช้เป็นสารอาหารเสริม (Meuiner MT, Duroux EBastide. P. 1989) นอกจากนี้ สารโปรแอนโทไซยานิดินส์ (Proanthocyanidins) จะช่วยเพิ่มความแข็งแรงและต่อต้านความเสื่อมสภาพของหลอดเลือด โดยมีคุณสมบัติพิเศษที่สามารถจับตัวได้ดีกับสารที่มีหน้าที่เพิ่มความแข็งแรงและยืดหยุ่นให้เส้นเลือดจำพวกอีลาสติกไฟเบอร์ (Elastic fiber) ได้แก่ คอลลาเจน (Collagen) และอีลาสติน



(Elastin) ซึ่งจะทำให้เลือดมีคุณสมบัติทางชีวเคมีได้ดีขึ้น (Robert.L.,Godeau.G.,Gavingnet-Jeannin G.,Groult N.,Six.C.,Robert A.M1990) และเอื้อประโยชน์ต่อการรักษาโรคที่เกี่ยวกับความผิดปกติของ เส้นเลือดหลายชนิด เช่น หลอดเลือดฝอยเปราะ การเลือดขาดเลือดมาเลี้ยงเส้นเลือดส่วนปลาย เช่นตาม แขนขาชนิดเรื้อรัง

จากการศึกษาในหนูทดลองโดยให้กินสารโปรแอนโธไซยานิดินส์(Proanthocyanidins)หรือ โอฟีซี ที่สกัดได้จากเมล็ดองุ่น(เป็นพืชที่มีปริมาณสาร โอฟีซีสูง)แล้วศึกษาค่าความเป็นพิษเฉียบพลันพบว่า ค่า แอลดี 50 (LD 50) มีค่ามากกว่า 4000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัวแล้วทำการศึกษาพิษในด้าน อื่นๆก็พบว่าไม่ผลร้ายใดๆแม้จะรับประทานในปริมาณที่สูงมากก็ตาม จากการศึกษาค่าความเป็นพิษเมื่อรับประทานต่อกันเป็นเวลานานโดยให้สุนัขรับประทานสารสกัดจากเมล็ดองุ่น 60มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวนาน 12 เดือน และให้หนูกินในขนาดเท่ากันเป็นเวลา 6 เดือน พบว่าไม่มีอันตรายใดๆ (Murry M.T.and Pizzorno J. 1998)นักวิทยาศาสตร์ได้ทดลองศึกษาเรื่องความเป็นพิษในเชิงก่อมะเร็งและการกายพันธุ์ พบว่ามีความปลอดภัยรวมทั้งไม่มีผลใดๆต่อการเป็นหมันและเมื่อมารดารับประทานสารสกัดจากเมล็ด องุ่นก็ไม่มีผลร้ายใดๆต่อทารกทั้งก่อนและหลังคลอด(Indena S.p.A.,Internal Report(Data on file)

จากความสำคัญดังกล่าวข้างต้นจะเห็นในชาเขียวมีสารสำคัญต่างๆมากมายที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้มุ่งเน้นที่จะศึกษาถึงการตรวจวัดและหาปริมาณโปรแอนโธไซยานิดินส์ซึ่งจากการรายงานมีผู้ค้นพบว่าในใบชามีสารนี้เช่นเดียวกัน



บทที่ 3

วิธีการวิจัย

เครื่องมือและอุปกรณ์

- เครื่องกลั่นสุญญากาศ (Rotary Vacuum Evaporator)
- เครื่องวัดความเป็นกรด ต่าง (pH meter)
- ปิเปต (pipette)
- คอลัมน์แยกสาร (Column chromatography)
- ขวดรูปชมพู่ (Erlenmayer flask)
- เครื่องชั่งสาร (Analytical Balance)
- บีกเกอร์ (Beaker)
- หลอดทดสอบ (Test Tube)
- TLC plate (Thin Layer Chromatography)
- ตู้อบ (oven)
- เทอร์โมมิเตอร์ (Thermometer)
- ตู้ดูดความชื้น (diecater)
- กรวยกรอง
- กระดาษกรอง เบอร์ 1

สารเคมี

ชื่อสารเคมี	สูตร
1. Ethanol	C_2H_6O
2. Methanol	CH_4O
3. Formic acid	$C_2H_4O_2$
4. Lead Acetate	$Pb(CH_3OO)2$
5. Gelatin	-
6. Bromine Solution	Br_2
7. Iodine	I_2
8 .Silica	$SiCO_3$
9. Pyrocatechol	$C_6H_6O_2$



พืชตัวอย่าง

- ตัวอย่างชาเขียวใบหม่อนจากศูนย์นวัตกรรมหม่อนไหมและชาจีนอบดอกมะลิ

วิธีการทดลอง

- การสกัดแทนนินจากตัวอย่างชาเขียวใบหม่อน

นำตัวอย่างชามาชั่งด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่งให้ได้น้ำหนักตัวอย่าง 20 กรัม นำตัวอย่างที่ชั่งได้ไปต้มในน้ำที่ต้มรอไว้ ที่อุณหภูมิ 80-90 องศา ปริมาณ 250 มิลลิลิตร โดยทำตัวอย่างละ 2 ครั้ง ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 80-90 องศา เป็นเวลา 10 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำไปกรองด้วยกระดาษกรองพับจีบ แล้วนำสารละลายที่ได้จากการกรองไประเหยน้ำออกด้วยเครื่องกลั่นสุญญากาศ (Rotary Vacuum Evaporator) เติมน้ำมันลงไปเล็กน้อยเพื่อช่วยให้ขจัดน้ำออกได้เร็วขึ้นปล่อยให้ระเหยออกไปจนได้สารที่เหนียวข้น แล้วนำออกมาเติมน้ำสารละลาย เฟอร์ริก คลอไรด์ (1% Formic acid) กับ เมทานอล (Methanol) ที่ผสมกันในอัตราส่วน 1:4 เติมน้ำลงไปประมาณ 250 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายที่ได้มากรองอีกครั้งด้วยกระดาษกรองพับจีบ หลังจากนั้นนำสารละลายที่ได้จากการกรอง ไปผ่านคอลัมน์แยกสารโดยภายในคอลัมน์บรรจุซิลิกาอยู่ (ประมาณ 10 เซนติเมตร โดยไม่ให้มีช่องอากาศอยู่ และห้ามให้ซิลิกาแห้ง) เทสารละลายที่ได้จากการกรองลงในคอลัมน์โดยใช้อัตราการใช้หลอด / นาทีปล่อยให้ สารละลายในคอลัมน์หมด แล้วเทเอทานอลลงไปในคอลัมน์ใช้บีกเกอร์รองสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ลงมา (บีกเกอร์ต้องอบและชั่งน้ำหนักที่แน่นอนแล้ว) จนกระทั่งสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ลงมา มีสีใส แล้วจึงนำไประเหยเอาสารละลายเอทานอลออกจนหมด จากนั้นนำไปอบในตู้อบประมาณ 60-70 องศา จากนั้นนำไปเข้าสู่ชุดความชื้นจนได้ของแข็งนำบีกเกอร์ ที่มีสารแทนนินที่ได้ไปชั่งน้ำหนัก บันทึกน้ำหนักที่ได้

การวัดค่า pH ของสารละลายแทนนิน

นำสารแทนนินที่สกัดได้ละลายน้ำแล้วนำไปปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัดค่า pH ของสารละลายโดยใช้ pH meter

การตรวจสอบหาสารโปรแอนโธไซยานินในแทนนิน

นำสารแทนนินที่สกัดได้ไปทดสอบกับสารเคมีต่างๆและเทคนิคทินเลเยอร์ โครมาโทกราฟี (Thin layer Chromaatography : TLC) เพื่อตรวจสอบว่าแทนนินที่สกัดได้จากชาเขียวใบหม่อนเป็นแทนนินประเภทใด โดยใช้วิธีการทดลองดังต่อไปนี้

1. เตรียมสารละลายแทนนินที่สกัดได้จากชาเขียวใบหม่อน ละลายในน้ำ 20 มิลลิลิตรแล้วแบ่งใส่หลอดทดลอง หลอดละ 2 มิลลิลิตร โดยทำการทดลอง 2 ครั้ง ทำการทดลองดังต่อไปนี้

1.1) หลอดที่ 1 เติมน้ำสารละลายเฟอร์ริก คลอไรด์ (ferric chloride) 2-3 หยด สังเกตการเกิดตะกอนถ้าเป็นไฮโดรไลซ์เอเบิล แทนนิน จะเกิดตะกอนสีน้ำเงินดำ แต่ถ้าเป็นคอนเดนซ์ แทนนิน จะเกิดตะกอนสีเขียว



1.2) หลอดที่ 2 เติมสารละลาย 1% เลดอะซิเตต (1% Lead Acetate) 1 มิลลิลิตร สังเกตการเกิดตะกอน

1.3) หลอดที่ 3 เติมสารละลาย 1% เจลาติน (1% Gelatin) 1 มิลลิลิตร สังเกตการเกิดตะกอน

1.4) หลอดที่ 4 เติมสารละลายโบรมีน (Bromine solution) 2-3 สังเกตการเกิดตะกอน ถ้าเป็นไฮโดรไลซ์เอเบิล แทนนิน จะไม่เกิดตะกอน แต่ถ้าเป็นคอนเดนซ์ แทนนิน จะเกิดตะกอนสีแดง

2. หยดสารละลายแทนนินที่สกัดได้จากชาเขียวใบหม่อนและสารละลายมาตรฐานไพโรคัทเธฮอล (Pyrocathedhol) ที่เตรียมไว้ลงบนแผ่น TLC สำเร็จที่ได้ตัดขนาดที่พอเหมาะ และใช้สารละลาย เอทานอล 95% 10 มิลลิลิตร เป็น เฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) แล้วหาค่า R_f ของสารละลายแทนนินจากชาเขียวใบหม่อน

การหาค่าการละลายน้ำของแทนนินในชาเขียวใบหม่อน

การทดลองนี้เป็นการหาค่าของการละลายได้ของแทนนินจากชาเขียวใบหม่อน เพื่อเป็นแนวทางในการสกัดแทนนินในตัวอย่างอื่นๆ โดยใช้ปริมาณของตัวทำละลายที่น้อยที่สุดโดยการหยดน้ำที่ละลายลงจนกระทั่งแทนนินละลายหมด โดยใช้ น้ำที่อุณหภูมิห้อง และใช้น้ำร้อนที่ประมาณ 80-100 องศา

การทดสอบการตกตะกอนในเครื่องต้มชาเขียวใบหม่อน

เนื่องจากแทนนินเป็นสารที่พบได้ในพืชทั่วไปรวมทั้งในใบหม่อนเมื่อนำมาทำเป็นชาแล้ว เมื่อชงชาจะทำให้ น้ำชาที่ได้นั้นข้นอันเกิดจากแทนนิน และสารคอลลอยด์ตัวอื่นๆ ที่ปนอยู่ด้วยคุณสมบัติอย่างหนึ่งของแทนนินคือจะตกตะกอนกับโปรตีนได้ ดังนั้นจึงได้นำคุณสมบัตินี้มาใช้ในการศึกษาและทำการทดลอง โดยนำน้ำชาที่ได้จากการชงมาใส่ในหลอดทดลอง 2 หลอด แล้วเติมสารละลาย 1% เจลาติน โดยหลอดที่ 1 เติม 1 มิลลิลิตร แล้วหลอดที่ 2 เติม 2 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 2 ชั่วโมง สังเกตตะกอนที่เกิดขึ้น

ขั้นตอนการทดลอง

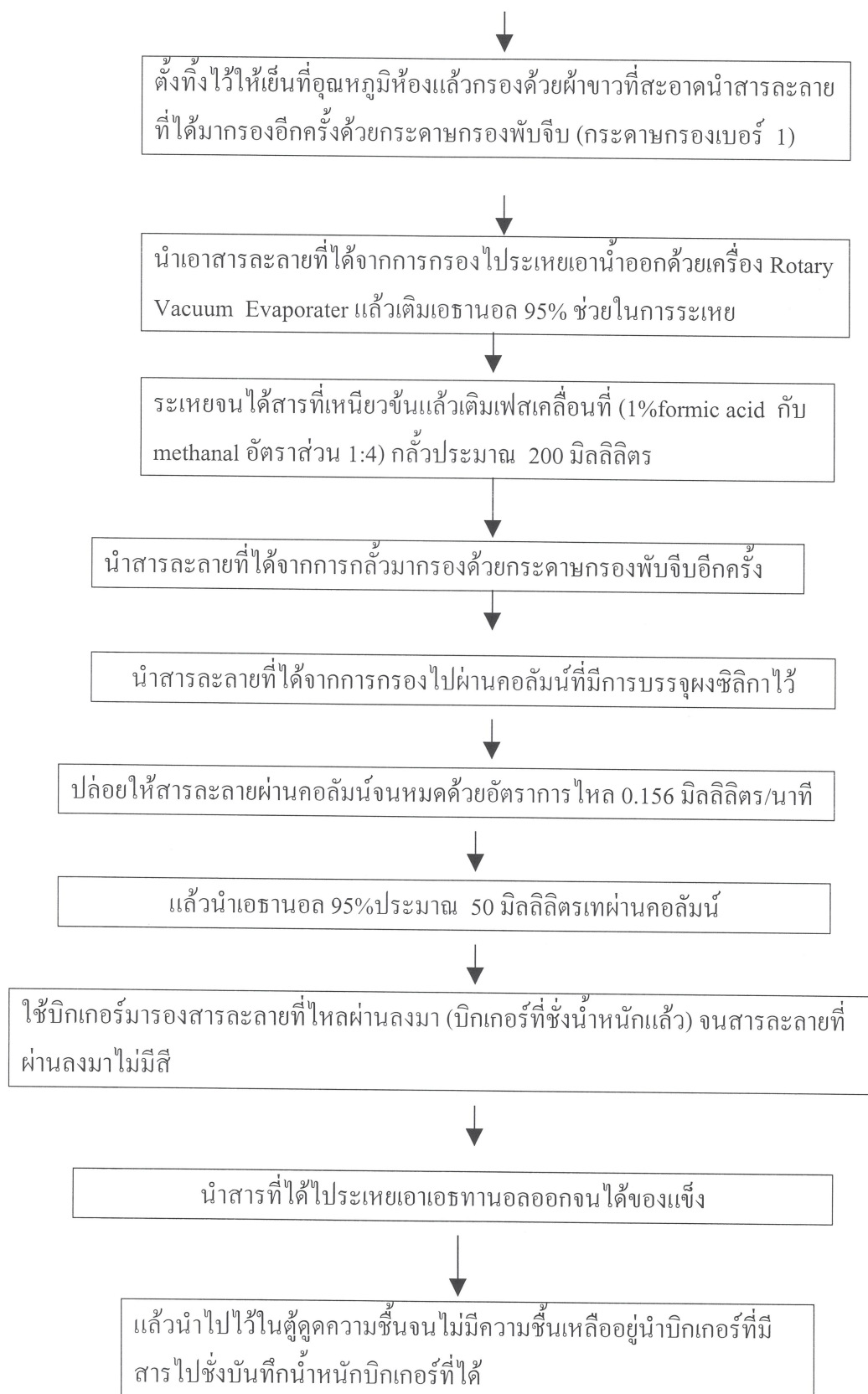
ตัวอย่างจากศูนย์นวัตกรรมหม่อนไหมซึ่งตัวอย่าง(ชาเขียว,ชาจีน)

20 กรัม

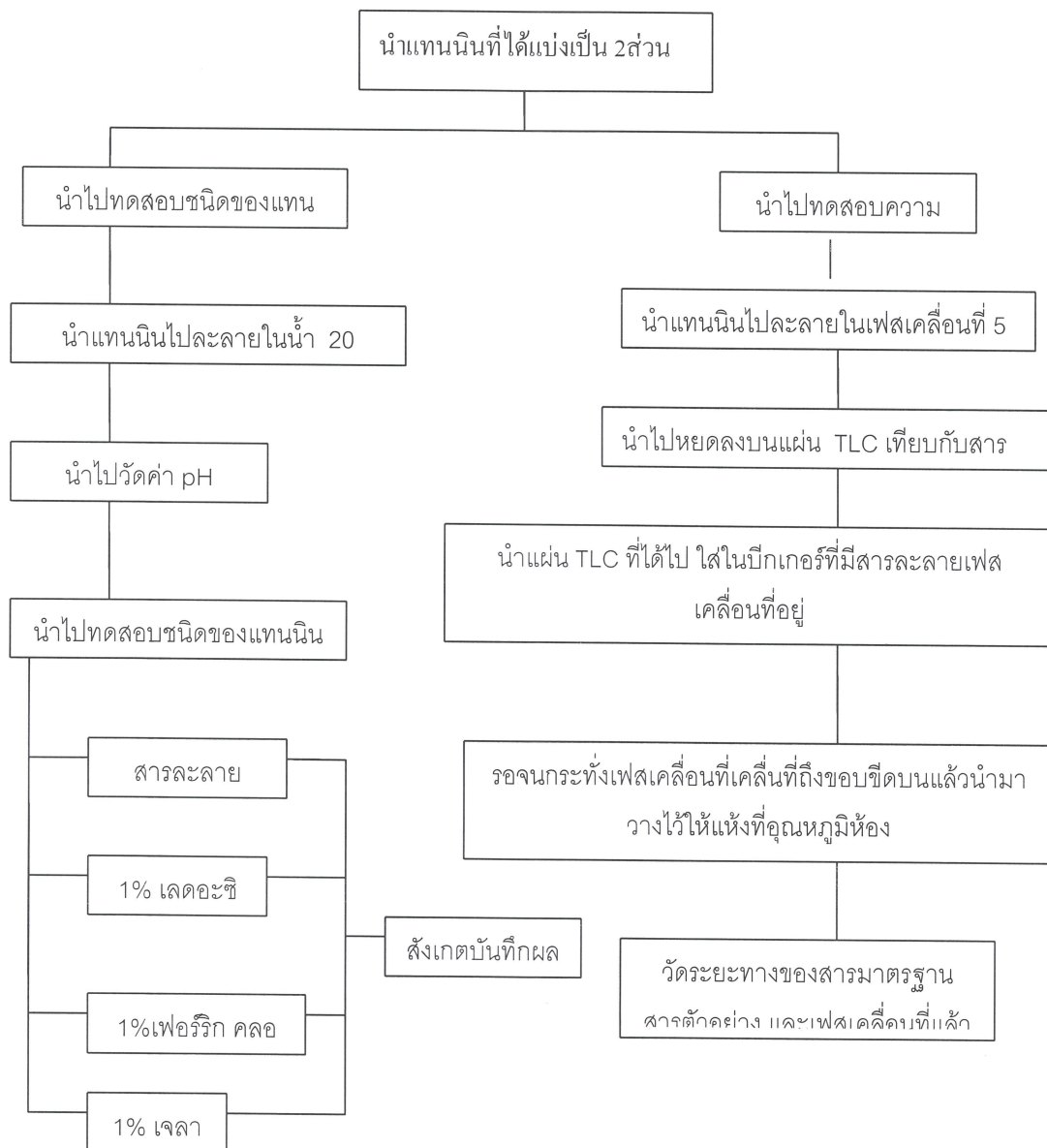


ต้มในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 80 – 90 องศาปริมาตร 250 มิลลิลิตร ควบคุมอุณหภูมิไม่ให้เกิน 90 องศา





การทดสอบหาสารโปรแอนโธไซยานิน



บทที่ 4
ผลการวิจัย

ตารางที่ 1 ปริมาณของแทนนินที่พบในชาเขียวใบหม่อนและชาจีน

ตัวอย่าง	ปริมาณที่พบในใบหม่อน(%)	ปริมาณที่พบในชาเขียวใบหม่อนที่ทดลอง (%)
ชาเขียวใบหม่อน	20-30	0.12
ชาจีน	20-35	1.419

ตารางที่ 2 ค่า pH ของสารละลายแทนนินในชาเขียวใบหม่อนและชาจีน

ตัวอย่าง	pH สารละลายมาตรฐาน (0.5 M)	pH สารละลายแทนนิน
ชาเขียวใบหม่อน	5.2	4.2
ชาจีน	4.2	4.6

ตารางที่ 3 ผลการตรวจสอบหาสารโปรแอนโธไซยานิดินส์ในชาเขียวใบหม่อนและชาจีน

สารเคมีที่ใช้ทดสอบ	ผลการทดสอบสารละลายแทนนิน
1% เฟอริกคลอไรด์	ได้สารละลายน้ำเงินเขียวเกิดขึ้น
1% เกลอะซิเตด	เกิดเป็นตะกอนสีเหลืองอ่อนเกิดขึ้นบริเวณก้นหลอด



1% เจลาติน	เกิดการแยกชั้นเป็นชั้นคอลลอยด์เกิดขึ้นและตกตะกอนบางเล็กน้อย ได้สารละลายค่อนข้างใสและมีตะกอนวุ้นเกิดขึ้น (ชาจีน)
สารละลายโบรมีน	เกิดตะกอนสีแดงอิฐบริเวณก้นหลอดทดลอง

ตารางที่ 4 ค่า R_f ของสารละลายแทนนินจากชาเขียวใบหม่อนและชาจีน

สาร	ค่า R_f
สารละลายมาตรฐาน(โปรแอนโทไซยานิดินส์)	0.88
สารโปรแอนโทไซยานิดินส์จากชาเขียวใบหม่อน	0.84
สารโปรแอนโทไซยานิดินส์จากชาจีน	0.86

ตารางที่ 5 ผลการตกตะกอนคอลลอยด์สารละลายแทนนินและ1%เจลาตินของชาเขียวใบหม่อน

หลอดที่	สารละลาย 1%เจลาติน(มิลลิลิตร)	ผลการตกตะกอน
1	1	เกิดการแยกชั้นเกิดเป็นชั้นคอลลอยด์เกิดขึ้นและตกตะกอนบางเล็กน้อย
2	2	เกิดการแยกชั้นและมีการตกตะกอนมากขึ้น



ตารางที่ 6 ผลการตกตะกอนคอลลอยด์สารละลายแทนนินและ1%เจลาตินของชาจีน

หลอด ที่	สารละลาย 1%เจลาติน (มิลลิลิตร)	ผลการตกตะกอน
1	1	สารละลายใสมีตะกอนวุ้นเกิดขึ้น
2	2	สารละลายใสมีตะกอนวุ้นมากขึ้น



บทที่ 5

สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาการตรวจวัดและหาปริมาณสารโปรแอนโธไซยานิดินส์ ซึ่งเป็นแทนนินชนิดหนึ่งในชาเขียวใบหม่อนและชาอื่นๆ ในการทดลองนี้จะใช้ชาจีนเปรียบเทียบกับชาเขียวใบหม่อน โดยเริ่มจากการสกัดสารแทนนินก่อน ซึ่งพบว่าทั้งชาเขียวใบหม่อนและชาจีนมีสารแทนนิน สามารถสกัดออกมาได้โดยใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยพบสารแทนนินในชาเขียวใบหม่อน 0.12% และในชาจีน 1.419% สาเหตุที่พบสารแทนนินในชาจีนมากกว่าชาเขียวใบหม่อนอาจจะเป็นเพราะว่ากรรมวิธีในการผลิตชาต่างกัน คือชาเขียวใบหม่อนจะใช้ความร้อนและเวลาในกระบวนการผลิตนานกว่าชาจีน และนอกจากนี้ค่า pH ที่วัดได้ของชาเขียวใบหม่อนเมื่อเทียบกับสารละลายมาตรฐานจะมีค่าต่างกันมากกว่าเมื่อเทียบกับชาจีน เมื่อนำแทนนินที่สกัดได้ไปตรวจสอบหาสารโปรแอนโธไซยานิดินส์โดยทดสอบกับ 1% Ferric chloride จะได้ตะกอนสีเขียว ทดสอบกับ 1% Lade acetate จะได้ตะกอนสีเหลือง ทดสอบกับสารละลายโบรมีน เกิดตะกอนสีแดงอิฐ และทดสอบกับ 1% Galatin ให้ตะกอนวุ้น(เห็นชัดเฉพาะชาจีน) แสดงว่าทั้งชาเขียวใบหม่อนและชาจีนมีสารโปรแอนโธไซยานิดินส์ แต่ไม่สามารถแยกออกจากแทนนินตัวอื่นๆ ได้โดยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (TLC) เนื่องจากว่าในขั้นตอนนี้ต้องใช้สารตั้งต้นในปริมาณมาก ซึ่งจากการทดลอง ใช้สารตั้งต้น(ใบชาแห้ง) 20 กรัม สามารถสกัดแทนนินออกมาได้ 0.037 กรัม(ชาเขียวใบหม่อน) และ 0.228 กรัม(ชาจีน) แสดงว่าจะต้องใช้ใบชาแห้งถึง 1 กิโลกรัม จึงจะสามารถแยกสารโปรแอนโธไซยานิดินส์ออกจากแทนนินได้ ซึ่งการใช้สารตั้งต้นในปริมาณมากนี้ไม่เหมาะกับการสกัดและแยกโดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟีและทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี และยังเสียค่าใช้จ่ายสูงด้วย ควรจะใช้เทคนิคอื่นๆที่สามารถแยกสารปริมาณน้อยๆได้อย่างมีประสิทธิภาพ เช่น ลิดโครมาโทกราฟี (LC) หรือ HPLC เป็นต้น ซึ่งน่าที่จะทำการศึกษาในครั้งต่อไปโดยใช้เทคนิคดังกล่าวนี้

จากผลการทดลองที่ได้แสดงว่าชาเขียวใบหม่อนและชาจีนมีสารโปรแอนโธไซยานิดินส์ แต่มีในปริมาณที่ไม่มาก และในชาจีนน่าจะมีโปรแอนโธไซยานิดินส์มากกว่าชาเขียวใบหม่อน เพราะว่าปริมาณของแทนนินมากกว่า



บรรณานุกรม

1. รัชณี ดัชนีพานิชกุล,เคมีอาหาร, พิมพ์ครั้งที่ 7 กรุงเทพฯ,ภาควิชาเคมี,คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง,2542 หน้า 89-124.
2. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย,ทรัพยากรพืชในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ 3(พืชที่ให้สีย้อมและแทนนิน),ชวนพิมพ์,กรุงเทพฯ,2544.
3. ประดิษฐ์ มีสุขุม,ชีวเคมี,พิมพ์ครั้งที่2,สงขลา ,ภาควิชาเคมี,คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ, 2534.
4. A.Y.Leung,*Encyclopedia of Common Natural Ingredients Used in Food,Drug and Cosmetic, Consultant,Natural Products*glen Rock,New Jersey,1980,pp.305-306.
5. E.Haslam,*Plant polyphenols*,Cambridge University Press,New York,1989,pp.14-15.
6. L.Rbert,G.Godeau,G.Gavingnet-Jeanning,N.Groult,C.Six and A.M.Robert,*Path Biol.*,38,1990, pp.608.
7. M.T.Meunier,E.Duroux and P.Bastide,*Plantes medicinales et phytoterapie* xxxlll.1989,pp.267.
8. Indena S.P.A.,*Internal Report* (Data on file).
9. M.T.Murray and J.Pizzorno,*J.Encyclopedia of Natural Medicine,Revised 2nd* ed.USA.



ภาคผนวก

ภาคผนวก ก. การหาปริมาณแทนนิน

ตารางภาคผนวกที่ 1 ปริมาณแทนนิน

ตัวอย่าง	น้ำหนักตัวอย่าง(กรัม)		ปริมาณแทนนิน(กรัม)	
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2
ชาเขียวใบหม่อน ชาจีน	20.0751	20.0172	0.0723	0.0240
	20.0233	20.0248	0.2280	0.2293

ตารางภาคผนวกที่ 2 การหาปริมาณแทนนิน โดยใช้น้ำหนักบีกเกอร์

ตัวอย่าง	น้ำหนักบีกเกอร์ก่อนทดลอง(กรัม)		น้ำหนักบีกเกอร์หลังทดลอง(กรัม)	
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2
ชาเขียวใบหม่อน ชาจีน	51.9199	51.9213	51.9922	51.9453
	52.8884	52.8891	53.1164	53.1184

การคำนวณ % แทนนินในตัวอย่างชาเขียวใบหม่อน

$$\% \text{ แทนนิน} = \frac{\text{น้ำหนักบีกเกอร์หลังทดลอง} - \text{น้ำหนักบีกเกอร์ก่อน ทดลอง}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}} \times 100$$

ตารางภาคผนวกที่ 3 % แทนนินที่พบในตัวอย่างชาเขียวใบหม่อนและชาจีน

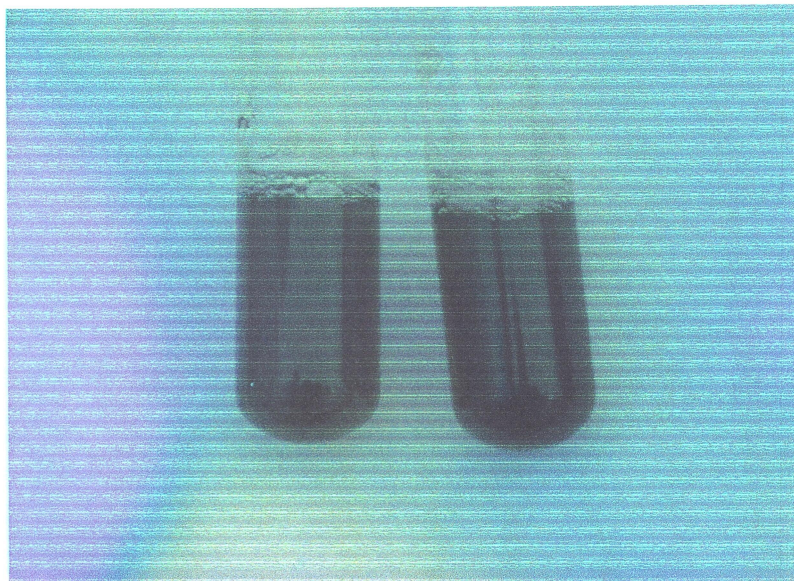
ตัวอย่าง	%ที่พบ		เฉลี่ย
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	
ชาเขียวใบหม่อน ชาจีน	0.36	0.12	0.24
	1.1387	1.1450	1.1419

ตารางภาคผนวกที่ 4 แสดงค่า pH ของสารละลายมาตรฐานและสารละลายแทนนินในชาเขียวใบหม่อนและชาจีน

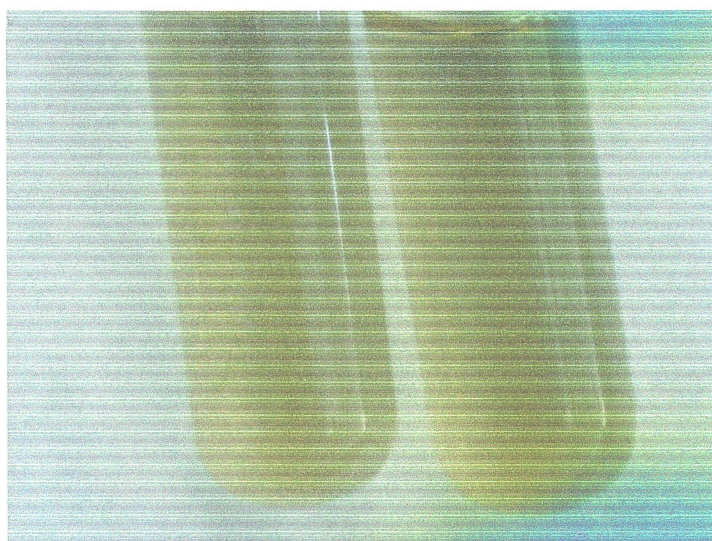
สารละลาย	pH ของสารละลาย
สารละลายมาตรฐาน (0.5 M โปรแอนโทไซยานิน ดินส์	5.2
สารละลายสารโปรแอนโทไซยานินดินส์ในชาเขียว ใบหม่อน	4.2
สารละลายแทนนินสารโปรแอนโทไซยานินดินส์ชา จีน	4.6



ภาคผนวก ข. รูปผลการทดลอง

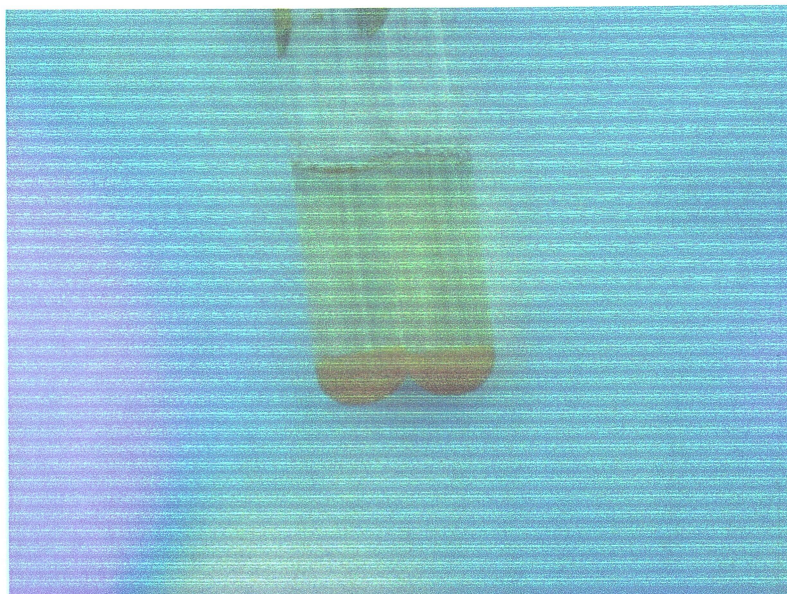


รูป ข.1 แทนนินทำปฏิกิริยากับ1% เฟอริกคลอไรด์

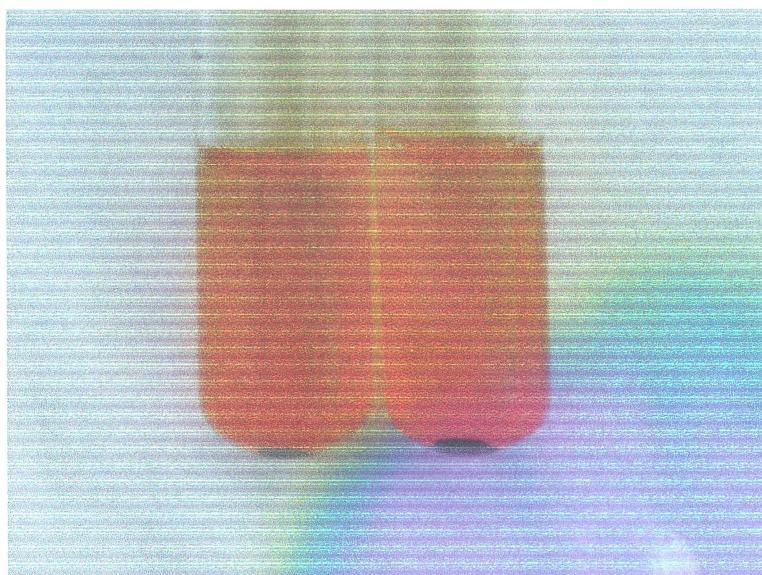


รูป ข.2 แทนนินทำปฏิกิริยากับ1% เดคอะซิเตด



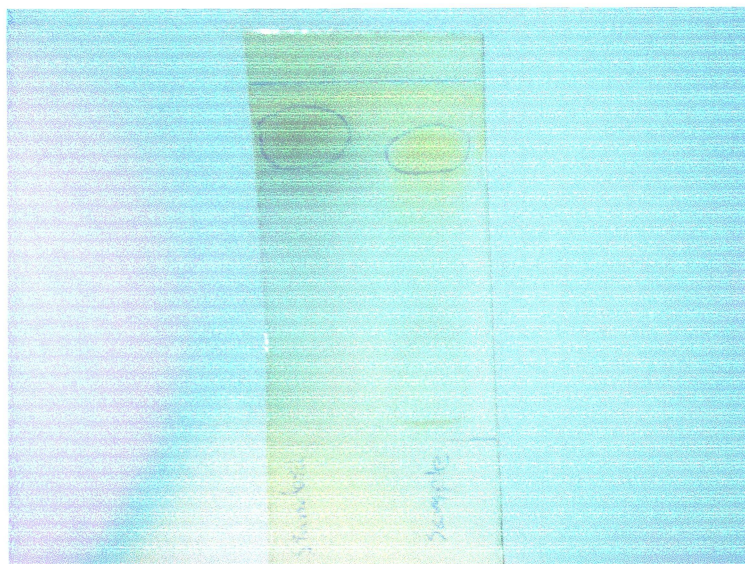


รูป ข.3 แทนนินทำปฏิกิริยากับ1% เจลาติน



รูป ข.4 แทนนินทำปฏิกิริยากับสารละลายโบรมีน





รูป ข.5 แสดงผลการทดลองโดยใช้ TLC ระหว่างสารมาตรฐานกับสารตัวอย่าง

