

6.914608

สัญญาเลขที่ 18/ 2550

รหัสโครงการวิจัย 5005020018

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงชนิดและปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ
(โพลีฟีนอล) ในระหว่างกระบวนการผลิตชาเขียว
และชาอู่หลงของจังหวัดเชียงราย

A Study on Changes of Kind and Quantity of Antioxidants
(Polyphenols) during Green and Oolong Tea
Processing in Chiang Rai

โดย

ดร. ชีรพงษ์ เทพกรณ์

สำนักวิชาอุตสาหกรรมเกษตร

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

ประจำปี พ.ศ. 2550

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จและลุล่วงไปด้วยดีด้วยความสนับสนุน ร่วมมือ และช่วยเหลือจากบุคคล และหน่วยงานต่าง ๆ หลายหน่วยงานดังนี้

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวงที่ได้ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยตลอดทั้งโครงการ ขอขอบคุณ คุณจรรवरณ คุณกัจกร ห้างหุ้นส่วนจำกัด สุวิรุฬษาไทย ซึ่งเป็นผู้ประกอบการชาที่ได้ร่วมวิจัยในครั้งนี้ ขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และโครงการจัดตั้งสถาบันฯ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง ที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์ทางวิทยาศาสตร์ต่าง ๆ

ขอขอบคุณเพื่อนพนักงานนักวิทยาศาสตร์ อันได้แก่ คุณวีรवरณ ลีวะพงษ์เพียร คุณจิรนนท์ ชัยวาทธิ ที่ได้เอื้อเฟื้อ และอำนวยความสะดวกในการใช้เครื่อง HPLC ขอขอบคุณ คุณกาญจนา ยามิ ที่ได้ช่วยเหลือและประสานงานเกี่ยวกับการวิเคราะห์ และขอขอบคุณผู้เกี่ยวข้องทุกท่านที่ได้กล่าวนามในที่นี้ ซึ่งมีส่วนช่วยให้งานวิจัยนี้สำเร็จและลุล่วงไปด้วยดี

ธีรพงษ์ เทพกรณ์

พฤษภาคม 2552

บทสรุปผู้บริหาร

ชา (*Camellia sinensis* L.) เป็นพืชเศรษฐกิจชนิดหนึ่งที่ปลูกกันมากบนพื้นที่สูงในจังหวัดเชียงราย ชาที่ปลูกส่วนใหญ่เป็นชาพันธุ์อัสสัม (*Camellia sinensis* var. *assamica*) และชาจีน (*Camellia sinensis* var. *sinensis*) พันธุ์อู่หลงเบอร์ 17 และอู่หลงเบอร์ 12 การแปรรูปส่วนใหญ่จะนำไปผลิตชาเขียวหรือชาไม่หมัก (green tea, non-fermented tea) และชาอู่หลงหรือชากึ่งหมัก (Oolong tea, semi-fermented tea) สารต้านอนุมูลอิสระที่อยู่ในชาเขียวและชาอู่หลงคือโพลีฟีนอลที่เรียกว่า คาเทชิน ปัจจัยที่สำคัญที่ส่งผลต่อชนิดและปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในชาคือ “กระบวนการผลิต”

กระบวนการผลิตชาเขียว และชาอู่หลงทำให้เกิดปฏิกิริยาทางเคมี และชีวเคมีต่าง ๆ ของโพลีฟีนอล เช่น enzymatic browning, oxidation, polymerization, thermal degradation และ epimerization ซึ่งการเกิดปฏิกิริยาเหล่านี้ในแต่ละขั้นตอนของกระบวนการผลิตจะส่งผลต่อลักษณะทางคุณภาพ และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของในชา ดังนั้น การศึกษาการเปลี่ยนแปลงชนิดและปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระในกระบวนการผลิตของโครงการวิจัยนี้ ทำให้ทราบว่าขั้นตอนใดในกระบวนการผลิตที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงชนิด และปริมาณโพลีฟีนอลในชา

จากการศึกษาพบว่าขั้นตอนการผลิตที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงชนิด และปริมาณคาเทชินในกระบวนการผลิตชาเขียว คือ ขั้นตอนการผึ่ง (Withering) และการอบแห้ง (Drying) ส่วนขั้นตอนการผลิตที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงชนิด และปริมาณคาเทชินในกระบวนการผลิตชาอู่หลง คือ ขั้นตอนการคั่ว (Pan firing) และการนวด (Rolling)

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงชนิด และปริมาณโพลีฟีนอลในระหว่างกระบวนการผลิตชาเขียว (ชาไม่หมัก) และชาอู่หลง (ชาทิ้งหมัก) ของจังหวัดเชียงราย ประเทศไทย ทำการเก็บใบชาสดพันธุ์อัสสัม และชาจีน 2 สายพันธุ์ คือ อู่หลงเบอร์ 17 และอู่หลงเบอร์ 12 นำมาเข้ากระบวนการผลิต ทำการเก็บตัวอย่างชาในระหว่างกระบวนการผลิต จากนั้นนำมาวิเคราะห์ปริมาณความชื้น และปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด ประเมินความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) วิเคราะห์ปริมาณคาเฟอีน และคาเทชินแต่ละชนิด ได้แก่ (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG), (-)-epigallocatechin (EGC), (-)-epicatechin-3-gallate (ECG), (-)-epicatechin (EC), (-)-gallocatechin (GC), (+)-catechin (C), (-)-gallocatechin gallate (GCG) และ (-)-catechin gallate (CG) โดยโครมาโทกราฟีเหลวสมรรถนะสูง จากการศึกษา พบว่าขั้นตอนการอบแห้ง และการคั่วชาทำให้ปริมาณความชื้นลดลงอย่างเห็นได้ชัดในกระบวนการผลิตชาเขียวและชาอู่หลงตามลำดับ ในกระบวนการผลิตชาเขียวและชาอู่หลงพบว่าปริมาณคาเฟอีน ความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ DPPH และปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงคาเทชินในระหว่างกระบวนการผลิตพบว่า ในกระบวนการผลิตชาเขียว ขั้นตอนการคั่วชาทำให้ปริมาณ EGC และ EGCG เพิ่มขึ้น ปริมาณคาเทชินแต่ละชนิดไม่เปลี่ยนแปลงอย่างเห็นได้ชัดในขั้นตอนการคั่วชา ในขั้นตอนอบแห้งพบว่าปริมาณ EGCG ลดลง และปริมาณ GCG ซึ่งเป็นคู่อิพิเมอร์เพิ่มสูงขึ้น ส่วนในกระบวนการผลิตชาอู่หลงพบว่าขั้นตอนการหมักชาไม่ทำให้คาเทชินเปลี่ยนแปลงอย่างเห็นได้ชัด ขั้นตอนการคั่วชาทำให้คาเทชินชนิด EGC และ EGCG เพิ่มสูงขึ้น อย่างไรก็ตามพบว่าปริมาณคาเทชินทั้งสองลดลง ในขณะที่คู่อิพิเมอร์ (GC และ GCG) เพิ่มสูงขึ้นในขั้นตอนการนวดชา ขั้นตอนการทำแห้งไม่ทำให้คาเทชินเปลี่ยนแปลงอย่างเห็นได้ชัด การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าในกระบวนการผลิตชาเขียว ขั้นตอนการคั่วชา และอบแห้งชาส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงชนิดและปริมาณคาเทชิน ส่วนในกระบวนการผลิตชาอู่หลง ขั้นตอนการคั่วชา และนวดชา เป็นขั้นตอนสำคัญต่อการเปลี่ยนแปลงคาเทชิน

คำสำคัญ : สารต้านอนุมูลอิสระ, ชาเขียว, ชาอู่หลง, โพลีฟีนอล, กระบวนการ

ABSTRACT

The present study focused on changes in kind and quantity of tea polyphenols during green (non-fermented) and oolong (semi-fermented) tea processing in Chiang Rai, Thailand. The fresh tea leaves of Assam tea (*Camellia sinensis* var. *assamica*) and two Chinese teas (*Camellia sinensis* var. *sinensis*) named oolong no. 17 and oolong no. 12 were harvested. Tea samples in green and oolong tea processing were collected and determined for moisture and total polyphenol content. The antioxidant activity was evaluated using a 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay. The content of caffeine and individual catechins namely: (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG), (-)-epigallocatechin (EGC), (-)-epicatechin-3-gallate (ECG), (-)-epicatechin (EC), (-)-gallocatechin (GC), (+)-catechin (C), (-)-gallocatechin gallate (GCG) and (-)-catechin gallate (CG) were determined by HPLC. During manufacture, moisture content obviously decreased in the drying step for green tea and pan firing step for oolong tea. A small fluctuation was observed for caffeine content, DPPH-radical scavenging activity and total polyphenol content. In green tea processing, withering caused the increase in EGC and EGCG. The individual catechin content remained constant in pan firing step. The EGCG content decreased while there was an increase in its epimer (GCG) in the drying step. In oolong tea processing, the fermentation step did not significantly cause the change in catechin content. Pan firing caused the higher content in EGC and EGCG. However, both catechins showed substantial losses and their epimers (GC and GCG) showed significant increase in the rolling step. The drying step did not affect the content of individual catechins. The present results reveal that withering and drying steps highly affected the changes of type and quantity of catechins for green tea while pan firing and rolling steps were found to be the important steps for oolong tea.

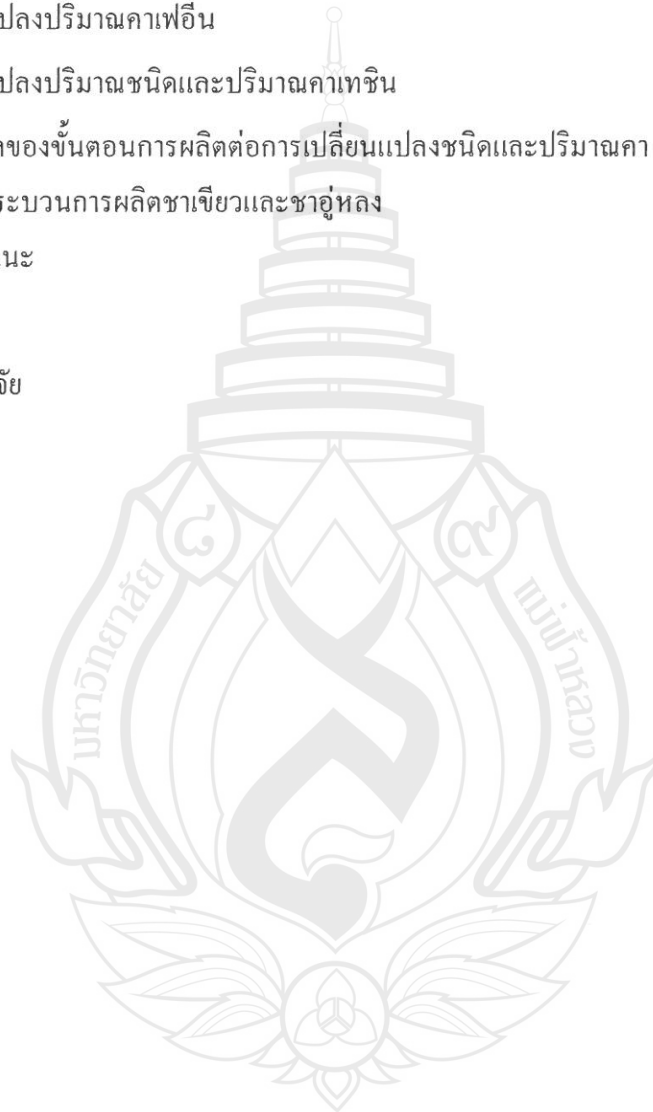
Keywords : Antioxidant, Green tea, Oolong tea, Polyphenols, Processing

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	II
บทสรุปผู้บริการ	III
บทคัดย่อ	IV
Abstract	V
สารบัญ	VI
สารบัญภาพ	IX
สารบัญตาราง	XI
คำย่อและสัญลักษณ์	XII
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญ และที่มาของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ขอบเขตการศึกษา	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
1.5 ระยะเวลาดำเนินการ	2
1.6 คณะนักวิจัย	3
บทที่ 2 แนวคิด ทฤษฎี และวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 พันธุ์ชา	4
2.2 ประเภทของชาทางการค้า	5
2.3 ขั้นตอนการผลิตชา	6
2.4 องค์ประกอบทางเคมีในใบชาสด	8
2.5 โครงสร้างของคาเทชิน	12
2.6 ฤทธิ์การต้านออกซิเดชันของคาเทชิน	15
2.7 การเปลี่ยนแปลงคาเทชิน	15

	หน้า
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	17
3.1 สารเคมี วัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือ	17
3.1.1 สารเคมี	17
3.1.2 วัสดุและอุปกรณ์	18
3.1.3 เครื่องมือ	19
3.2 วิธีการทดลอง	19
3.2.1 การสำรวจโรงงานชา	19
3.2.2 การเก็บตัวอย่างชา	19
3.2.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี	20
3.2.3.1 การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น	20
3.2.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด	20
3.2.3.3 การวิเคราะห์ชนิด และปริมาณของคาเทชิน	20
3.2.3.4 การวิเคราะห์คาเฟอีน	21
3.2.3.5 การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ	21
บทที่ 4 ผลการวิจัย	22
4.1 การสำรวจโรงงานผลิตชา	22
4.2 การเก็บตัวอย่างชา	25
4.2.1 ชาเขียว	25
4.2.2 ชาอู่หลง	25
4.3 การเปลี่ยนแปลงในระหว่างกระบวนการผลิตชาเขียว	26
4.3.1 การเปลี่ยนแปลงปริมาณความชื้น	26
4.3.2 การเปลี่ยนแปลงปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด	27
4.3.3 การเปลี่ยนแปลงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ	28
4.3.4 การเปลี่ยนแปลงปริมาณคาเฟอีน	29
4.3.5 การเปลี่ยนแปลงปริมาณชนิดและปริมาณคาเทชิน	30

	หน้า
4.4 การเปลี่ยนแปลงในระหว่างกระบวนการผลิตชาอู่หลง	34
4.3.1 การเปลี่ยนแปลงปริมาณความชื้น	34
4.3.2 การเปลี่ยนแปลงปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด	35
4.3.3 การเปลี่ยนแปลงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ	36
4.3.4 การเปลี่ยนแปลงปริมาณคาเฟอีน	37
4.3.5 การเปลี่ยนแปลงปริมาณชนิดและปริมาณคาเทชิน	38
4.5 การเปรียบเทียบผลของขั้นตอนการผลิตต่อการเปลี่ยนแปลงชนิดและปริมาณคาเทชินในระหว่างกระบวนการผลิตชาเขียวและชาอู่หลง	42
บทที่ 5 สรุปผลและข้อเสนอแนะ	45
5.1 สรุปผลการวิจัย	45
5.2 ข้อเสนอแนะการวิจัย	45
บรรณานุกรม	47



สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า	
2-1	ลักษณะยอดใบชาที่เก็บ	6
2-2	องค์ประกอบทางเคมีของใบชาสด	8
2-3	โครงสร้างพื้นฐานของฟลาโวนอยด์	10
2-4	โครงสร้างของคาเทชินที่พบในชา	11
2-5	การเปลี่ยนแปลงของสารในระหว่างกระบวนการหมักชา	12
2-6	โครงสร้างของคาเทชิน	14
2-7	การเกิด epimerization ระหว่างคู่ของคาเทชิน	16
4-1	กระบวนการผลิตชาเขียวและชาอู่หลงของโรงงาน	23
4-2	กระบวนการผลิตชาเขียวและชาอู่หลง	24
4-3	การเปลี่ยนแปลงปริมาณความชื้นของใบชาในขั้นตอนการผลิตชาเขียว	26
4-4	การเปลี่ยนแปลงปริมาณโพลีฟีนอลในขั้นตอนการผลิตชาเขียว	27
4-5	การเปลี่ยนแปลงความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ DPPH ของใบชาในขั้นตอนการผลิตชาเขียว	28
4-6	ปริมาณคาเฟอีนในใบชาในขั้นตอนการผลิตชาเขียว	29
4-7	ปริมาณคาเทชินแต่ละชนิดในใบชาในกระบวนการผลิตชาเขียวที่ผลิตจากชาพันธุ์อัสสัม(a) การเปลี่ยนแปลงคาเทชินแต่ละชนิด (b) อัตราส่วนของคาเทชินแต่ละชนิด	30
4-8	ปริมาณคาเทชินแต่ละชนิดในใบชาในขั้นตอนการผลิตชาเขียวที่ผลิตจากชาพันธุ์อู่หลงเบอร์ 12 (a) การเปลี่ยนแปลงคาเทชินแต่ละชนิด (b) อัตราส่วนของคาเทชินแต่ละชนิด	32
4-9	การเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงคาเทชินเมื่อเทียบกับคาเทชินในใบชาสดเริ่มต้น(a) ชาพันธุ์อัสสัม (b) ชาพันธุ์อู่หลงเบอร์ 12	33
4-10	การเปลี่ยนแปลงปริมาณความชื้นของใบชาในขั้นตอนการผลิตชาอู่หลง	34
4-11	การเปลี่ยนแปลงปริมาณโพลีฟีนอลในขั้นตอนการผลิตชาอู่หลง	35
4-12	การเปลี่ยนแปลงความสามารถในการจับอนุมูลอิสระDPPH ของใบชาในขั้นตอนการผลิตชาอู่หลง	36
4-13	ปริมาณคาเฟอีนในใบชาในขั้นตอนการผลิตชาอู่หลง	37

ภาพที่		หน้า
4-14	ปริมาณคาเทชินแต่ละชนิดในกระบวนการผลิตชาอู่หลงที่ผลิตจากชาพันธุ์อู่หลงเบอร์ 17 (a) การเปลี่ยนแปลงคาเทชินแต่ละชนิด (b) อัตราส่วนของคาเทชินแต่ละชนิด	38
4-15	ปริมาณคาเทชินแต่ละชนิดในกระบวนการผลิตชาอู่หลงที่ผลิตจากชาพันธุ์อู่หลงเบอร์ 12 (a) การเปลี่ยนแปลงคาเทชิน (b) อัตราส่วนของคาเทชินแต่ละชนิด	40
4-16	การเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงคาเทชินเมื่อเทียบกับคาเทชินในใบชาสดเริ่มต้น (a) ชาพันธุ์อู่หลงเบอร์ 17 (b) ชาพันธุ์อู่หลงเบอร์ 12	41
4-17	การเปรียบเทียบปริมาณคาเทชินแต่ละชนิดในขั้นตอนการผลิตชาเขียวและชาอู่หลง การผลิตชาเขียวจากชาพันธุ์อัสสัม (a) และอู่หลงเบอร์ 12 (b) การผลิตชาอู่หลงจากชาพันธุ์อู่หลงเบอร์ 17 (c) และอู่หลงเบอร์ 12 (d)	44



สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2-1	องค์ประกอบทางเคมีของยอดใบชา (%น้ำหนักแห้ง)	9



คำย่อและสัญลักษณ์

Abbreviation	Word
%w/w	Percent weight by weight
µg	Microgram
C	(+)-Catechin
CF	Caffeine
CG	(-)-Catechingallate
DAD	Diode array detector
db	Dry basis
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
EC	(-)-Epicatechin
ECG	(-)-Epicatechin-3-gallate
EGC	(-)-Epigallocatechin
EGCG	(-)-Epigallocatechin-3-gallate
G	Gallic acid
GC	(-)-Gallocatechin
GCG	(-)-Gallocatechin gallate
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ml	Milliliter
TFA	Trifluoroacetic acid
Trolox	(±)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญ และที่มาของปัญหา

ชา (*Camellia sinensis* L.) เป็นพืชเศรษฐกิจชนิดหนึ่งที่ปลูกกันมากบนพื้นที่สูงในจังหวัดเชียงราย ชาที่ปลูกส่วนใหญ่เป็นชาพันธุ์อัสสัม (*Camellia sinensis* var. *assamica*) และชาจีน (*Camellia sinensis* var. *sinensis*) ใบชาที่เกษตรกรผลิตได้ส่วนใหญ่จะนำไปแปรรูปเป็นชาใบได้แก่ ชาเขียวหรือชาไม่หมัก (green tea, non-fermented tea), ชาอู่หลงหรือชากึ่งหมัก (Oolong tea, semi-fermented tea) และ ชาดำหรือชาหมัก (black tea, fully-fermented tea) ชาที่คนไทยนิยมบริโภคได้แก่ชาเขียวและชาอู่หลง สารต้านอนุมูลอิสระที่อยู่ในชาเขียว และชาอู่หลงโดยมากเป็นอนุพันธ์ของกรดแกลลิก และคาเทชินรวมเรียกว่าโพลีฟีนอล (polyphenols) ปัจจัยที่ส่งผลต่อชนิด และปริมาณของโพลีฟีนอลในชาเขียว และชาอู่หลงได้แก่ พันธุ์ชา ความอุดมสมบูรณ์ของดิน น้ำ สภาพภูมิอากาศ และสภาพภูมิประเทศ ปัจจัยที่สำคัญอีกปัจจัยหนึ่งคือ กระบวนการผลิต

ในระหว่างกระบวนการผลิตชาเขียว และชาอู่หลงจะเกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมี และชีวเคมีต่าง ๆ ของโพลีฟีนอล เช่น ปฏิกิริยา enzymatic browning, oxidation, polymerization, thermal degradation และ epimerization เป็นต้น ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวทำให้เกิดสารประกอบโพลีฟีนอลที่แตกต่างกันไปในแต่ละขั้นตอนของกระบวนการผลิต การเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวส่งผลต่อลักษณะทางคุณภาพ และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของโพลีฟีนอลในชา ดังนั้น การศึกษาการเปลี่ยนแปลงชนิด และปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระ ในกระบวนการผลิตจะทำให้ทราบว่าขั้นตอนใดในกระบวนการผลิตที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงชนิด และปริมาณโพลีฟีนอลมากหรือน้อยเพียงใด และอย่างไร นอกจากนี้ทำให้ทราบว่าขั้นตอนใดส่งผลต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของโพลีฟีนอล ซึ่งจะช่วยให้โรงงานสามารถปรับปรุงกระบวนการผลิตให้ได้ชาที่มีคุณภาพมากยิ่งขึ้นได้

1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงชนิด และปริมาณของ โพลีฟีนอลในกระบวนการผลิตชาเขียว และชาอู่หลง ที่ผลิตจากชาพันธุ์อัสสัมและชาจีน
2. เพื่อศึกษาผลของขั้นตอนการผลิตต่อการเปลี่ยนแปลงชนิด และปริมาณของ โพลีฟีนอลในชาเขียวและชาอู่หลง ที่ผลิตจากชาพันธุ์อัสสัมและชาจีน
3. เพื่อศึกษาผลของขั้นตอนการผลิตต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของชาเขียวและชาอู่หลง ที่ผลิตจากชาพันธุ์อัสสัมและชาจีน

1.3 ขอบเขตการศึกษา

1. ศึกษาชาพันธุ์อัสสัมและชาจีน
2. ศึกษากระบวนการผลิตชาเขียว และชาอู่หลงของ โรงงานที่ได้เลือกศึกษา
3. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงชนิด และปริมาณ โพลีฟีนอลในกระบวนการผลิตชาเขียวและชาอู่หลง
4. ศึกษาสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของชาในระหว่างกระบวนการผลิตชาเขียวและชาอู่หลง

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ทราบผลการเปลี่ยนแปลงชนิดและปริมาณ โพลีฟีนอลในชาเขียวและชาอู่หลงในกระบวนการผลิตของโรงงานที่ได้เลือกศึกษา
2. ได้ทราบผลการเปลี่ยนแปลงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในกระบวนการผลิตชาเขียวและชาอู่หลงของโรงงานที่ได้เลือกศึกษา
3. ได้ทราบผลของขั้นตอนการผลิตชาเขียวและชาอู่หลงต่อชนิด ปริมาณ และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของโพลีฟีนอลของโรงงานที่ได้เลือกศึกษา

1.5 ระยะเวลาดำเนินการ

- 1 เมษายน 2550 – 30 พฤษภาคม 2552

1.6 คณะนักวิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

อ. ดร. ชีรพงษ์ เทพกรณ์

สังกัด สำนักวิชาอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

333 หมู่ 1 ต.ท่าสูด อ.เมือง จ.เชียงราย 57100

โทรศัพท์ 053-916750 โทรสาร 053-916739

ที่ปรึกษาโครงการวิจัย

รศ. ดร. อรพิน ภูมิภมร

คณบดีสำนักวิชาอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

333 หมู่ 1 ต.ท่าสูด อ.เมือง จ.เชียงราย 57100

334 โทรศัพท์ 053-916740 โทรสาร 053-916739



บทที่ 2

แนวคิด ทฤษฎี และวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

ชา เป็นผลิตภัณฑ์ที่นิยมบริโภคกันทั่วโลกซึ่งผลิตจากยอดอ่อนของต้นชา ชาแบ่งได้เป็น 3 ชนิดใหญ่ ๆ ตามกระบวนการผลิตได้แก่ ชาเขียว ชาอู่หลง และชาดำ ปัจจุบันผู้บริโภคให้ความสนใจและนิยมบริโภคชาเพิ่มขึ้น เนื่องจากมีรายงานหลายชิ้นที่แสดงถึงคุณประโยชน์ของการดื่มชา ในชามีสารสำคัญที่มีสมบัติที่ดีต่อสุขภาพได้แก่ สมบัติการต้านออกซิเดชัน ต้านอนุมูลอิสระ ป้องกันโรคมะเร็ง ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง ลดความเสี่ยงต่อภาวะเป็นโรคหัวใจ ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

2.1 พันธุ์ชา

พันธุ์ชาที่ปลูกสามารถแบ่งได้เป็น 2 พันธุ์ใหญ่ ๆ ได้แก่

1. กลุ่มชาพันธุ์อัสสัม (Assam Tea) กลุ่มนี้มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Camellia sinensis* var. *assamica* ลักษณะเป็นลำต้นเดี่ยว ต้นใหญ่ สูงประมาณ 6-18 เมตร ใบเดี่ยว ขนาดใหญ่ ใบสีเขียวอ่อน แผ่นใบโปนเป็นคลื่น ขอบใบหยักแบบฟันเลื่อย ปลายใบแหลม ใบแก่ การเรียงตัวของใบเป็นแบบสลับและเกลียว ต้นเจริญเติบโตเร็ว ทนแล้ง ปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี
2. กลุ่มชาพันธุ์จีน (Chinese Tea) กลุ่มนี้มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Camellia sinensis* var. *sinensis* ลักษณะลำต้นเป็นพุ่มเตี้ย สูงประมาณ 2-6 เมตร ใบมีสีเขียวเข้ม ขนาดเล็ก ยาวแคบ ตั้งตรง ขอบใบหยักแบบฟันเลื่อย ผิวใบเรียบ ใบค่อนข้างตั้งกว่าชาอัสสัม การเรียงตัวของใบเป็นแบบสลับและเกลียว ต้นเจริญเติบโตช้ากว่าชาอัสสัม ทนทานต่ออุณหภูมิต่ำและสภาพแวดล้อมที่แปรปรวนได้ดี

2.2 ประเภทของชาทางการค้า

ชาที่วางขายกันตามท้องตลาดทั่วไปผลิตมาจากใบของต้นชา *Camellia sinensis* (L.) เมื่อแบ่งตามกระบวนการผลิตจะแบ่งได้ 3 ประเภทใหญ่ ๆ คือ

1. ชาเขียว (Green tea) เป็นชาที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก (Non-fermented tea) กรรมวิธีการผลิตเริ่มจากการหยุดการทำงานของเอนไซม์ Polyphenol oxidase ที่อยู่ในใบชาสดโดยการอบด้วยไอน้ำ (steaming) หรือการคั่วบนกระทะร้อน (pan firing) เพื่อให้เอนไซม์ polyphenol oxidase ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยา oxidation และ polymerization ของ polyphenols ที่อยู่ในใบชาได้ เสร็จแล้วนำไปนวด (rolling) เพื่อให้เซลล์แตกและนวดเพื่อให้ใบชาม้วนตัว จากนั้นนำไปอบแห้ง สีของน้ำชาประเภทนี้จะมีสีเขียวถึงเขียวอมเหลือง
2. ชาอู่หลง (Oolong tea) เป็นชาที่ผ่านกระบวนการหมักเพียงบางส่วน (Semi-fermented tea) ก่อนหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ด้วยความร้อน กรรมวิธีการผลิตจะมีการผึ่งแดด (withering) ประมาณ 20-40 นาที ภายหลังผึ่งแดดใบชาจะถูกผึ่งในร่มอีกครั้งพร้อมเขย่ากระตุ้นให้ชาต้นตัว การผึ่งนี้เป็นกระบวนการหมักซึ่งทำให้เอนไซม์ polyphenol oxidase เร่งปฏิกิริยา oxidation และ polymerization ของ polyphenols ทำให้เกิด dimers และสารประกอบเชิงซ้อนของ polyphenols สารประกอบที่เกิดขึ้นนี้ทำให้ชาอู่หลงมีกลิ่นและสีที่แตกต่างไปจากชาเขียว น้ำชาอู่หลงจะมีสีเหลืองอมเขียว และสีน้ำตาลอมเขียว
3. ชาดำ (Black tea) เป็นชาที่ผ่านกระบวนการหมักอย่างสมบูรณ์ (Completely-fermented tea) ใบชาจะถูกตีและผึ่งให้เอนไซม์ polyphenol oxidase เร่งปฏิกิริยาอย่างเต็มที่ ซึ่ง polyphenols จะถูก oxidized อย่างสมบูรณ์เกิดเป็นสารประกอบกลุ่ม Theaflavins และ Thearubigins ทำให้ชาดำมีสีน้ำตาลแดง

2.3 ขั้นตอนการผลิตชา

ชาแต่ละชนิดจะมีลักษณะ สี กลิ่น และรสชาติที่แตกต่างกันไป ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลัก ๆ 2 ปัจจัย ได้แก่ องค์ประกอบทางเคมีของใบชา และขบวนการผลิตชา โดยองค์ประกอบทางเคมีของใบชาที่แตกต่างกันเป็นผลมาจากสายพันธุ์ชา สภาพพื้นที่ปลูก สภาพภูมิอากาศ ความอุดมสมบูรณ์ของ ดิน น้ำ และการดูแลรักษา ซึ่งองค์ประกอบทางเคมีที่ต่างกันนี้จะส่งผลต่อปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการผลิต ทำให้ได้ชาที่มีกลิ่นและรสชาติที่แตกต่างกันไป ในกระบวนการผลิตชาแต่ละประเภทจะมีขั้นตอนการผลิตและรายละเอียดดังนี้

1. การเก็บใบชา (Tea plucking) เป็นขั้นตอนที่สำคัญเนื่องจากต้องอาศัยความละเอียดในการเก็บ การเก็บใบชาต้องใช้แรงงานคนในการเก็บจึงจะได้ยอดใบชาที่มีคุณภาพดี การเก็บจะต้องเลือกเก็บเฉพาะยอดชาที่ตูมและใบที่ต่ำจากยอดตูมลงมา 2 ใบ (เก็บ 1 ยอด 2 ใบ, ภาพที่ 2-1) เนื่องจาก polyphenols ซึ่งเป็นสารสำคัญในชาจะมีอยู่มากเฉพาะในยอดชาเท่านั้น การบรรจุชาควรใส่ภาชนะที่มีอากาศถ่ายเทได้สะดวก หลีกเลี่ยงภาชนะที่ทำให้ยอดชาเกิดการอัดแน่น เพราะจะทำให้ยอดชาเสียหาย และเป็นการทำให้ยอดชาเกิดการหมักเนื่องจากอุณหภูมิที่สูงขึ้นจากการหายใจของใบชา



ภาพที่ 2-1 ลักษณะยอดใบชาที่เก็บ

2. การผึ่งชา (Withering) เป็นขั้นตอนที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและเกิดปฏิกิริยาเคมีของสารต่าง ๆ ในใบชา การผึ่งชาจะทำให้ให้น้ำในใบชาระเหยไป ทำให้ใบชาเหี่ยวและจะมีการซึมผ่านของสารต่าง ๆ ภายในและภายนอกเซลล์ ในการผึ่งชาตัวเอง เอนไซม์ polyphenol oxidase จะเร่งปฏิกิริยา oxidation และ polymerization ทำให้สาร polyphenol เกิดปฏิกิริยาเคมีได้เป็นองค์ประกอบใหม่ที่ให้ชาที่มีสี กลิ่น และรสชาติที่แตกต่างกันไป

3. การนึ่งชา (Steaming) หรือการคั่วชา (Pan firing) เป็นขั้นตอนที่ทำให้ความร้อนกับใบชา เพื่อทำลายเอนไซม์ polyphenol oxidase ทำให้หยุดปฏิกิริยาการหมัก

4. การนวดชา (Rolling) เป็นขั้นตอนที่ใช้น้ำหนักกดทับลงใบชา เป็นการขยี้ใบชาเพื่อให้เซลล์แตก เมื่อเซลล์แตกจะทำให้สารประกอบต่าง ๆ ที่อยู่ในเซลล์ไหลออกมานอกเซลล์และเคลือบอยู่บนส่วนต่างๆของใบชา

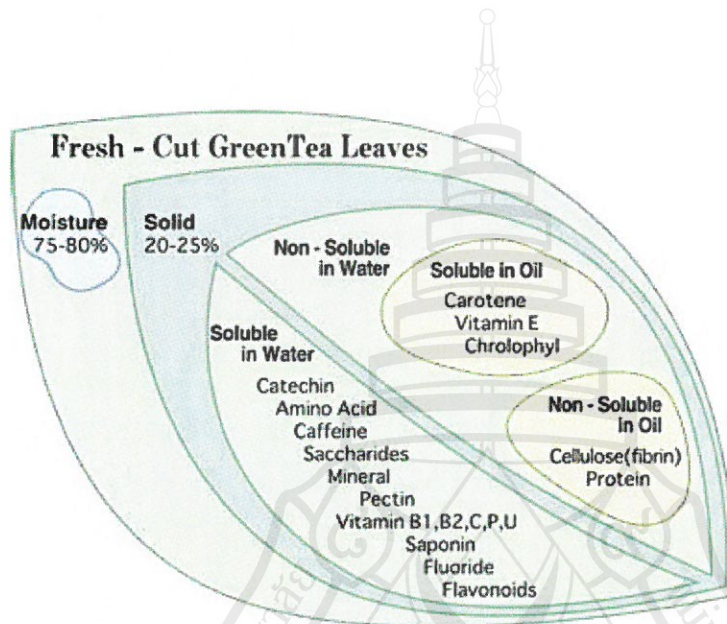
5. การหมักชา (Fermentation) เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องเริ่มตั้งแต่การผิงชา และนวดชา ก่อนที่จะถึงขั้นตอนการหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ polyphenol oxidase ด้วยความร้อน (steaming หรือ firing) ในกระบวนการนี้เอนไซม์ polyphenol oxidase จะเร่งปฏิกิริยา oxidation ทำให้ polyphenols เกิด oxidized และเกิดปฏิกิริยา polymerization ได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง polyphenols ที่มีโมเลกุลใหญ่ขึ้น ซึ่งทำให้ชาเกิดกลิ่น สี และรสชาติที่แตกต่างกันไปตามองค์ประกอบทางเคมีที่อยู่ในชาและตามกรรมวิธีการผลิต

6. การอบแห้ง (Drying) เป็นขั้นตอนการอบแห้งเพื่อลดความชื้นในใบชาให้เหลือประมาณ 5% เพื่อให้สามารถเก็บใบชาไว้ได้นาน

7. การคัดบรรจุ (Sorting and packing) หลังการอบแห้งจะเป็นการคัดเลือกเศษกิ่งก้านของใบชา และสิ่งเจือปนต่างๆออกจากใบชา เสร็จแล้วนำมาบรรจุใส่ถุงเพื่อจำหน่ายต่อไป

2.4 องค์ประกอบทางเคมีในใบชาสด

องค์ประกอบทางเคมีในยอดใบชาสดจะประกอบด้วยความชื้นประมาณ 75-80 % ส่วนที่เหลือเป็นของแข็งทั้งหมด องค์ประกอบทางเคมีในส่วนที่เป็นของแข็งทั้งหมดแสดงดังตาราง ซึ่งองค์ประกอบเหล่านี้จะส่งผลต่อคุณภาพของชา



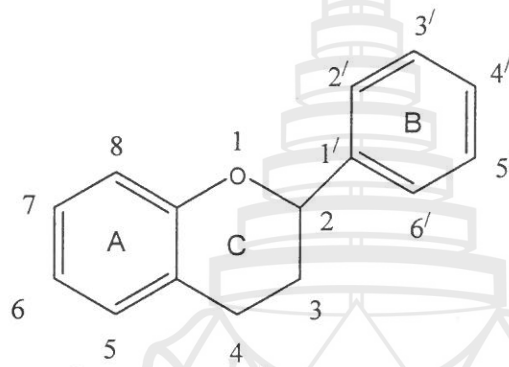
ภาพที่ 2-2 องค์ประกอบทางเคมีของใบชาสด

ตารางที่ 2-1 องค์ประกอบทางเคมีของยอดใบชา (%น้ำหนักแห้ง)

Components	Dry weight (%)
Flavanols	18-32
(-)-EGCG	9-14
(-)-EGC	4-7
(-)-ECG	2-4
(-)-EC	1-3
(+)-GC	1-2
(+)-C	0.5-1
Flavonal glucosides	3-4
Proanthocyanidins	2-3
Caffeine	3-4
Amino acids	2-4
Carbohydrates	3-5
Organic acids	0.5-2
Saponins	0.04-0.07
Pigments	0.5-0.8
Vitamins	0.6-1.0
Soluble minerals	2-4
Cellulose	6-8
Lignin	4-6
Polysaccharides	4-10
Lipids	2-4
Insoluble pigments	0.5
Insoluble minerals	1.5-3.0
Volatiles	0.01-0.02

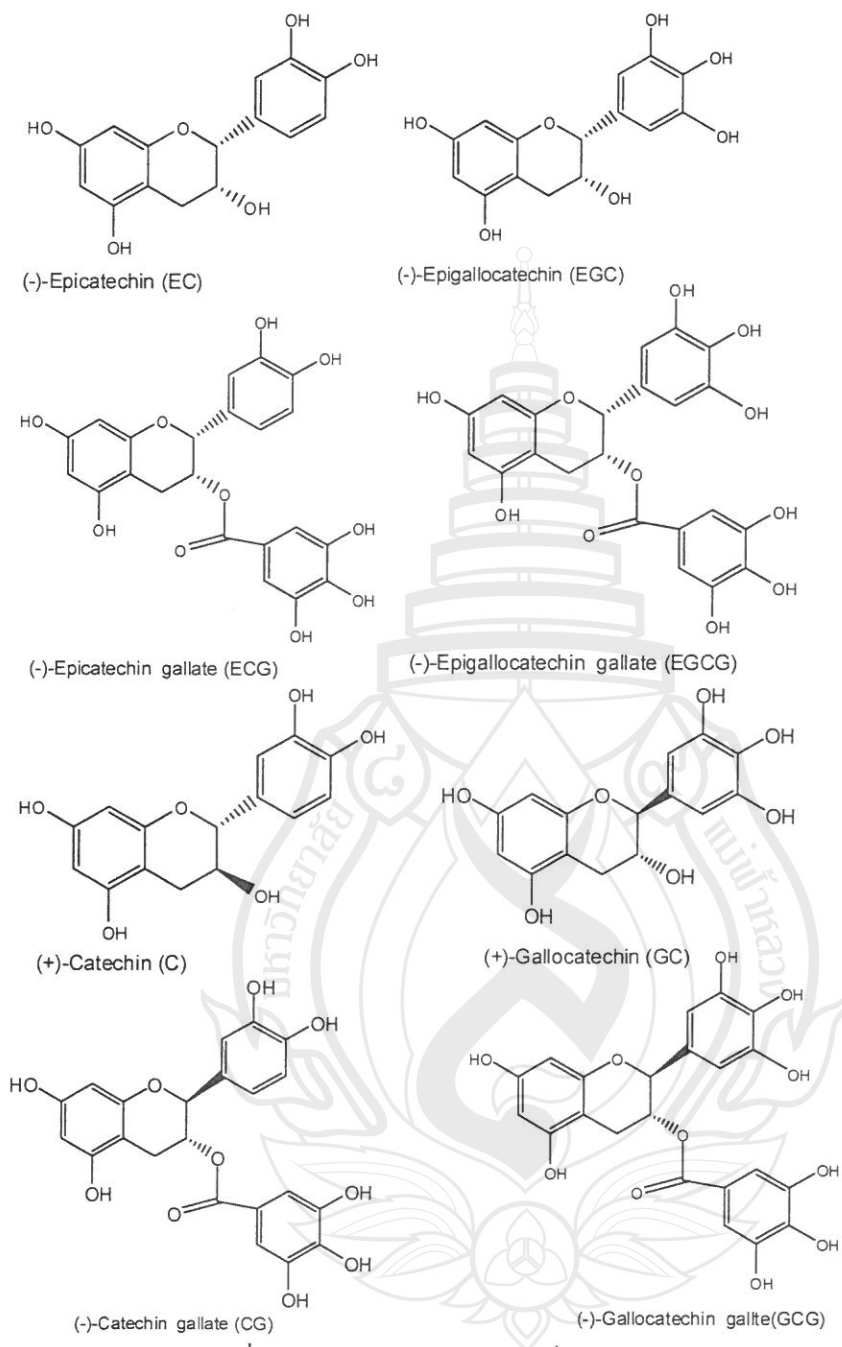
Polyphenols (โพลีฟีนอล)

ในยอดใบชาจะมีปริมาณโพลีฟีนอล (polyphenols) ทั้งหมดประมาณ 10-35% (dry weight) โดยสารประกอบโพลีฟีนอลนี้ส่วนใหญ่เป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) ฟลาโวนอยด์เป็น secondary metabolite ที่แบ่งได้ 6 กลุ่มคือ Flavones, flavanones, isoflavones, flavonols, flavanols และ anthocyanins โครงสร้างพื้นฐานของฟลาโวนอยด์ประกอบด้วยวงแหวน A, B และ C ดังรูป 2-3 กลุ่มของฟลาโวนอยด์ที่พบมากที่สุดในการชาคือ Flavanols ซึ่งเรียกว่า Catechins (คาเทชิน)

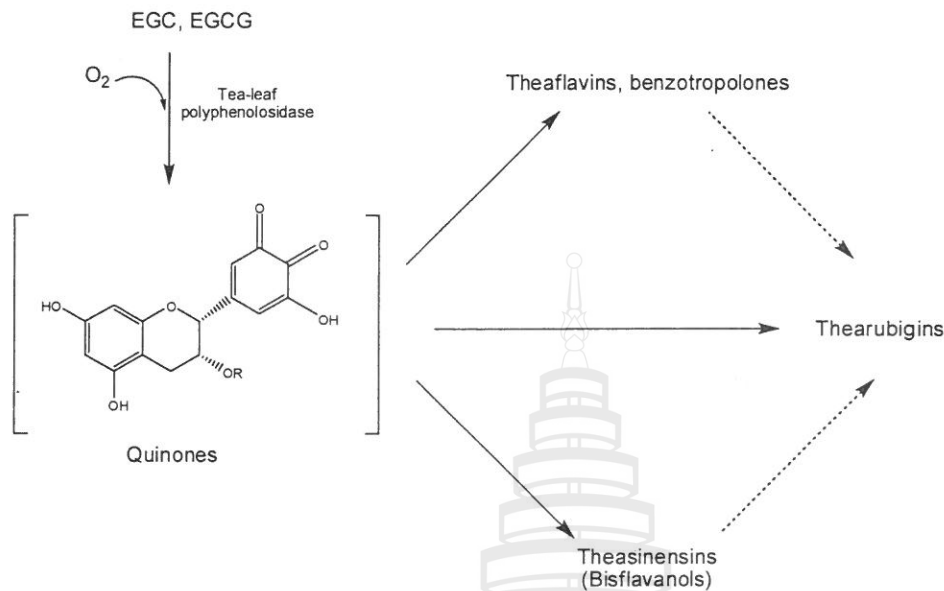


ภาพที่ 2-3 โครงสร้างพื้นฐานของฟลาโวนอยด์

คาเทชินซิน (Catechins) เป็นชื่อเรียก Flavanols ในชา ซึ่งมีประมาณ 60-70% ของโพลีฟีนอลทั้งหมด กลุ่มของ Catechins ที่พบมากในชา ได้แก่ (-)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG), (-)-Epigallocatechin (EGC), (-)-Epicatechin-3-gallate (ECG) และ (-)-Epicatechin (EC) โดย Catechins เหล่านี้มีอยู่ประมาณ 90% ของคาเทชินทั้งหมด กลุ่มของ Catechins ที่พบในปริมาณน้อยลงมาได้แก่ (-)-Gallocatechin (GC), (+)-Catechin (C), (-)-Gallocatechin gallate (GCG) และ (-)-Catechin gallate (CG) โครงสร้างของ catechins แสดงดังรูป 2-4 คาเทชินเป็นสารไม่มีสี ละลายน้ำได้ ให้รสขม และฝาด การผลิตชาอู่หลงและชาดำจะมีขั้นตอนการหมัก (Fermentation) การหมักเป็นขั้นตอนที่ปล่อยให้เอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดส เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันสารในกลุ่มคาเทชินทำให้เกิดสารประกอบใหม่ที่มีสี กลิ่น และรสชาติที่ต่างไป การออกซิเดชันทำให้เกิดควิโนน (quinone) ที่สามารถเกิดปฏิกิริยาทางเคมีต่อได้เป็นกลุ่มของ theaflavins, theasinensins และ thearubigins (ภาพที่ 2-5)



ภาพที่ 2-4 โครงสร้างของคาเทชินที่พบในชา



ภาพที่ 2-5 การเปลี่ยนแปลงของสารในระหว่างกระบวนการหมักชา

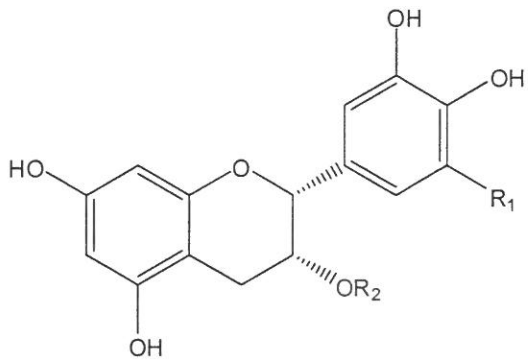
2.5 โครงสร้างของคาเทชิน

เมื่อจัดแบ่งโครงสร้างของคาเทชินตามเมื่อจัดแบ่งคาเทชินตาม stereochemical configuration จะสามารถแบ่งคาเทชินได้ 2 ลักษณะคือ nonepistruure และ epistruure โดยคาเทชินที่มีโครงสร้างแบบ nonepistruure จะมี stereochemical configuration ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 และ 3 ของวง C แบบ 2,3-trans (2S, 3R) เช่น C, CG, GC และ GCG ส่วนคาเทชินที่มีโครงสร้างแบบ epistruure จะมี stereochemical configuration แบบ 2,3-cis (2R, 3R) เช่น EC, ECG, EGC และ EGCG

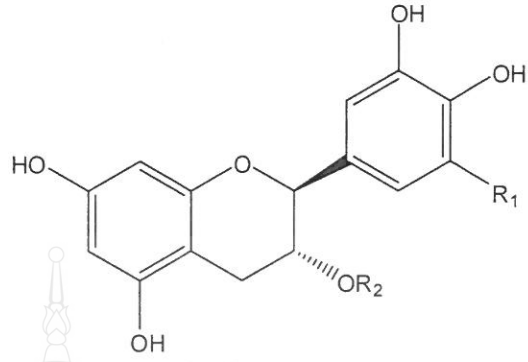
โดยปกติคาเทชินในชาส่วนใหญ่จะมีโครงสร้างเป็นแบบ epistruure เช่น EC, EGCG, ECG และ EGC เป็นต้น คู่ nonepistruure จะมีโครงสร้างแบบ 2S, 3R ซึ่งในธรรมชาติเป็นคาเทชินที่พบได้น้อย มีรายงานว่าความร้อนทำให้กลุ่มของ epi-form ลดลง และมีผลทำให้กลุ่มของ nonepi-form เพิ่มขึ้น เนื่องจากความร้อนทำให้เกิดการเปลี่ยนไอโซเมอร์ของสาร ปฏิบัติการเปลี่ยนแปลงไอโซเมอร์นี้เกิดที่ตำแหน่ง C-2 โดยไม่มีการเปลี่ยน optical rotation (Seto et al., 1997) เช่น (-)-EC จะเกิดการเปลี่ยนไอโซเมอร์เป็น (-)-C ซึ่งในการบ่งชี้คุณภาพของชาเขียวและชาอู่หลง ปริมาณของ EC มีความสำคัญต่อคุณค่าของชามากกว่า ดังนั้นกระบวนการผลิตจำเป็นต้องพิจารณาถึงความร้อนที่ใช้ในกระบวนการเพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลงไอโซเมอร์ของคาเทชิน

เมื่อจัดแบ่งกลุ่มของคาเทชินตามจำนวนหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) ที่เกาะที่ B ring จะแบ่งได้ 2 ประเภทคือ catechol-flavanols และ gallo-flavanols โดย ECG และ EC จัดอยู่ในกลุ่ม catechol-flavanols ซึ่งมีจำนวนหมู่ไฮดรอกซิล 2 หมู่ ส่วน EGCG และ EGC จัดอยู่ในกลุ่ม gallo-flavanols มีจำนวนหมู่ไฮดรอกซิล 3 หมู่ ในระหว่างกระบวนการผลิตชาเขียวและชาอู่หลง ปฏิกริยา oxidation จากเอนไซม์ polyphenol oxidase ทำให้ flavanols สูญเสีย hydrogen radicals และเกิดเป็น semiquinone radicals ซึ่งมีรายงานว่าคาเทชินในกลุ่ม gallo-flavanols จะเกิดปฏิกริยานี้ได้ง่ายกว่าคาเทชินในกลุ่ม catechol-flavanols (Yoshioka et al., 1991) เพราะ gallo-flavanols มีความสามารถในการเกิดปฏิกริยารีดอกซ์ได้น้อยกว่า catechol-flavanols (Opie et al., 1993) ทำให้ในระหว่างกระบวนการผลิตชาเขียวและชาอู่หลง คาเทชินชนิด EGCG และ EGC จะถูกออกซิไดซ์ได้ง่ายกว่า EC และ ECG มีงานวิจัยพบว่าลำดับการเกิดออกซิเดชันของคาเทชินในชาคือ EGCG>EGC>ECG>EC (Yoshioka et al., 1991; Miyazawa & Nakagawa 1998) ในขณะที่ลำดับความสามารถด้านอนุมูลอิสระคือ EC<ECG<EGC<EGCG (Matsuzaki and Hara 1985) ดังนั้นในการผลิตชาเขียวหรือชาอู่หลงให้มีสารต้านอนุมูลอิสระสูงจะต้องควบคุมกระบวนการผลิตให้เกิดปฏิกริยาออกซิเดชันน้อยที่สุด

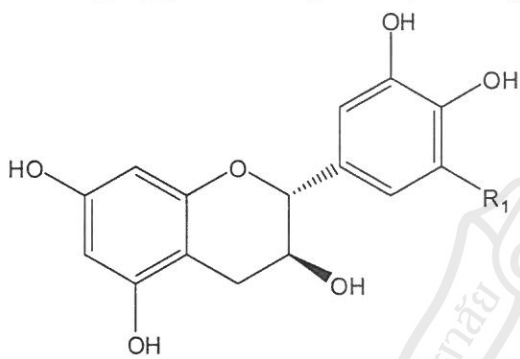




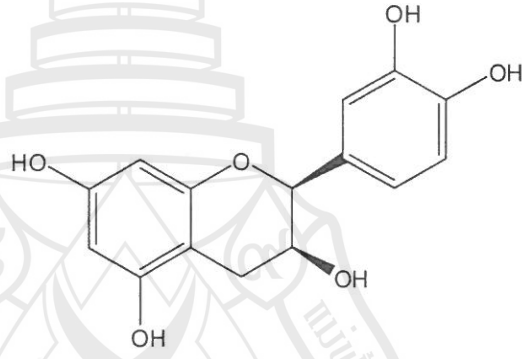
- (-)-Epi-form (2R, 3R)
- (-)-Epicatechin; $R_1 = R_2 = H$
- (-)-Epigallocatechin; $R_1 = OH, R_2 = H$
- (-)-Epicatechin gallate; $R_1 = H, R_2 = X$
- (-)-Epigallocatechin gallate; $R_1 = OH, R_2 = X$



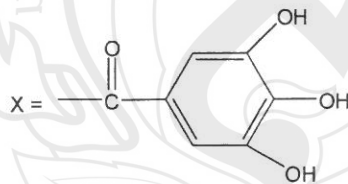
- (-)-form (2S, 3R)
- (-)-Catechin; $R_1 = R_2 = H$
- (-)-Gallocatechin; $R_1 = OH, R_2 = H$
- (-)-Catechin gallate; $R_1 = H, R_2 = X$
- (-)-Gallocatechin gallate; $R_1 = OH, R_2 = X$



- (+)-form (2R, 3S)
- (+)-Catechin; $R_1 = H$
- (+)-Gallocatechin; $R_1 = OH$



- (+)-form (2S, 3S)
- (+)-Epicatechin



ภาพที่ 2-6 โครงสร้างของคาเทชิน

2.6 ฤทธิ์การต้านออกซิเดชันของคาเทชิน

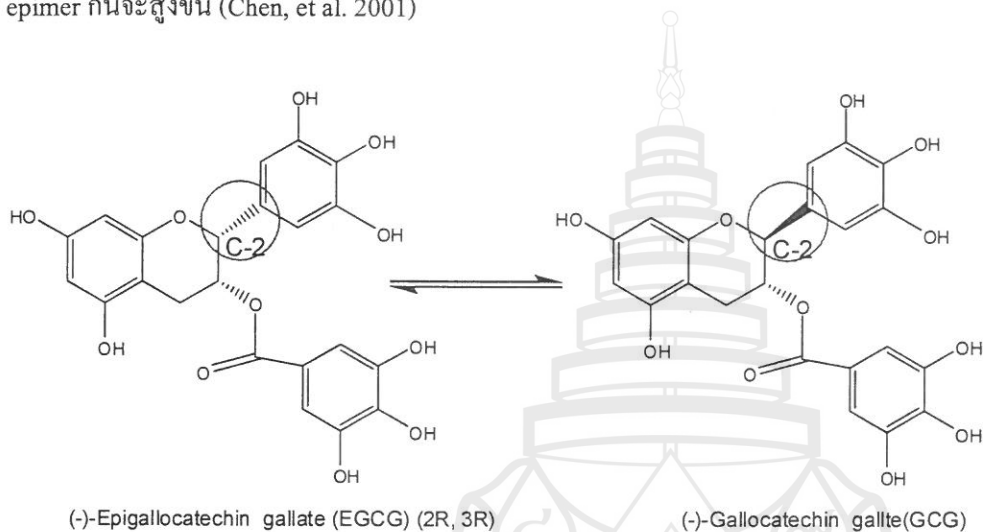
คาเทชินมีสมบัติในการต้านออกซิเดชัน โดยโมเลกุลมีความสามารถในการให้ไฮโดรเจนอะตอมและรับอนุมูลอิสระ (free radicals) จากโมเลกุลอื่น แม้ว่าในกระบวนการผลิตชาอู่หลงและชาดำ คาเทชินจะถูกออกซิไดซ์เป็นสารประกอบตัวอื่น แต่ความสามารถในการต้านออกซิเดชันใน LDL ยังคงเดิม (Leung et al., 2001) อย่างไรก็ตาม Hodgson พบว่าคาเทชินในชาเขียวมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันดีกว่าชาดำ 40% (Hodgson et al., 1999) Gardner รายงานว่าสารสกัดจากชาเขียวสามารถจับอนุมูลอิสระได้ดีกว่าชาดำ 21-24% (Gardner et al., 1998) มีรายงานการเปรียบเทียบความสามารถในการจับ DPPH ของชาชนิดต่าง ๆ พบว่า ชาเขียวมากกว่าชาดำ และชาอู่หลง ตามลำดับ (Gadow et al., 1997) ซึ่งสอดคล้องกับงานรายงานของ Yokozawa และคณะ (1998) เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการจับอนุมูลอิสระของคาเทชินชนิดต่าง ๆ พบว่า ECG>EGCG>EGC>EC>C ความสามารถในการจับเป็น radical propagation พบว่า EC, C, ECG และ EGCG มีความสามารถเท่ากัน ตามด้วย EGC และ gallic acid (Salah et al., 1995) อย่างไรก็ตาม Chen และ Ho (1995) รายงานว่าความสามารถในการจับอนุมูลอิสระของ EGCG>ECG>EGC>EC>C Nanjo และคณะ (1996) รายงานว่า EGC, ECG และ EGCG มี DPPH radical scavenging activity ที่ดีกว่า C และ EC เมื่อเปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระชนิดอื่น Nakao และคณะ (1998) พบว่า ECG, EC และ C มี peroxy radical scavenging activity มากกว่า วิตามินซี และเบตาแคโรทีน 10 เท่า (Nakao et al., 1998)

2.7 การเปลี่ยนแปลงคาเทชิน

องค์ประกอบทางเคมีในชาขึ้นกับปัจจัยต่าง ๆ หลายประการ ได้แก่ พันธุ์ชา ฤดูกาลเก็บเกี่ยว ความแก่อ่อนของใบ สภาพภูมิอากาศ ความอุดมสมบูรณ์ของดินและน้ำ การดูแลรักษา สภาพแวดล้อม เทคนิคการผลิต และกระบวนการแปรรูปชาต่าง ๆ (Chu & Juneja, 1997; Fernandez, Pablos, Martin, & Gonzales, 2002; Lin, Lin, Liang, Lin-Shiau, & Juan, 1998; Wang, Kim, & Lee, 2000) เมื่อกล่าวถึงกระบวนการผลิตและแปรรูปผลิตภัณฑ์ชา ปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อความคงตัวของคาเทชิน คือ ความเป็นกรด-ด่าง และ ความร้อน คาเทชินมีความคงตัวสูงเมื่ออยู่ในสารละลายพีเอชต่ำกว่า 4 ไม่คงตัวเมื่อพีเอชมากกว่า 6 และอุณหภูมิในการเก็บรักษาส่งผลต่อความคงตัวของคาเทชินอย่างมีนัยสำคัญ (Su, Leung, Huang & Chen, 2003; Komatsu, Suematsu, Hisanobu, Saigo, Matsuda & Hara, 1993; Chen, Zhu, Tsang, & Huang, 2001; Kumamoto, Sonda, & Nagayama, 2001)

การสลายตัวของคาเทชินนำไปสู่การเกิดปฏิกิริยา oxidation, dimerization และ polymerization (Burr & Timmermann, 2000; Hatano, Hori, Kusuda, Ohya, Ito & Yoshida, 2004) Komatsu และคณะ (1993)

พบว่าอุณหภูมิในกระบวนการผลิตเร่งให้เกิด degradation และ epimerization ของคาเทชิน การเกิด degradation และ epimerization ของชาเห็นได้ชัดเจนในขั้นตอนพลาสติกโรเซชัน จากรายงานพบว่า 50% ของคาเทชินเกิด epimerization ที่ตำแหน่ง C-2 ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงจาก epistucture เป็น nonepistucture ส่งผลให้คาเทชินชนิด epistucture ได้แก่ EC, EGC, EGCG, ECG ลดลง และคาเทชินที่เป็นคู่ epimer กันจะสูงขึ้น (Chen, et al. 2001)



ภาพที่ 2-7 การเกิด epimerization ระหว่างคู่ของคาเทชิน

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.2 สารเคมี วัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือ

3.1.1 สารเคมี

Name	Grade	Formula weight	Company
(-)-Epicatechin (EC)	AR	290.30	Sigma
(+)-Catechin (C)	TLC	290.30	Sigma
(-)-Epicatechin-3-gallate (ECG)	HPLC	442.40	Sigma
(-)-Catechin-3-gallate (CG)	HPLC	442.40	Sigma
(-)-Epigallocatechin (EGC)	HPLC	306.30	Sigma
(-)-Galocatechin (EGC)	HPLC	306.30	Sigma
(-)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG)	HPLC	458.40	Sigma
(-)-Galocatechin-3-gallate (GCG)	HPLC	458.40	Sigma
(±)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (Trolox)	HPLC	250.32	Sigma
2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)	HPLC	394.0	Sigma
Acetonitrile	HPLC	41.05	J.T. Baker
Caffeine (CF)	AR	194.20	Sigma
Gallic acid (G)	AR	170.10	Sigma
Methanol	HPLC	32.04	J.T. Baker
Trifluoroacetic acid	HPLC	114.02	Merck
Hydrochloric acid	AR	36.46	Merck
Ethyl acetate	HPLC	88.11	Fluka
Sulfuric acid	AR	98.08	Merck

3.1.2 วัสดุและอุปกรณ์

Breaker	ขนาด	10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 ml
Volumetric flask	ขนาด	10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 ml
Micropipette	ขนาด	10, 200, 1000, 5000 μ l
Cylinder	ขนาด	10, 25, 50, 100, 500 ml
Filter paper	Whatman No. 1	
Nylon membrane filter	0.45 μ m, 47 mm	
Syringe filter	0.45 μ m, 13 mm	
Screw cap vial	ขนาด 2 ml, Cap และ Septa	
Glass syringe	ขนาด 10 ml	
กรวยกรอง		
Weighing boat		
ชุดกรอง Mobile phase		
HPLC Guard column		
HPLC Column Platinum EPS C18, 100A, 3 μ m, 53mm x 7 mm		
Magnetic bar		
นาฬิกาจับเวลา		

3.1.2 วัสดุและอุปกรณ์

Breaker	ขนาด	10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 ml
Volumetric flask	ขนาด	10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 ml
Micropipette	ขนาด	10, 200, 1000, 5000 μ l
Cylinder	ขนาด	10, 25, 50, 100, 500 ml
Filter paper	Whatman No. 1	
Nylon membrane filter	0.45 μ m, 47 mm	
Syringe filter	0.45 μ m, 13 mm	
Screw cap vial	ขนาด 2 ml, Cap และ Septa	
Glass syringe	ขนาด 10 ml	
กรวยกรอง		
Weighing boat		
ชุดกรอง Mobile phase		
HPLC Guard column		
HPLC Column Platinum EPS C18, 100A, 3 μ m, 53mm x 7 mm		
Magnetic bar		
นาฬิกาจับเวลา		

3.1.3 เครื่องมือ

Name	Model	Company
pH meter	Seven easy	Metler Toledo
Electronic balance (readability 0.01 g)	PB-3002-S	Metler Toledo
Electronic balance (readability 0.0001 g)	AB204-S	Metler Toledo
HPLC-DAD	1100	Agilent
Stirrer and heater		Schott
Ultrasonic bath	8510	Branson
Hot air Oven		Memmert
Auto desiccators	Auto C-3	Sanplatec
Blender		Ronic

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การสำรวจโรงงานชา

ทำการสำรวจโรงงานชาที่เข้าร่วมการวิจัย คือ โรงงานของ ห้างหุ้นส่วนจำกัด สุวิรุฬห์ ชาไทย ตั้งอยู่ที่ 126 หมู่ 5 ต. ป่าก่อคำ อ. แม่ลาว จ. เชียงราย สำรวจชนิดของชาที่ทำการผลิต สายพันธุ์ชา และกระบวนการผลิตของโรงงาน

3.3.2 การเก็บตัวอย่างชา

สุ่มเก็บตัวอย่างชาในขั้นตอนการผลิตแต่ละขั้นตอน โดยแบ่งตามสายพันธุ์ชา และประเภทของชาที่ผลิต ในแต่ละขั้นตอนเก็บตัวอย่างชาประมาณ 100 กรัม ใส่ในถุงพลาสติก ปิดสนิทให้แน่น นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อรอทำการวิเคราะห์ห้องปฏิบัติการทางเคมี

3.3.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

3.3.3.1 การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น

นำตัวอย่างใบชาจากการสำรวจมาวิเคราะห์ปริมาณความชื้นโดยวิธีอบในตู้อบความร้อนตามวิธี (ISO 1573:1980)

3.3.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด

สกัดโพลีฟีนอลจากชาโดยชั่งตัวอย่างใบชาประมาณ 10 กรัม ใส่ในเครื่องปั่นความเร็วสูง สกัดด้วยเมทานอล 250 มิลลิลิตร 4 นาที นำไปกรองผ่านกระดาษกรอง ทำการเจือจางและวิเคราะห์หาปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดตามวิธี Colorimetric methods using Folin-Ciocalteu reagent (ISO 14502-1:2005) ผสมสารละลายตัวอย่าง 1.0 มล. กับ 5.0 มล. ของ Folin-Ciocalteu reagent (10%v/v) เติม 4.0 มล. ของ 7.5%w/v sodium carbonate ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 60 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 nm เทียบกับสารมาตรฐานกรดแกลลิกความเข้มข้น 0-100 µg/ml รายงานผลในรูปกรัมของ Gallic Acid Equivalent (GAE) ต่อ 100 กรัมตัวอย่างแห้ง

3.3.3.3 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของคาเทชิน

สกัดคาเทชินจากชาโดยชั่งตัวอย่างใบชาประมาณ 10 กรัม ใส่ในเครื่องปั่นความเร็วสูง สกัดด้วยเมทานอล 250 มิลลิลิตร 4 นาที นำไปกรองผ่านกระดาษกรอง เจือจางสารละลายชาสกัด นำไปกรองผ่าน PTFE Syringe filter นำไปฉีด (10 µl) เข้าเครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC) ตามวิธี ISO 14502-2:2005 ทำการวิเคราะห์ด้วยคอลัมน์ Platinum EPS C18 53x7 mm อุณหภูมิ 30°C อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 2.0 ml/min เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย 87:13 %v/v ของ 0.05%trifluoro acetic acid และ acetonitrile ตรวจวัดด้วย DAD ที่ความยาวคลื่น 210 nm หาปริมาณโดยเทียบกับสารมาตรฐาน 8 ชนิด ได้แก่ (-)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG), (-)-Epigallocatechin (EGC), (-)-Epicatechin-3-gallate (ECG), (-)-Epicatechin (EC) (-)-Gallocatechin (GC), (+)-Catechin (C), (-)-Gallocatechin gallate (GCG) และ (-)-Catechin gallate (CG)

3.3.3.4 การวิเคราะห์กาเฟอีน

สกัดคาเฟอีนจากชาโดยชั่งตัวอย่างใบชาประมาณ 10 กรัม ใส่ในเครื่องปั่นความเร็วสูง สกัดด้วยเมทานอล 250 มิลลิลิตร 4 นาที นำไปกรองผ่านกระดาษกรอง เจือจางสารละลายชา สกัด นำไปกรองผ่าน PTFE Syringe filter นำไปฉีด (10 μ l) เข้าเครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC) ตามวิธี ISO 14502-2:2005 ทำการวิเคราะห์ด้วยคอลัมน์ Platinum EPS C18 53x7 mm อุณหภูมิ 30°C อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 2.0 ml/min เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย 87:13 %v/v ของ 0.05%trifluoro acetic acid และ acetonitrile ตรวจวัดด้วย DAD ที่ความยาวคลื่น 210 nm หาปริมาณโดยเทียบกับสารมาตรฐานคาเฟอีน

3.3.3.5 การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

วิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ โดย DPPH Radical scavenging method เทียบกับสารมาตรฐาน Trolox ผสมสารละลายตัวอย่าง 50 μ l กับ 2000 μ l ของ DPPH (60 μ M ในเมทานอล) ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm คำนวณ%Inhibition จาก $\%inhibition = (A_c - A_s) \times 100 / A_c$ เมื่อ A_c และ A_s คือค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุมและค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน สร้างกราฟมาตรฐาน รายงานผล ในรูปของ μ mole equivalent ของ Trolox ต่อ 100 กรัมตัวอย่างแห้ง (Yen&Duh, 1994)

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 การสำรวจโรงงานผลิตชา

โรงงานที่ได้สำรวจทำการผลิตชา 2 ประเภทคือ ชาไม่หมัก (Non-fermented tea) หรือชาเขียว (Green tea) และชากึ่งหมัก (Semi-fermented tea) หรือชาอู่หลง (Oolong tea) ในการผลิตชาทั้งสองชนิดใช้ชา 3 สายพันธุ์ใหญ่ ๆ คือ พันธุ์อัสสัม (Assam) พันธุ์อู่หลงเบอร์ 12 (Oolong No. 12) และพันธุ์อู่หลงเบอร์ 17 (Oolong No. 17) โดยการผลิตชาเขียวใช้ชาพันธุ์อัสสัม และอู่หลงเบอร์ 12 การผลิตชาอู่หลงใช้ชาพันธุ์อู่หลงเบอร์ 12 และอู่หลงเบอร์ 17

กระบวนการผลิตชาเขียว หรือชาไม่หมัก (Non-fermented tea) เริ่มจากการเก็บใบชาสด นำมาผึ่งแดด (outdoor withering) เพื่อลดปริมาณน้ำ จากนั้นนำไปคั่วด้วยเตาไฟฟ้า (pan firing) ที่อุณหภูมิ 250-300°C ใช้เวลาประมาณ 4-5 นาที นำไปนวด และอบแห้ง

กระบวนการผลิตชาอู่หลง หรือชากึ่งหมัก (Semi-fermented tea) เริ่มจากการเก็บใบชาสด นำมาผึ่งแดด (outdoor withering) เพื่อลดปริมาณน้ำ จากนั้นนำไปผึ่งในร่ม (indoor withering) โดยควบคุมอุณหภูมิและความชื้นเพื่อให้เกิดการหมักบางส่วน จากนั้นนำไปชาไปคั่วด้วยเตาไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 250-300°C ใช้เวลาประมาณ 4-5 นาที นำไปนวดจนเป็นเม็ด และอบแห้ง



Collection of fresh tea leaves



Outdoor Withering



Indoor Withering



Pan firing

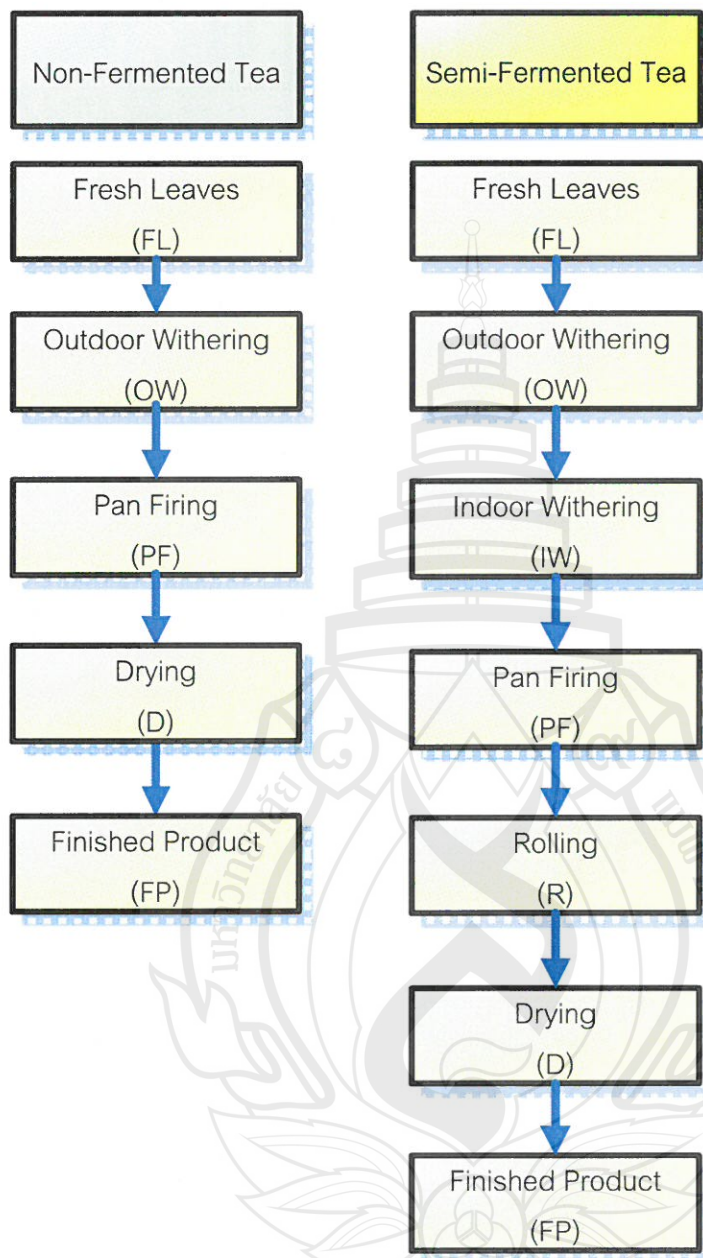


Rolling



Drying

ภาพที่ 4-1 กระบวนการผลิตชาเขียวและชาอู่หลงของโรงงาน



ภาพที่ 4-2 กระบวนการผลิตชาเขียวและชาอู่หลง

4.2 การเก็บตัวอย่างชา

ทำการเก็บตัวอย่างชาในระหว่างขั้นตอนต่าง ๆ ของการผลิตชาเขียวและชาอู่หลง ตามรายละเอียดดังนี้

4.2.1 ชาเขียว

เก็บตัวอย่างชาที่ใช้ผลิตชาเขียวจำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ ชาพันธุ์อัสสัม จาก ต.แม่ นะ อ.เชียงดาว จ. เชียงใหม่ และชาพันธุ์อู่หลงเบอร์ 12 จาก ต.ป่าหุง อ. พาน จ. เชียงราย เก็บตัวอย่างในระหว่างกระบวนการผลิต 4 ขั้นตอน ได้แก่ ใบชาสด (Fresh tea leaves) ใบชา ที่ผ่านการผึ่ง (Withering) ใบชาที่ผ่านการคั่ว (Pan firing) และใบชาที่ผ่านการอบแห้ง (Drying) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย (Finished product)

4.2.2 ชาอู่หลง

เก็บตัวอย่างชาที่ใช้ผลิตชาอู่หลงจำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ ชาพันธุ์อู่หลงเบอร์ 17 จาก หมู่บ้านโป่งน้ำร้อน ต.คอยฮาง อ.เมือง จ. เชียงราย และชาพันธุ์อู่หลงเบอร์ 12 จาก หมู่บ้านดงเจริญ ต. ป่าก่อคำ อ.แม่ลาว จ. เชียงราย เก็บตัวอย่างในระหว่างกระบวนการผลิต 5 ขั้นตอน ได้แก่ ตัวอย่างใบชาสด (Fresh tea leaves) ใบชาที่ผ่านการหมักบางส่วน (Fermentation) โดยการผึ่งในร่ม (Indoor withering) ใบชาที่ผ่านการคั่ว (Pan firing) ใบชาที่ ผ่านการนวดเป็นเม็ด (Rolling) และใบชาที่ผ่านการอบแห้ง (Drying) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ สุดท้าย (Finished product)

4.3 การเปลี่ยนแปลงในระหว่างกระบวนการผลิตชาเขียว

4.3.1 การเปลี่ยนแปลงปริมาณความชื้น

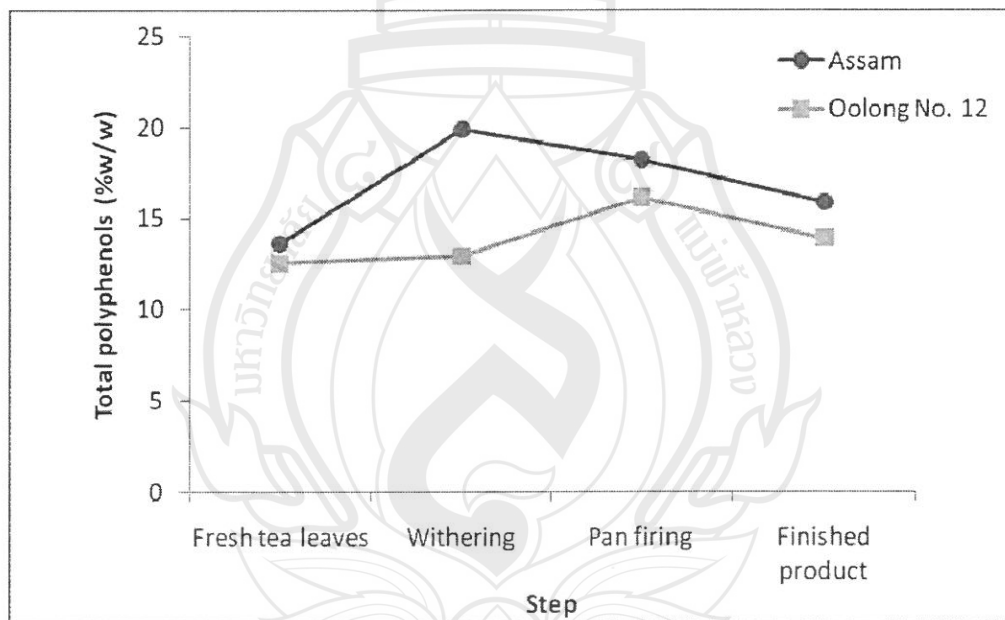
ใบชาสดพันธุ์อัสสัม และอู่หลงเบอร์ 12 ที่นำมาผลิตชาเขียวมีปริมาณความชื้น $83.24 \pm 0.32\%w/w$ และ $76.20 \pm 0.15\%w/w$ ตามลำดับ (ภาพที่ 4-3) ภายหลังจากผึ่ง (Withering) เพื่อลดปริมาณความชื้นในใบชา พบว่าใบชาพันธุ์อัสสัมมีความชื้น $73.16 \pm 0.21\%w/w$ และพันธุ์อู่หลงเบอร์ 12 มีความชื้น $51.55 \pm 0.19\%w/w$ อัตราการระเหยน้ำในขั้นตอนการผึ่งใบชาคิดเป็น 12 และ 19% ในชาพันธุ์อัสสัมและอู่หลงเบอร์ 12 เมื่อใบชาถูกนำไปคั่วด้วยเตาไฟฟ้า (Pan firing) เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส ปริมาณความชื้นของใบชาลดลงเล็กน้อย ปริมาณความชื้นลดลงอย่างเห็นได้ชัดในขั้นตอนการทำแห้ง (Drying) ในขั้นตอนการทำแห้งปริมาณความชื้นของผลิตภัณฑ์ที่ได้หลังอบแห้งชาพันธุ์อัสสัม และอู่หลงเบอร์ 12 มีค่า $3.04 \pm 0.40\%w/w$ และ $3.45 \pm 0.35\%w/w$ ตามลำดับ



ภาพที่ 4-3 การเปลี่ยนแปลงปริมาณความชื้นของใบชาในขั้นตอนการผลิตชาเขียว

4.3.2 การเปลี่ยนแปลงปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด

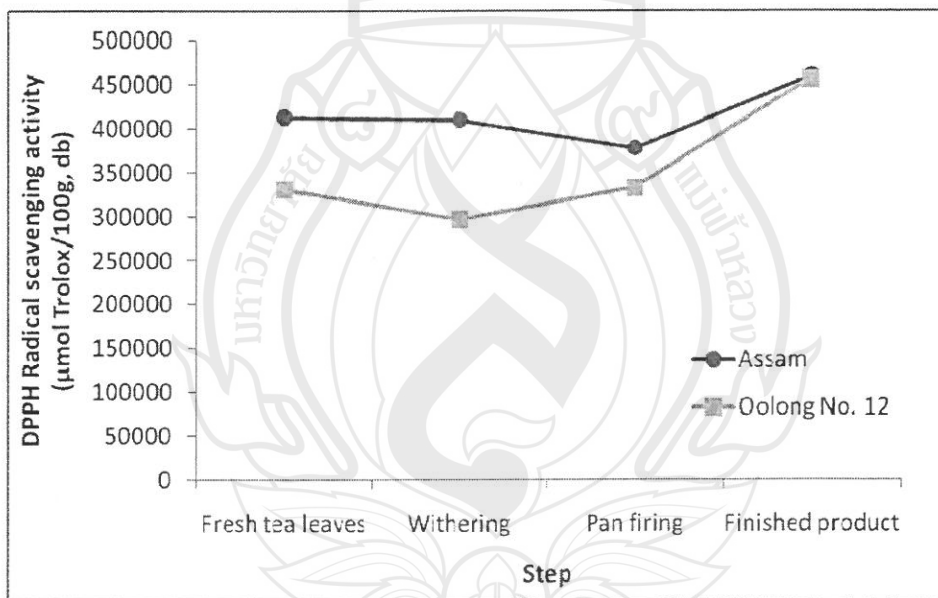
ภาพที่ 4-4 แสดงการเปลี่ยนแปลงปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดในใบชาระหว่างกระบวนการผลิตชาเขียว ใบชาสดพันธุ์อัสสัม และอู่หลงเบอร์ 12 ที่นำมาผลิตชาเขียวมีปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด $13.64 \pm 0.16\%w/w$ และ $12.54 \pm 0.18\%w/w$ ตามลำดับ ในระหว่างกระบวนการมีการเปลี่ยนแปลงปริมาณโพลีฟีนอลของชาพันธุ์อัสสัมในช่วง 13.64-19.88%w/w และชาพันธุ์อู่หลงเบอร์ 12 ในช่วง 12.54-16.15%w/w ผลิตภัณฑ์ชาเขียวอัสสัมสุดท้ายมีโพลีฟีนอล $15.92 \pm 0.30\%w/w$ ชาเขียวอู่หลงสุดท้ายมีโพลีฟีนอล $13.90 \pm 0.07\%w/w$



ภาพที่ 4-4 การเปลี่ยนแปลงปริมาณโพลีฟีนอลในขั้นตอนการผลิตชาเขียว

4.3.3 การเปลี่ยนแปลงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

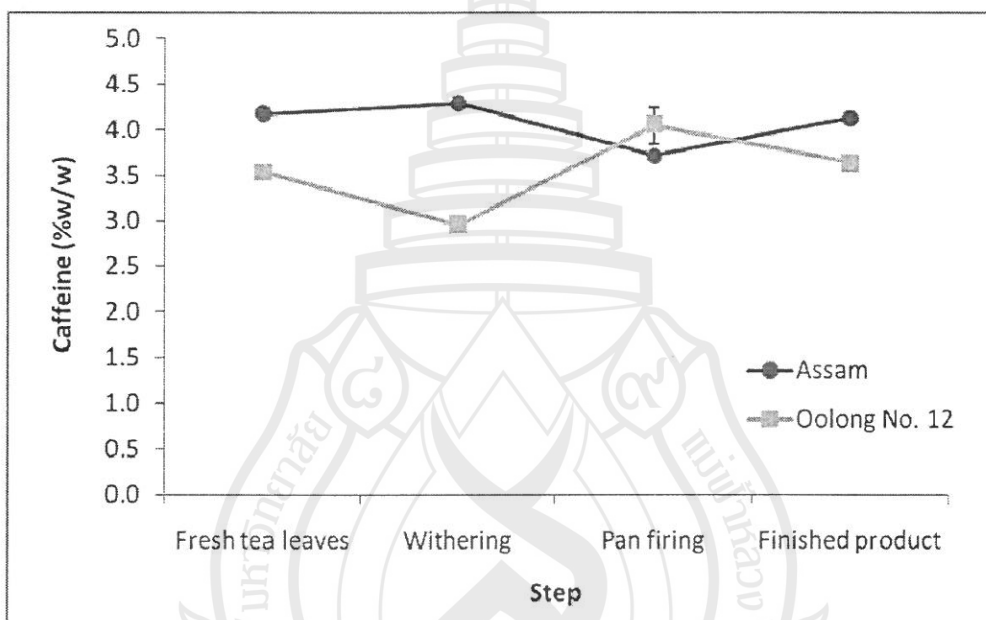
ภาพที่ 4-5 แสดงความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ DPPH ของชา ใบชาสดพันธุ์ อัสสัม และอู่หลงเบอร์ 12 ที่นำมาผลิตชาเขียวมีความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ DPPH เทียบเป็นปริมาณ Trolox เท่ากับ $413,059 \pm 4,242 \mu\text{mol Trolox}/100\text{g dry basis}$ และ $330,664 \pm 612 \mu\text{mol Trolox}/100\text{g dry basis}$ ตามลำดับ ความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ DPPH ของชาในระหว่างการผึ่ง และการคั่วไม่แตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเทียบกับใบชาสด อย่างไรก็ตามพบว่าใบชาทั้งสองพันธุ์มีความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ DPPH สูงขึ้นเล็กน้อยภายหลังการอบแห้ง ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่ามีการเปลี่ยนแปลงชนิดและปริมาณของคาเทชินในขั้นตอนการอบแห้ง ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ



ภาพที่ 4-5 การเปลี่ยนแปลงความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ DPPH ของใบชาในขั้นตอนการผลิตชาเขียว

4.3.4 การเปลี่ยนแปลงปริมาณคาเฟอีน

ใบชาสดพันธุ์อัสสัม และอู่หลงเบอร์ 12 มีคาเฟอีน $4.17 \pm 0.40\%w/w$ และ $3.54 \pm 0.40\%w/w$ ตามลำดับ ปริมาณคาเฟอีนไม่ค่อยเปลี่ยนแปลงในระหว่างกระบวนการผลิต โดยมีค่าแกว่งอยู่ในช่วงประมาณ 3-4% (ภาพที่ 4-6)



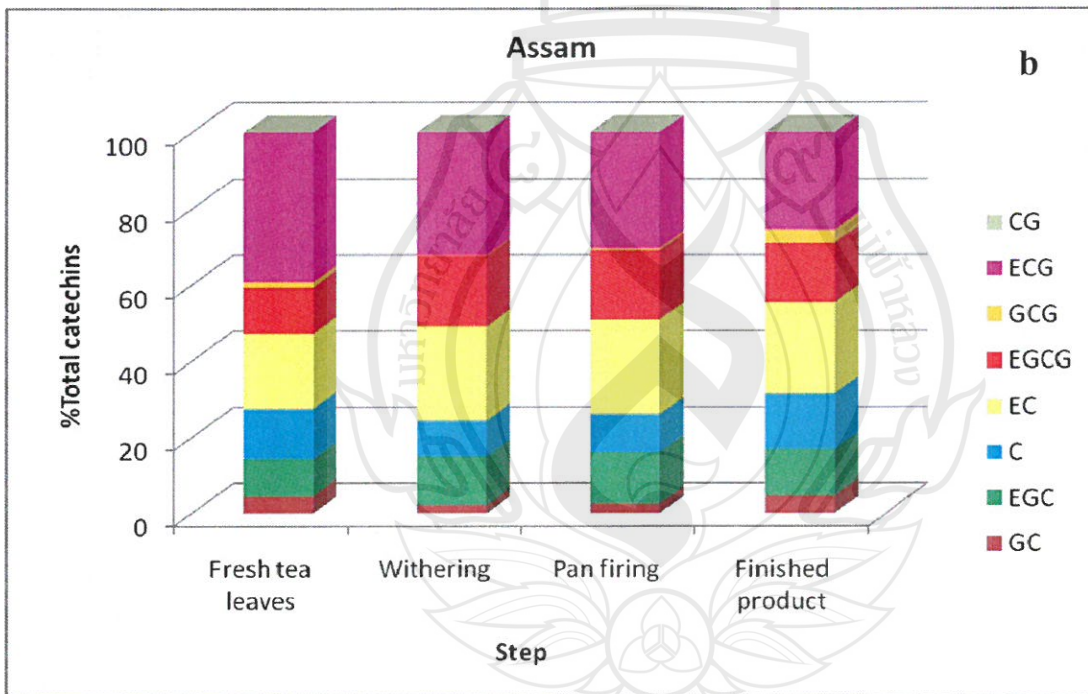
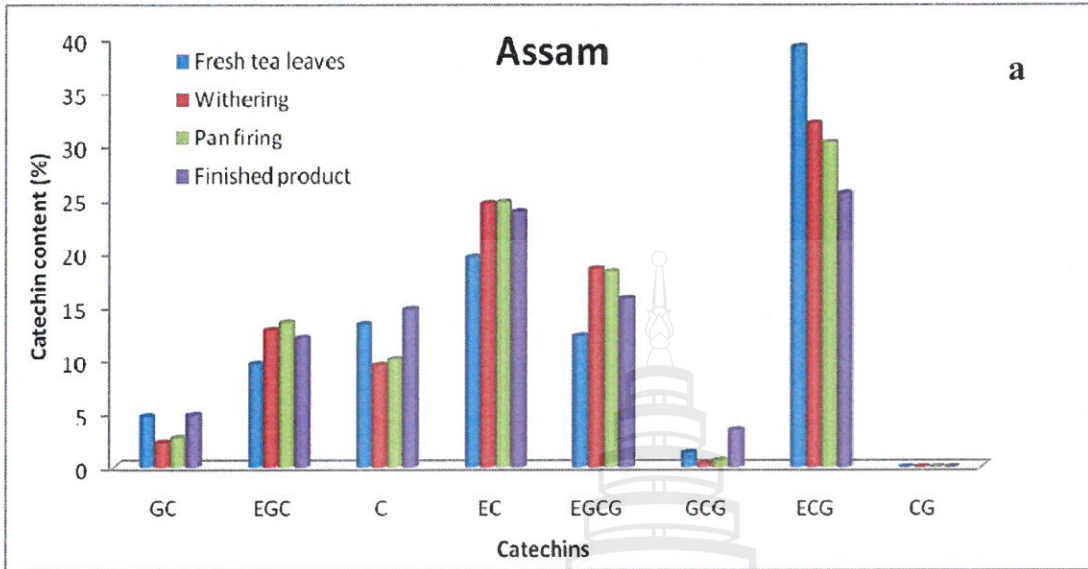
ภาพที่ 4-6 ปริมาณคาเฟอีนในใบชาในขั้นตอนการผลิตชาเขียว

4.3.5 การเปลี่ยนแปลงชนิดและปริมาณคาเทชิน

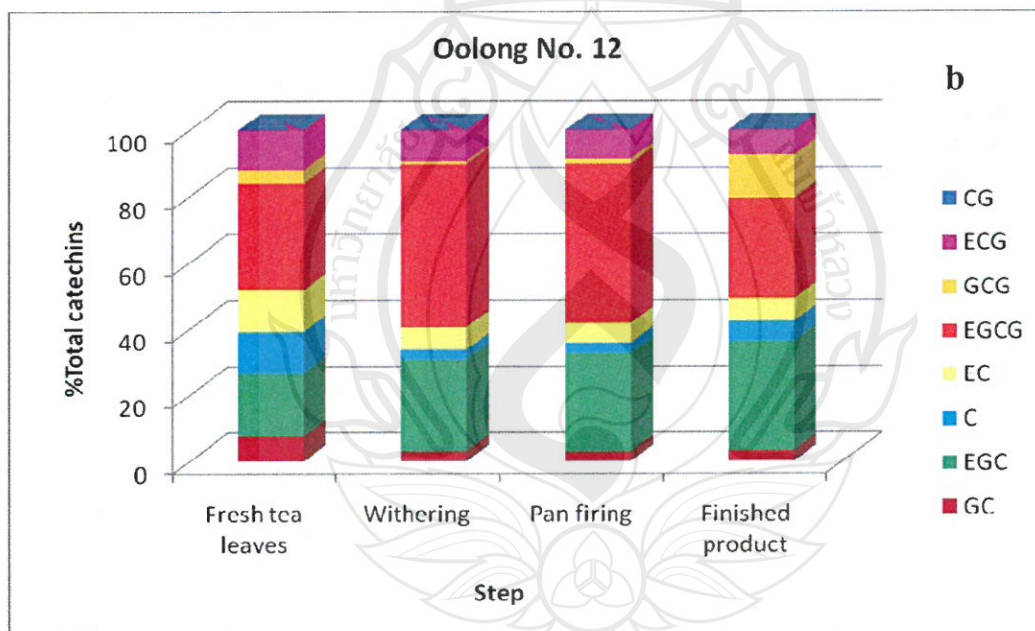
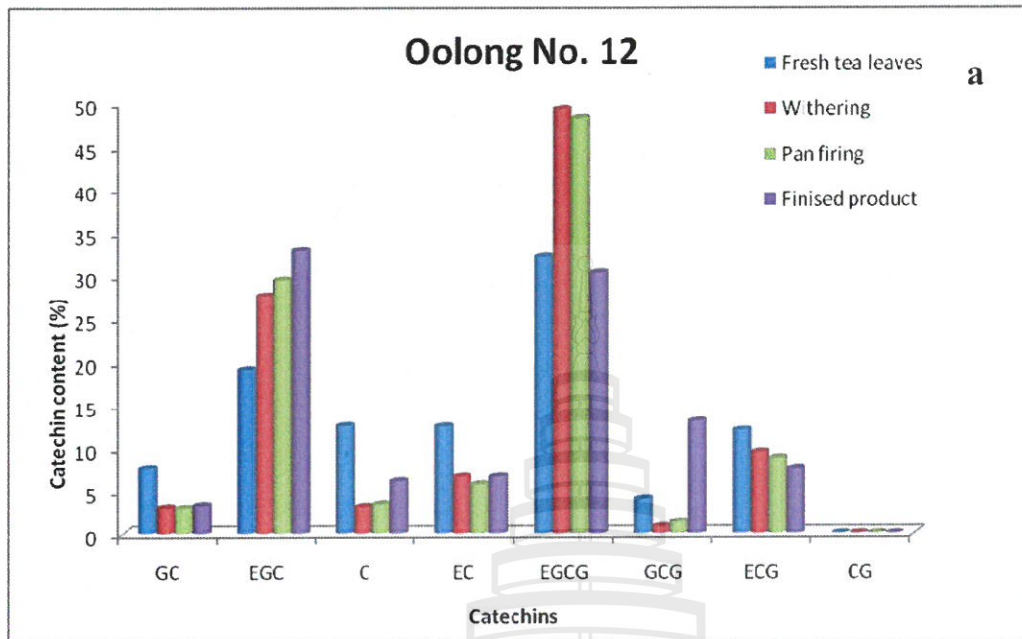
ใบชาสดพันธุ์อัสสัมมีคาเทชินชนิด ECG มากที่สุดคิดเป็นประมาณ 39% ของคาเทชินทั้งหมดตามด้วย EC 20%, C 13%, EGCG 12%, EGC 10%, GC 5%, GCG 1% ไม่พบ CG ในระหว่างกระบวนการสิ่งที่มองเห็นได้ค่อนข้างชัดเจนคือปริมาณ ECG มีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่องในขั้นตอนการผึ่ง การคั่ว และการทำแห้ง (ภาพที่ 4-7)

สำหรับชาพันธุ์อู่หลงเบอร์ 12 พบว่า ใบชาสดพันธุ์อู่หลงเบอร์ 12 มีคาเทชินชนิด EGCG มากที่สุดคิดเป็นประมาณ 32% ของคาเทชินทั้งหมดตามด้วย EGC 19%, ECG 12%, C 13%, EC 12%, GC 8%, GCG 4% ไม่พบ CG เช่นเดียวกับใบชาสดพันธุ์อัสสัม ในระหว่างกระบวนการผลิตสิ่งที่มองเห็นได้ค่อนข้างชัดเจนคือปริมาณ EGC มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างเป็นลำดับเมื่อผ่านกระบวนการผึ่ง คั่ว และทำแห้ง ในขณะที่ ECG มีแนวโน้มลดลง ส่วน EGCG มีปริมาณเพิ่มขึ้นจากใบชาสดเมื่อผ่านขั้นตอนการผึ่งและคั่ว อย่างไรก็ตาม ภายหลังจากอบแห้งแล้วพบว่าปริมาณ EGCG ลดอยู่ในระดับใกล้เคียงกับใบชาสดเริ่มต้น (ภาพที่ 4-8)

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างปริมาณคาเทชินแต่ละชนิดในใบชาสดและปริมาณคาเทชินแต่ละชนิดในระหว่างกระบวนการผลิต พบว่าในกระบวนการผลิตชาเขียวจากชาทั้งสองพันธุ์ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงชนิดของคาเทชินในลักษณะที่คล้ายและแตกต่างกันไป จากรูป 4-9 การผลิตชาเขียวจากชาพันธุ์อัสสัมและอู่หลงเบอร์ 12 พบว่าขั้นตอนการผึ่ง และการคั่ว มีแนวโน้มทำให้คาเทชินชนิด GC, C และ GCG ซึ่งเป็นคาเทชินแบบ non-epistructure ลดต่ำลง และพบว่าคาเทชินชนิด epistructure พวก EGC และ EGCG เพิ่มสูงขึ้น ในขณะที่การผึ่งและการคั่วทำให้ EC เพิ่มขึ้นในชาอัสสัมแต่ลดลงในชาอู่หลงเบอร์ 12 ขั้นตอนการผึ่ง การคั่ว และการทำแห้งทำให้ ECG นั้นลดลงอย่างต่อเนื่องทั้งในชาอัสสัมและชาอู่หลงเบอร์ 12 ผลของขั้นตอนการผลิตต่อการเปลี่ยนแปลงที่เห็นได้ชัดเจนคือ มีการลดลงของ EGCG ในขั้นตอนการทำแห้งพร้อมกันกับการเพิ่มขึ้นของ GCG ซึ่งเป็นคู่ epimer กัน ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าความร้อนจากการอบแห้งทำให้เกิด epimerization จาก EGCG เป็น GCG

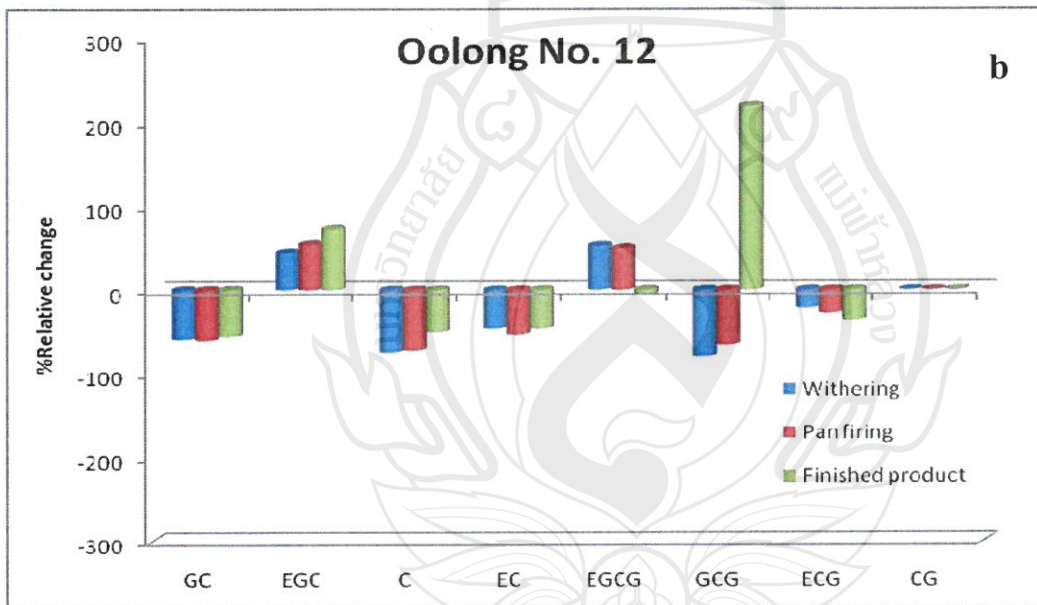
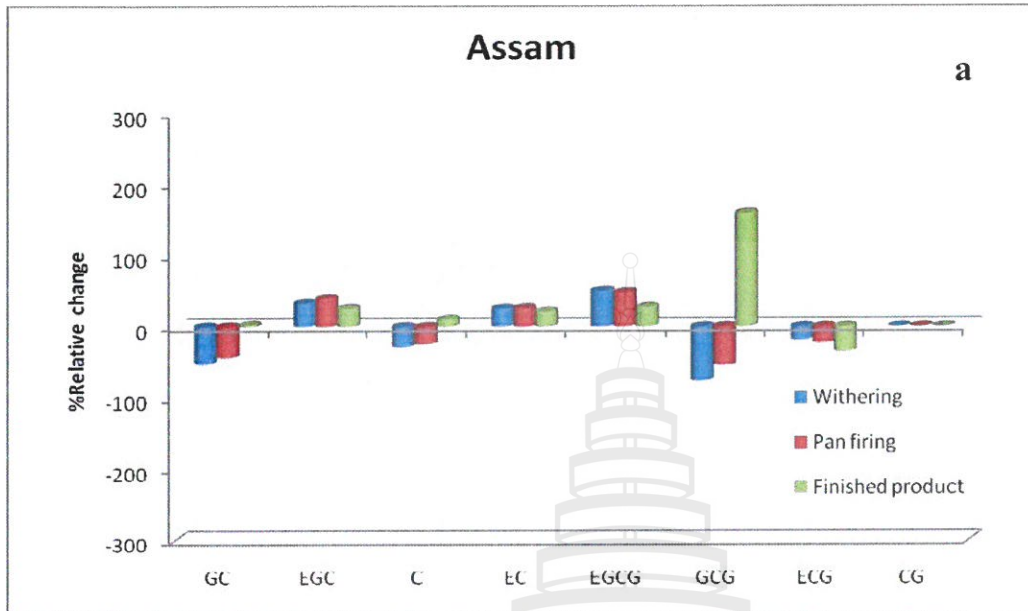


ภาพที่ 4-7 ปริมาณคาเทชินแต่ละชนิดในใบชาในกระบวนการผลิตชาเขียวที่ผลิตจากชาพันธุ์อัสสัม
 (a) การเปลี่ยนแปลงคาเทชินแต่ละชนิด (b) อัตราส่วนของคาเทชินแต่ละชนิด



ภาพที่ 4-8 ปริมาณคาเทชินแต่ละชนิดในใบชาในขั้นตอนการผลิตชาเขียวที่ผลิตจากชาพันธุ์อู่หลงเบอร์ 12

(a) การเปลี่ยนแปลงคาเทชินแต่ละชนิด (b) อัตราส่วนของคาเทชินแต่ละชนิด

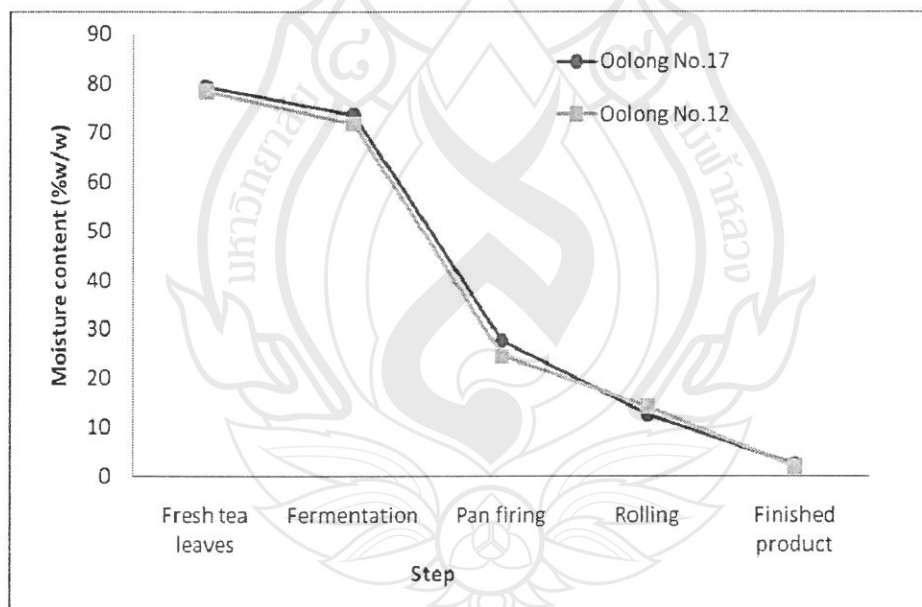


ภาพที่ 4-9 การเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงคาเทชินเมื่อเทียบกับคาเทชินในใบชาสดเริ่มต้น
 (a) ชาพันธุ์อัสสัม (b) ชาพันธุ์อูหลงเบอร์ 12

4.4 การเปลี่ยนแปลงในระหว่างกระบวนการผลิตชาอู่หลง

4.4.1 การเปลี่ยนแปลงปริมาณความชื้น

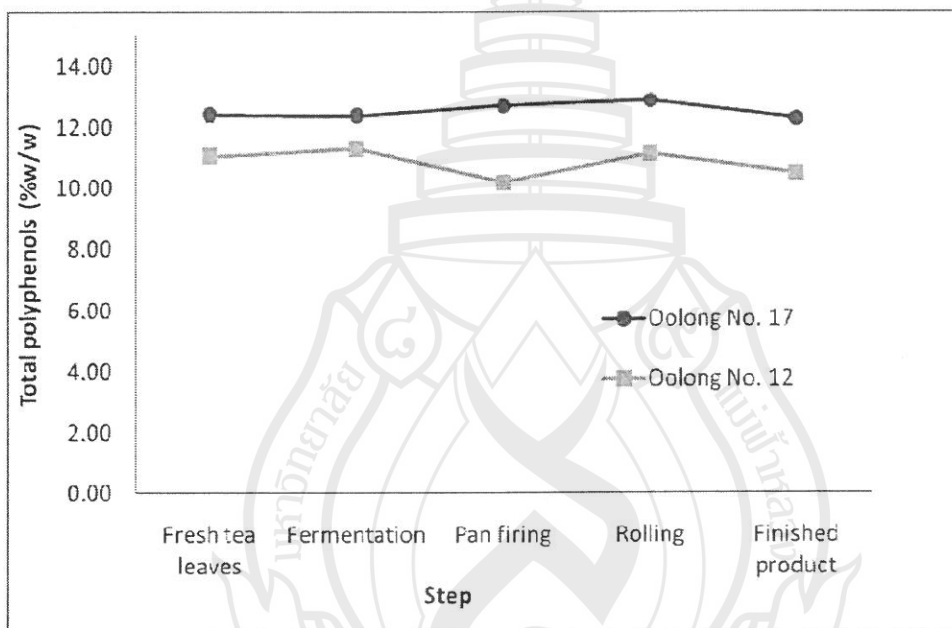
ใบชาสดพันธุ์อู่หลงเบอร์ 12 และอู่หลงเบอร์ 17 ที่นำมาผลิตชาอู่หลงซึ่งเป็นชากิ่งหมักมีปริมาณความชื้น $79.42 \pm 0.19\%w/w$ และ $78.34 \pm 0.36\%w/w$ ตามลำดับ (ภาพที่ 4-10) ภายหลังจากการหมัก (Fermentation) พบว่าใบชาพันธุ์อู่หลงเบอร์ 17 มีความชื้น $73.63 \pm 0.38\%w/w$ และ พันธุ์อู่หลงเบอร์ 12 มีความชื้น $71.76 \pm 0.12\%w/w$ เมื่อใบชาถูกนำไปคั่วด้วยเตาไฟฟ้า (Pan firing) เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส พบว่าปริมาณความชื้นของใบชาลดลงอย่างเห็นได้ชัดเป็น $27.72 \pm 0.15\%w/w$ และ $24.49 \pm 0.38\%w/w$ สำหรับชาพันธุ์อู่หลงเบอร์ 17 และ อู่หลงเบอร์ 12 ตามลำดับ เมื่อใบชาถูกส่งเข้าขั้นตอนการนวด พบว่าปริมาณความชื้นลดลงอีกเล็กน้อย และในขั้นตอนการทำแห้งปริมาณความชื้นของผลิตภัณฑ์ที่ได้หลังอบแห้งชาพันธุ์อู่หลงเบอร์ 17 และอู่หลงเบอร์ 12 มีค่า $2.37 \pm 0.08\%w/w$ และ $1.86 \pm 0.02\%w/w$ ตามลำดับ



ภาพที่ 4-10 การเปลี่ยนแปลงปริมาณความชื้นของใบชาในขั้นตอนการผลิตชาอู่หลง

4.4.2 การเปลี่ยนแปลงปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด

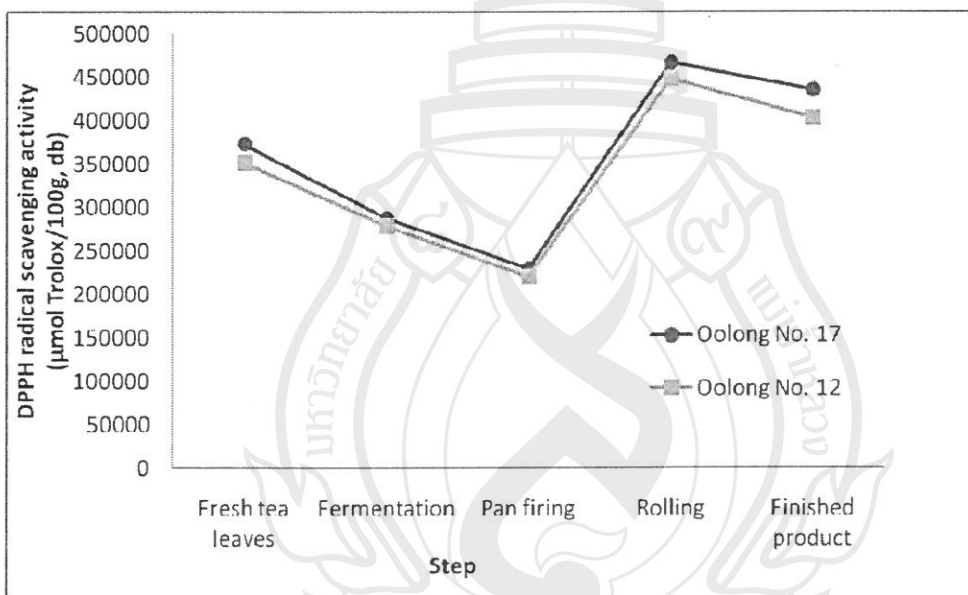
ภาพที่ 4-11 แสดงการเปลี่ยนแปลงปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดในใบชาระหว่างกระบวนการผลิตชาอู่หลง ใบชาสดพันธุ์อู่หลงเบอร์ 17 และอู่หลงเบอร์ 12 ที่นำมาผลิตมีปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด $12.41 \pm 0.21\%w/w$ และ $11.03 \pm 0.13\%w/w$ ตามลำดับ ในระหว่างกระบวนการผลิตปริมาณโพลีฟีนอลของชาทั้งสองพันธุ์ค่อนข้างคงที่ ผลิตภัณฑ์ชาอู่หลงสุดท้ายมีปริมาณโพลีฟีนอล $12.29 \pm 0.07\%w/w$ และ $10.50 \pm 0.15\%w/w$ สำหรับชาอู่หลงพันธุ์เบอร์ 17 และ 12 ตามลำดับ



ภาพที่ 4-11 การเปลี่ยนแปลงปริมาณโพลีฟีนอลในขั้นตอนการผลิตชาอู่หลง

4.4.3 การเปลี่ยนแปลงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

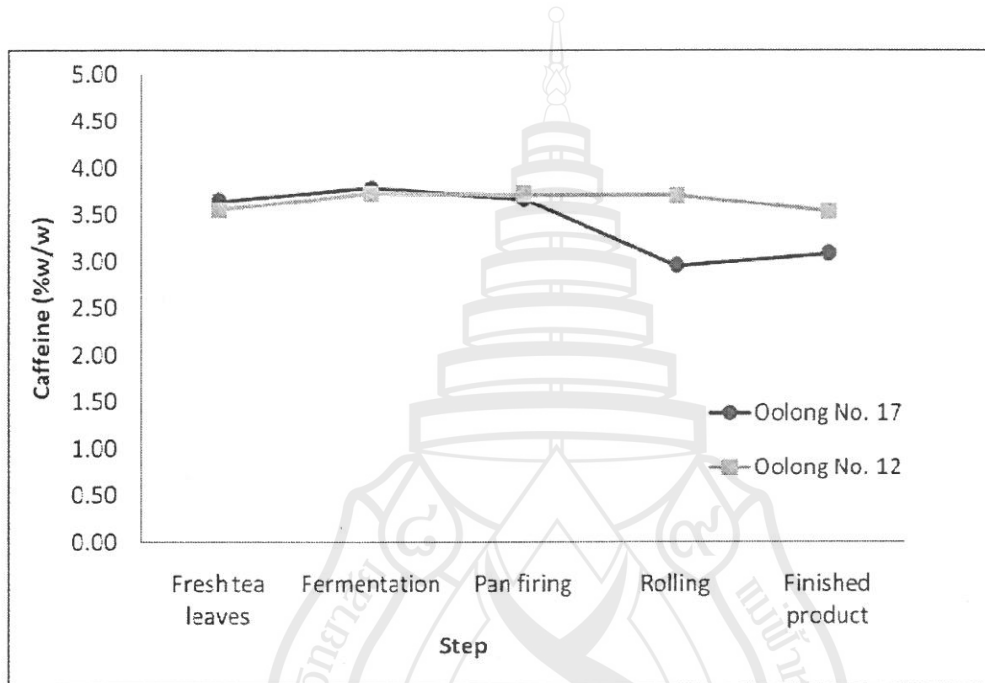
ภาพที่ 4-12 แสดงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของชา ใบชาสด พันธุ์อู่หลงเบอร์ 17 และอู่หลงเบอร์ 12 ที่นำมาผลิตชาอู่หลงมีความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ DPPH เทียบเป็นปริมาณ Trolox เท่ากับ $373,610 \pm 2,212 \mu\text{mol Trolox}/100\text{g dry basis}$ และ $352,183 \pm 658 \mu\text{mol Trolox}/100\text{g dry basis}$ ตามลำดับ ความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ DPPH ของชาในระหว่างการหมัก (Fermentation) ลดลงจากใบชาสด และลดลงต่ำที่สุดในขั้นตอนการคั่ว (Pan firing) อย่างไรก็ตามพบว่าชาทั้งสองสายพันธุ์ที่ผ่านขั้นตอนการนวดมีความสามารถในการจับอนุมูลอิสระเพิ่มสูงขึ้นจากขั้นตอนการคั่ว และลดลงเล็กน้อยจนอยู่ในระดับใกล้เคียงกับใบชาสดเริ่มต้นในขั้นตอนการทำแห้ง



ภาพที่4-12 การเปลี่ยนแปลงความสามารถในการจับอนุมูลอิสระDPPH ของใบชาในขั้นตอนการผลิตชาอู่หลง

4.4.4 การเปลี่ยนแปลงปริมาณคาเฟอีน

ใบชาสดพันธุ์อู่หลงเบอร์ 12 และอู่หลงเบอร์ 17 มีคาเฟอีน $3.64 \pm 0.02\%w/w$ และ $3.55 \pm 0.03\%w/w$ ตามลำดับ ปริมาณคาเฟอีนไม่ค่อยเปลี่ยนแปลงในระหว่างกระบวนการผลิต โดยมีค่าแกว่งอยู่ในช่วงประมาณ 3-4% w/w (ภาพที่ 4-13)



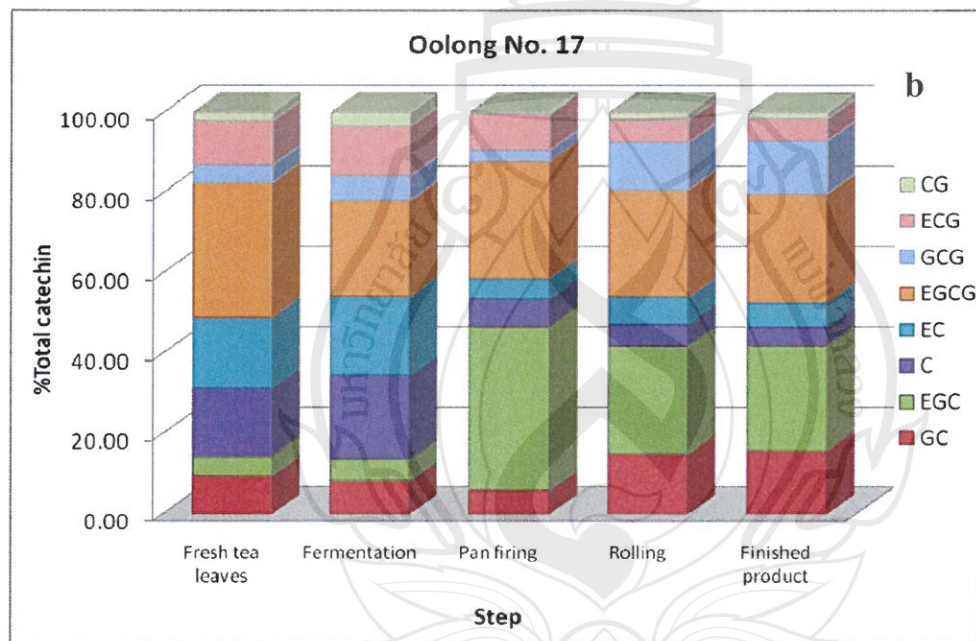
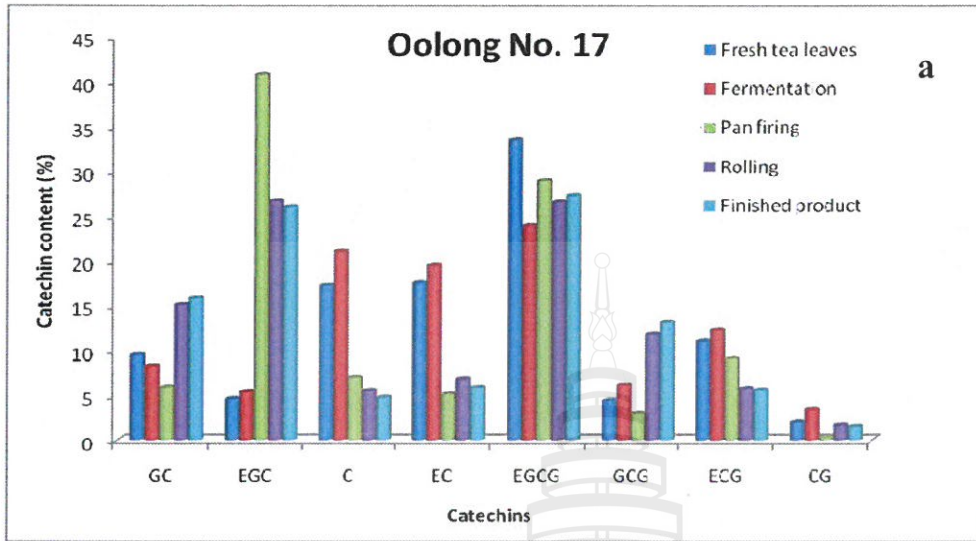
ภาพที่ 4-13 ปริมาณคาเฟอีนในใบชาในขั้นตอนการผลิตชาอู่หลง

4.4.5 การเปลี่ยนแปลงชนิดและปริมาณคาเทชิน

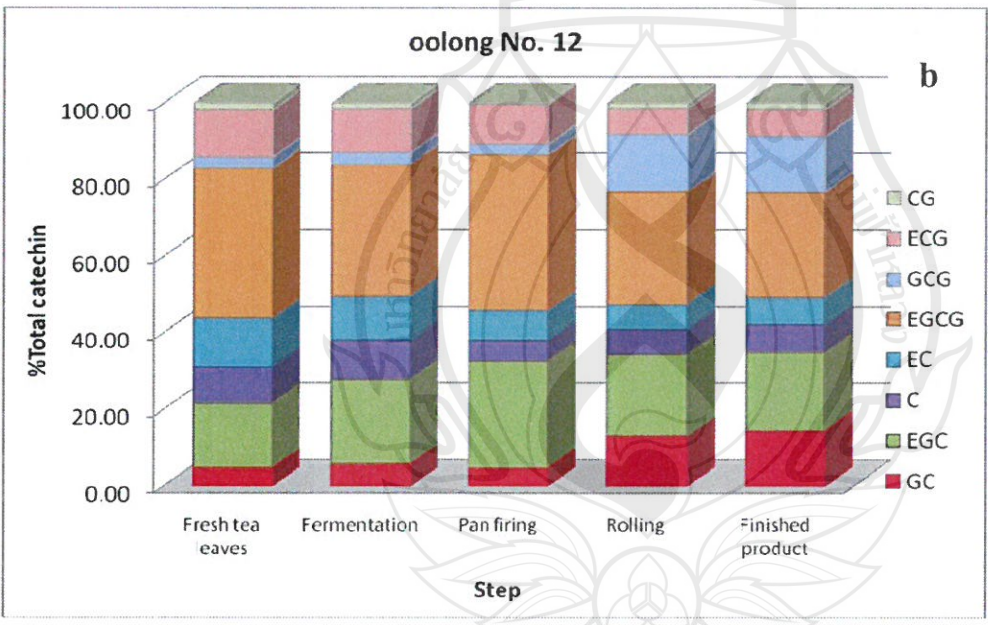
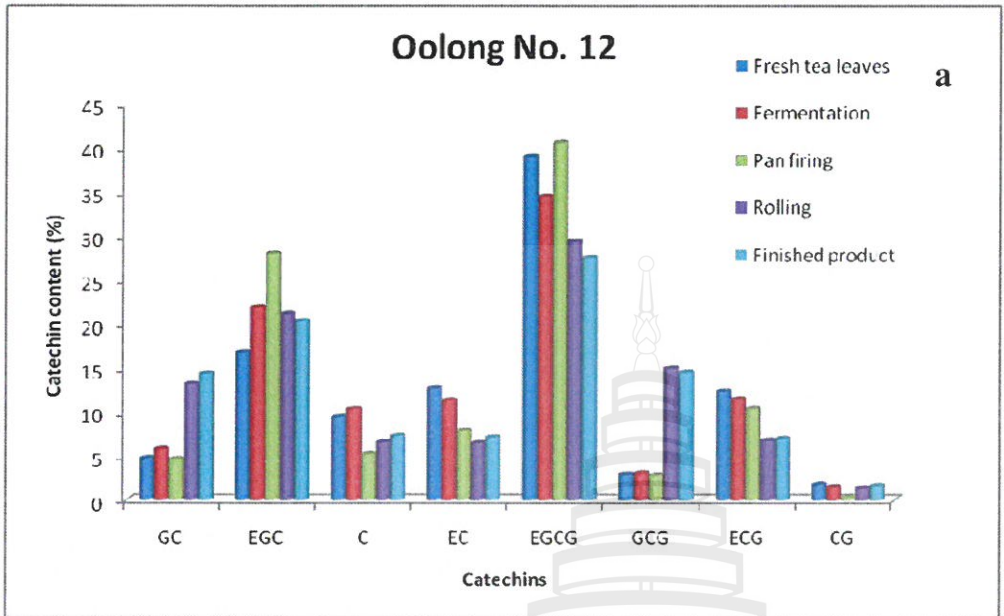
ใบชาสดพันธุ์อู่หลงเบอร์ 17 มีคาเทชินชนิด EGCG มากที่สุดคิดเป็นประมาณ 33% ของคาเทชินทั้งหมดตามด้วย EC 18%, C 17%, ECG 11%, GC 10%, EGC 5%, GCG 4% และ CG 2% ตามลำดับ ในระหว่างกระบวนการผลิตสิ่งที่มองเห็นได้ชัดเจนคือขั้นตอนการคั่วทำให้ปริมาณ EGC เพิ่มขึ้น ในขณะที่ปริมาณ C และ EC ลดลง ขั้นตอนการนวดและอบแห้งทำให้ GCG เพิ่มสูงขึ้น (ภาพที่ 4-14)

สำหรับชาพันธุ์อู่หลงเบอร์ 12 พบว่า ใบชาสดพันธุ์อู่หลงเบอร์ 12 มีคาเทชินชนิด EGCG มากที่สุดคิดเป็นประมาณ 39% ของคาเทชินทั้งหมดตามด้วย EGC 17%, EC 13%, ECG 12%, C 10%, GC 5%, GCG 3% และ CG 2% ขั้นตอนการนวด และอบแห้งทำให้ปริมาณคาเทชินชนิด GC และ GCG เพิ่มขึ้น ในขณะที่ EGCG และ ECG ลดลง (ภาพที่ 4-15)

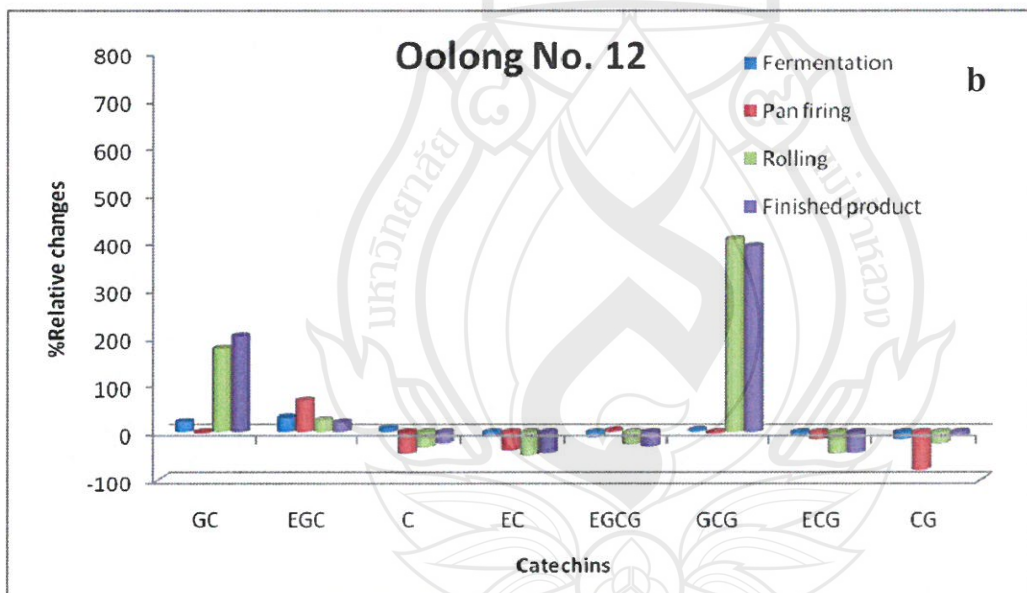
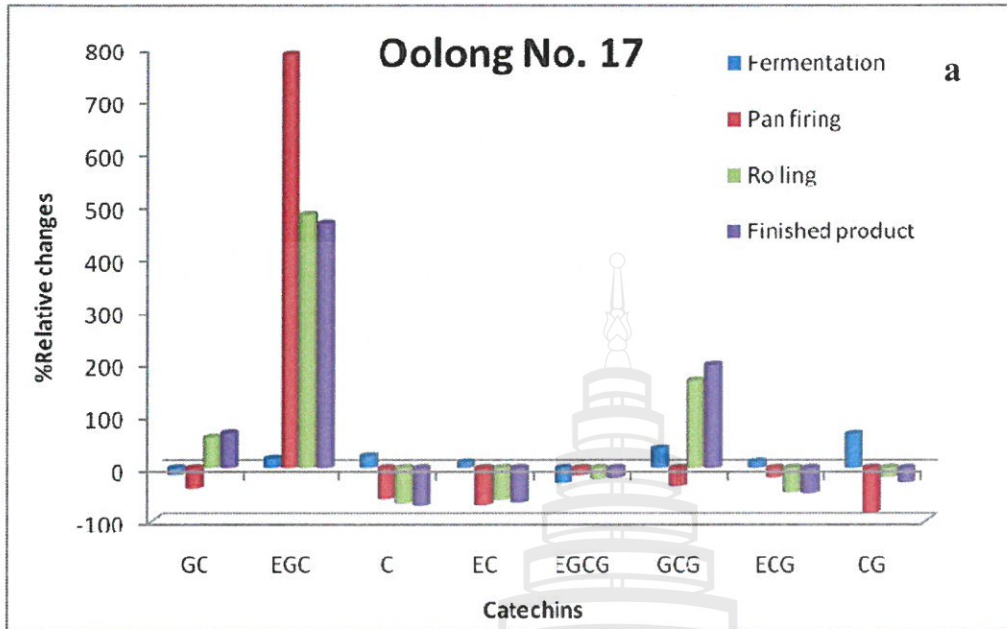
เมื่อเปรียบเทียบระหว่างปริมาณคาเทชินแต่ละชนิดในใบชาสดกับใบชาในระหว่างกระบวนการผลิต พบว่าในกระบวนการผลิตชาอู่หลงจากชาจีนทั้งสองพันธุ์ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงชนิดของคาเทชินในลักษณะที่คล้ายและแตกต่างกันไป จากภาพที่ 4-16 พบว่าขั้นตอนการหมัก (Fermentation) ไม่ทำให้ชนิดและปริมาณของคาเทชินเปลี่ยนแปลงไปอย่างเห็นได้ชัด ขั้นตอนการคั่วด้วยเตาไฟฟ้าทำให้คาเทชินชนิด EGC เพิ่มขึ้นส่วนคาเทชินชนิดอื่น ๆ ลดลง ขั้นตอนการนวด และอบแห้งทำให้ชาจีนทั้งสองมีปริมาณ GC และ GCG ลดลง



ภาพที่ 4-14 ปริมาณคาเทชินแต่ละชนิดในกระบวนการผลิตชาอู่หลงที่ผลิตจากชาพันธุ์อู่หลงเบอร์ 17
 (a) การเปลี่ยนแปลงคาเทชินแต่ละชนิด (b) อัตราส่วนของคาเทชินแต่ละชนิด



ภาพที่ 4.15 ปริมาณคาเทชินแต่ละชนิดในกระบวนการผลิตชาอู่หลงที่ผลิตจากชาพันธุ์อู่หลงเบอร์ 12
 (a) การเปลี่ยนแปลงคาเทชิน (b) อัตราส่วนของคาเทชินแต่ละชนิด



ภาพที่ 4-16 การเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงคาเทชินเมื่อเทียบกับคาเทชินในใบชาสดเริ่มต้น

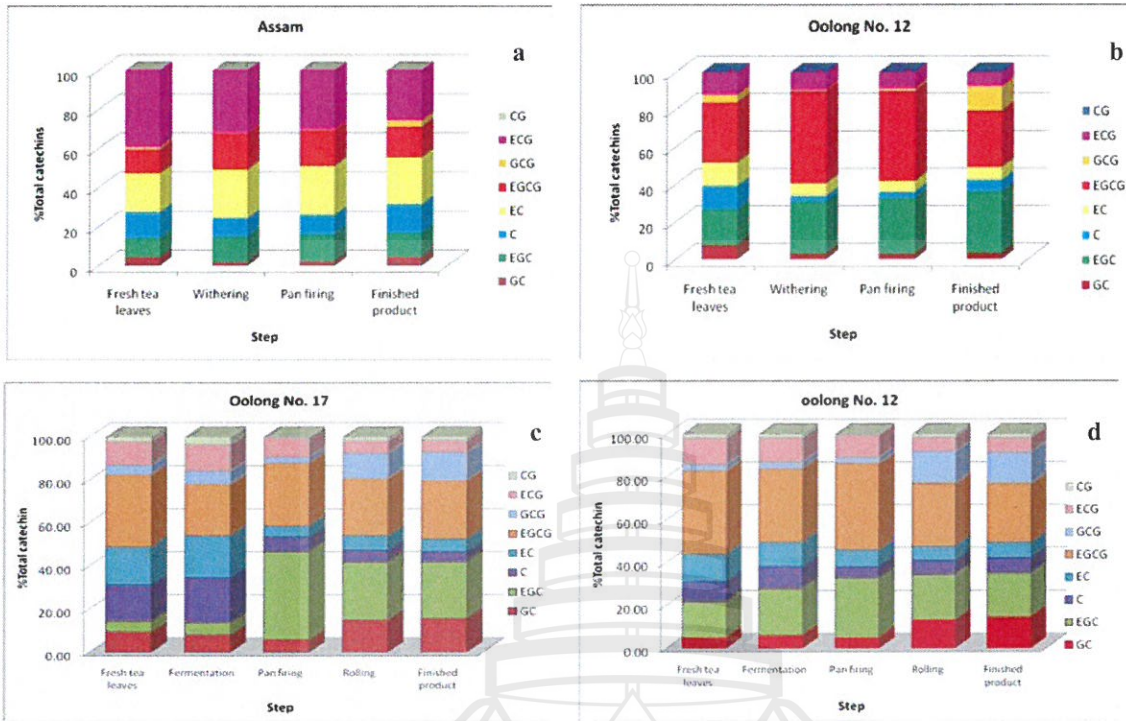
(a) ชาพันธุ์อู่หลงเบอร์ 17 (b) ชาพันธุ์อู่หลงเบอร์ 12

4.5 การเปรียบเทียบผลของขั้นตอนการผลิตต่อการเปลี่ยนแปลงชนิดและปริมาณคาเทชินในระหว่างกระบวนการผลิตชาเขียวและชาอู่หลง

ภาพ 4-17 a และ b แสดงการเปลี่ยนแปลงชนิดและปริมาณของคาเทชินแต่ละชนิดในกระบวนการผลิตชาเขียว พบว่าการเปลี่ยนแปลงที่เห็นได้อย่างชัดเจนในกระบวนการผลิตชาเขียวจากชาพันธุ์อัสสัมและอู่หลงเบอร์ 12 คือ ขั้นตอนการผึ่ง (Withering) ทำให้คาเทชินชนิด GC, C, GCG ลดลง และทำให้คาเทชินชนิด EGC และ EGCG เพิ่มขึ้น คาเทชินแต่ละชนิดไม่เปลี่ยนแปลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อใบชาเข้าสู่ขั้นตอนการคั่ว (Pan firing) แม้ว่าขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนที่ใช้อุณหภูมิสูง (250-300°C) แต่จากผลการทดลองไม่พบการเปลี่ยนแปลงที่เห็นได้ชัด มีงานวิจัยที่ได้ศึกษาถึงการสลายตัว (degradation) และการเกิด epimerization ของ EGCG ในสารละลายที่อุณหภูมิต่าง ๆ (Wang et al., 2008) พบว่า เมื่ออุณหภูมิอยู่ระหว่าง 44-98°C จะให้เกิด epimerization จาก GCG ไปเป็น EGCG ทำให้ปริมาณ GCG ลดลงและปริมาณ EGCG เพิ่มสูงขึ้น อย่างไรก็ตามเมื่ออุณหภูมิสูงเกินกว่า 98°C จะทำให้เกิดการสลายตัวและทำให้เกิด epimerization จาก EGCG ไปเป็น GCG จากผลที่ได้นี้อาจเป็นไปได้ว่าการให้ความร้อนและระยะเวลาที่ใช้ในการคั่วชาไม่ทำให้คาเทชินในใบชาได้รับอุณหภูมิสูงถึงขั้นที่จะทำให้เกิดการสลายตัว หรือการเกิด epimerization ได้ การคั่วชาอาจมีจุดประสงค์เพื่อเป็นการทำลายเฉพาะเอนไซม์ มิได้ต้องการให้องค์ประกอบอื่น ๆ เกิดการเปลี่ยนแปลง ซึ่งเห็นได้จากปริมาณความชื้นของใบชาในกระบวนการผึ่ง และคั่วไม่แตกต่างกันมากนัก (ภาพที่ 4-3) ทำให้ในขั้นตอนคั่วชาไม่เห็นการเปลี่ยนแปลงชนิดและปริมาณคาเทชินอย่างเห็นได้ชัด อย่างไรก็ตามเมื่อใบชาผ่านเข้าสู่ขั้นตอนการอบแห้งพบว่าการเปลี่ยนแปลงคาเทชินที่เห็นได้อย่างชัดเจนคือ ปริมาณคาเทชินชนิด ECG และ EGCG ลดลง คาเทชินชนิด GCG เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด แสดงให้เห็นว่าในขั้นตอนการอบแห้งนี้ ใบชาได้รับความร้อนสูงในระดับที่ทำให้เกิดการสลายตัวและเกิด epimerization ได้ ทำให้มองเห็นการเปลี่ยนแปลงชนิดและปริมาณ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ได้รายงานไว้ก่อนหน้านี้ว่ากระบวนการที่ให้ความร้อนทำให้คาเทชินเกิดการสลายตัว และ epimerization (Komatsu et al., 1993)

เมื่อพิจารณาผลของกระบวนการผลิตต่อการเปลี่ยนแปลงชนิดและปริมาณคาเทชินในกระบวนการผลิตชาอู่หลง (ภาพ 4-17 c และ d) พบว่าชนิดและปริมาณคาเทชินในกระบวนการผลิตชาอู่หลงจากชาพันธุ์อู่หลงเบอร์ 17 และอู่หลงเบอร์ 12 ไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจนในขั้นตอนการหมักเมื่อเทียบกับใบชาสดเริ่มต้น ในขั้นตอนการคั่วมีการเปลี่ยนแปลงที่เห็นได้ชัดเจนคือ คาเทชินชนิด C และ EC ลดลง ส่วนคาเทชินชนิด EGC และ EGCG เพิ่มสูงขึ้น ซึ่งในขั้นตอนนี้ปริมาณความชื้นลดลงจาก 70-80% เป็น 20-30% ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคาเทชินในลักษณะที่แตกต่างไป

จากการคั่วในกระบวนการผลิตชาเขียว การคั่วในกระบวนการผลิตชาเขียวนั้นมีความชื้นลดลงจากขั้นตอนการผึ่งน้อยมากเมื่อเทียบกับการคั่วในการผลิตชาอู่หลง อาจเป็นไปได้ว่าการคั่วในกระบวนการผลิตชาอู่หลงเป็นการคั่วที่ทำให้คาเทชินได้รับอุณหภูมิสูงจนถึงระดับที่สามารถเกิดการสลายตัวหรือเกิด epimerization ได้ จึงพบการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นในขั้นตอนการคั่วของกระบวนการผลิตชาอู่หลง ส่วนขั้นตอนการนวดพบว่าคาเทชินชนิด GC และ GCG เพิ่มสูงขึ้นในขณะที่ epimer ของมัน (EGC และ EGCG) ลดลง คาเทชินชนิด ECG ลดลงเล็กน้อย ส่วนคาเทชินชนิด C และ EC ค่อนข้างคงที่ ในขั้นตอนการนวดนี้เป็นการนวดที่ทำทันทีภายหลังจากขั้นตอนการคั่ว ทำให้อุณหภูมิของใบชายังสูงอยู่ เมื่อใบชาที่มีอุณหภูมิสูงเจอแรงกดดันจากเครื่องนวด ทำให้เซลล์ของใบชาแตก ส่งผลให้น้ำ คาเทชิน และองค์ประกอบทางเคมีอื่น ๆ ไหลออกมาเคลือบอยู่ที่ผิวของใบชา ซึ่งเร่งให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทั้ง degradation, epimerization และ oxidation ส่งผลให้เห็นการเปลี่ยนแปลงอย่างเห็นได้ชัดทั้งความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ และเกิดการเปลี่ยนแปลงชนิดและปริมาณคาเทชิน ส่วนในขั้นตอนการอบแห้งจนได้ผลิตภัณฑ์ชาอู่หลงสุดท้ายพบว่าชนิดและปริมาณคาเทชินไม่เปลี่ยนแปลงไปอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเทียบกับขั้นตอนการนวด อาจเป็นไปได้ว่าการคาเทชินต่าง ๆ ได้รับความร้อน และเกิดการเปลี่ยนแปลงไปอย่างมากในขั้นตอนการคั่วและการนวด การอบแห้งในกระบวนการผลิตชาอู่หลงเป็นเพียงการลดความชื้นลงจากขั้นตอนการนวดซึ่งมีความชื้นประมาณ 13% ให้มีความชื้นประมาณ 2% ซึ่งใช้เวลาอบแห้งไม่นานเมื่อเปรียบเทียบกับการอบแห้งในการผลิตชาเขียว (ลดความชื้นจาก 50-70% เป็น 3%) ทำให้ในขั้นตอนการอบแห้งของกระบวนการผลิตชาเขียวมีการเปลี่ยนแปลงคาเทชิน ส่วนการอบแห้งของกระบวนการผลิตชาอู่หลงไม่เห็นชัดเจนว่ามีการเปลี่ยนแปลงคาเทชิน



ภาพที่ 4-17 การเปรียบเทียบปริมาณคาเทชินแต่ละชนิดในขั้นตอนการผลิตชาเขียวและชาอู่หลง การผลิตชาเขียวจากชาพันธุ์อัสสัม (a) และอู่หลงเบอร์ 12 (b) การผลิตชาอู่หลงจากชาพันธุ์อู่หลงเบอร์ 17 (c) และอู่หลงเบอร์ 12 (d)

บทที่ 5

สรุปผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

ขั้นตอนการผลิตที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงชนิด และปริมาณคาเทชินในกระบวนการผลิตชาเขียว คือ ขั้นตอนการผึ่ง (Withering) และการอบแห้ง (Drying) การผึ่งทำให้คาเทชินชนิด EGC และ EGCG เพิ่มขึ้น ขั้นตอนการอบแห้งทำให้คาเทชินชนิด EGCG ลดลง และคาเทชินชนิด GCG ซึ่งเป็นคู่ epimer ของ EGCG เพิ่มสูงขึ้น

ขั้นตอนการผลิตที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงชนิด และปริมาณคาเทชินในกระบวนการผลิตชาอู่หลง คือ ขั้นตอนการคั่ว (Pan firing) และการนวด (Rolling) การคั่วทำให้คาเทชินชนิด EGC และ EGCG เพิ่มขึ้น ส่วนการนวดทำให้คาเทชินชนิด EGC และ EGCG ลดลง และคาเทชินชนิด GC และ GCG ซึ่งเป็นคู่ epimer ของ EGC และ EGCG เพิ่มสูงขึ้น

5.2 ข้อเสนอแนะของการวิจัย

ผลงานวิจัยที่ได้ดำเนินการในโครงการวิจัยนี้เป็นเพียงงานวิจัยขั้นต้นที่ได้ทำ จากการเข้าสำรวจการผลิต เก็บตัวอย่าง เตรียมตัวอย่าง และวิเคราะห์ตัวอย่าง ผู้วิจัยมีข้อเสนอแนะ และข้อคิดเห็นดังนี้

1. ในการสำรวจโรงงานชา ผู้วิจัยพบว่าการผลิตชาแต่ละครั้ง ผู้ผลิตชาได้ใช้ความชำนาญในการผลิตชาเป็นตัวชี้วัด มิได้มีการกำหนดกฎเกณฑ์ วิธีการ หรือข้อกำหนดที่แน่นอนในแต่ละขั้นตอนของกระบวนการผลิต ซึ่งอาจทำให้ผลที่ได้ในแต่ละครั้งของการผลิตแตกต่างกันไปบ้าง
2. ตัวอย่างชาที่เก็บในขั้นตอนการผลิตต่าง ๆ นั้นควบคุมได้ยาก เนื่องจากความไม่เป็นเนื้อเดียวกันของตัวอย่าง ซึ่งอาจทำให้ผลที่ได้ในแต่ละขั้นตอนการผลิตแตกต่างกันไปบ้าง
3. ผู้วิจัยพบว่าขั้นตอนการสกัดชาเพื่อนำมาวิเคราะห์โพลีฟีนอล ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ รวมทั้งชนิดและปริมาณคาเทชินแต่ละชนิด ส่งผลต่อปริมาณสารที่สกัดได้ถึงแม้ว่าจะทำการสกัดด้วยวิธีการเดียวกันในแต่ละขั้นตอนการผลิต แต่สารที่สกัดได้จะยังคง

แตกต่างกัน เนื่องจากลักษณะของชาเมื่อผ่านกระบวนการผลิตตามขั้นตอนต่าง ๆ แล้วมี
ลักษณะที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาถึงการสกัดที่เหมาะสมที่สุดของ
กระบวนการทั้งหมด รวมทั้งชนิดของสารสกัด และอุณหภูมิสำหรับสกัดชาในทุกขั้นตอน
การผลิต เพื่อให้สามารถบอกได้อย่างชัดเจนว่า สารที่สกัดได้ในชาของแต่ละขั้นตอนเป็น
ชนิดและปริมาณสารจริงๆ ที่อยู่ในชา



บรรณานุกรม

- Burr, J. A.; Timmermann, B. N.; Liebler, D. C. Antioxidant chemistry of green tea catechins. New oxidation products of (-)-epigallocatechin gallate and (-)-epigallocatechin from their reactions with peroxy radicals. *Chem. Res. Toxicol.* 2000, 13, 801–810.
- Chen, C. W., & Ho, C. T. (1995). Antioxidant properties of polyphenols extracted from green and black teas. *Journal of Food Lipids*, 2, 35–46.
- Chen, Z. Y.; Zhu, Q. Y.; Tsang, D.; Huang, Y. Degradation of green tea catechins in tea drinks. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 477–482.
- Chu, D. C., & Juneja, L. R. (1997). General chemical composition of green tea and its infusion. In T. Yamamoto, L. R. Juneja, D. C. Chu, & K. Mujo (Eds.), *Chemistry and applications of green tea* (pp. 13–22). New York: CRC Press.
- Fernandez, P. L., Pablos, F., Martin, M. J., & Gonzales, A. G. (2002). Study of catechin and xantine tea profiles as geographical tracers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1833– 1839.
- Gardner, P. T., McPhail, D. B., & Duthie, G. G. (1998). Electron spin resonance spectroscopic assessment of the antioxidant potential of teas in aqueous and organic media. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76, 257–262.
- Hatano, T.; Hori, M.; Kusuda, M.; Ohya, T.; Ito, H.; Yoshida, T. Characterization of the oxidation products of (-)-epigallocatechin gallate, a bioactive tea polyphenol, on incubation in neutral solution. *Heterocycles* 2004, 63 (7), 1547–1554.
- Hodgson, J. M., Proudfoot, J. M., Croft, K. D., Puddey, I. B., Mori, T. A., & Beilin, L. J. (1999). Comparison of the effect of black and green tea in vitro lipoprotein oxidation in human serum. *Journal of Science and Food Agriculture*, 79, 561–566.
- ISO 1502-1. 2005. Determination of substances characteristic of green and black tea-Part 1: Content of total polyphenols in tea-Colorimetric methods using Folin-Ciocateu reagent. Switzerland: International Standard Organization.

- ISO 1502-2. 2005. Determination of substances characteristic of green and black tea-Part 1: Content of catechins in green tea : method using high performance liquid chromatography. Switzerland: International Standard Organization.
- Komatsu, Y.; Suematsu, S.; Hisanobu, Y.; Saigo, H.; Matsuda, R.; Hara, K. Studies on preservation of constituents in canned drinks. Part II. Effects of pH and temperature on reaction kinetics of catechins in green tea infusion. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* 1993, 57, 907-910.
- Komatsu, Y.; Suematsu, S.; Hisanobu, Y.; Saigo, H.; Matsuda, R.; Hara, K. Studies on preservation of constituents in canned drinks. Part II. Effects of pH and temperature on reaction kinetics of catechins in green tea infusion. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* 1993, 57, 907-910
- Kumamoto, K.; Sonda, T.; Nagayama, K.; Tabata, M. Effects of pH and metal ions on antioxidative activities of catechins. *Biosci., Biotechnol., Biochem* 2001, 65 (1), 126-132.
- Leung, L. K., Su, Y., Chen, R., Zhang, Z., Huang, Y., & Chen, Z. Y. (2001). Theaflavins in black tea and catechins in green tea are equally effective antioxidants. *Journal of Nutrition*, 131, 2248- 2251.
- Lin, J. K., Lin, C. L., Liang, Y. C., Lin-Shiau, S. Y., & Juan, I. M. (1998). Survey of catechins, gallic acid and methylxanthines in green, oolong, pu-erh and black teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 3635-3642.
- Matecka, M. (1997). Economic aspects
- Matsuzaki, T. and Hara, Y. (1985) Antioxidant activity of tea leaf catechins. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 59: 129-134.
- Miyazawa, T. and Nakagawa, K. (1998) Structure-related emission spectrometric analysis of the chemiluminescence of catechins, theflavins and anthocyanins, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 63: 435-438.
- Nakao, M., Takio, S., & Ono, K. (1998). Alkyl peroxy radical scavenging activity of catechins. *Phytochemistry*, 49(8), 2379- 2382.
- Nanjo, F., Goto, K., Seto, R., Suzuki, M., Sakai, M., & Hara, Y. (1996) . Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1- diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Free Radical Biology and Medicine*, 21(6), 895-902
- Opie, S. C., Clofford, M. and Robertson, A. (1993) The role of (-)-epicatechin and polyphenol oxidase in the coupled oxidation breakdown of theaflavins. *J. Sci. Food Agric.*, 63: 435-438.

- Salah, N., Miller, N. J., Paganga, G., Tijburg, L., Bolwell, G. P., & Rice-Evans, C. (1995). Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 22, 339–346.
- Seto, R., Nakamura, H., Nanjo, F. and Hara, Y. (1997) Preparation of epimers of tea catechins by heat treatment, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 61:1434-1439.
- Seto, R.; Nakamura, H.; Nanjo, F.; Hara, Y. Preparation of epimers of tea catechins by heat treatment. *Biosci. Biotech. Biochem.* 1997, 61, 1434-1439.
- Su, Y. L.; Leung, L. K.; Huang, Y.; Chen, Z. Y. Stability of tea theaflavins and catechins. *Food Chem.* 2003, 83, 189–195.
- Von Gadow, A., Joubert, E., & Hansmann, C. F. (1997). Comparison of the antioxidant activity of rooibos (*Aspalathus linearis*) with green, oolong and black tea. *Food Chemistry*, 60, 73–77.
- Wang, L. F., Kim, D. M., & Lee, C. Y. (2000b). Effects of heat processing and storage on flavanols and sensory qualities of green tea beverage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 4227–4232.
- Wang, R., Zhou, W. & Jiang, X. (2008) Reaction kinetics of degradation and epimerization of epigallocatechin gallate (EGCG) in aqueous system over a wide temperature range. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 2694–2710.
- Yen, G. C., & Duh, P. D. (1994). Scavenging effect of methanolic extracts of peanut hulls on free-radical and active oxygen species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 629–632.
- Yokozawa, T., Dong, E., Nakagawa, T., Kashiwagi, H., Nakagawa, H., Takeuchi, S., et al. (1998). In vitro and in vivo studies on the radical-scavenging activity of tea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 2143–2150.
- Yoshioka, H., Sugiura, K., Kawahara, R., Fujita, T., Makino, M., Kamiya, M. and Tsuyumu, S. (1991) Formation of radicals and chemiluminescence during the autoxidation of tea catechins, *Agric. Biol. Chem.*, 55:2717-2723.
- Zimeri, J.; Tong, C. H. Degradation kinetics of (–)-epigallocatechin gallate as a function of pH and dissolved oxygen in a liquid model system. *J. Food Sci.* 1999, 64 (5), 753–758.