ผลของอุณหภูมิ ระยะเวลา และรูปแบบการชงชาที่มีต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิก แทนนิน ฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในชาใบรางแดง (*Ventilago denticulata* Willd.)

Effect of temperature, time and brewing method on phenolic compounds, tannins, flavonoids and antioxidant activity of infusion tea produced from *Ventilago denticulata* Willd.

รวินิภา ศรีมูล[1*] และ ศิริกมล นิยมวรรณ์[2]
Rawinipa Srimoon[1*] and Sirikamol Niyomwan[2]

Received: 10 October 2022 ; **Revised**: 9 November 2022 ; **Accepted**: 24 November 2022

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิน้ำ (70, 80, 90 และ 100 องศาเซลเซียส) เวลาที่ใช้ในการชงชา (1, 3, 5, 10 และ 15 นาที) และรูปแบบของการชงชา (ชาบรรจุซอง ใบชาชงในกา และใบชาชงในถุงกรองชา) ที่มีต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิก แทนนิน ฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในน้ำชาสมุนไพรใบรางแดง (*Ventilago denticulata* Willd.) ผลการศึกษาพบว่า ปริมาณฟีนอลิก แทนนิน ฟลาโวนอยด์ และร้อยละของฤทธิ์ต้านอนุมูลดีพีพีเอชเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิน้ำและเวลาที่ใช้ชงชา โดยมีค่าสูงสุดเมื่อเพิ่มอุณหภูมิน้ำจนถึง 100 องศาเซลเซียส และใช้เวลาชง 10 นาที หลังจาก 10 นาทีไปแล้วปริมาณสารต่างๆ เพิ่มขึ้นเล็กน้อยแต่ไม่มีนัยสำคัญ ($p>0.05$) นอกจากนี้ ชาชงจากซองชาให้ปริมาณสารต่างๆ มากกว่าการชงชาในกาน้ำชาและชาที่ชงด้วยถุงกรองชาอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยที่ศึกษา พบว่าปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระต่างๆ มีความสัมพันธ์กับอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ชง ($r > 0.8$) ผลจากการวิจัยนี้ได้สภาวะที่เหมาะสมในการชงชาสมุนไพรใบรางแดงให้ได้ปริมาณฟีนอลิก แทนนิน ฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด และสามารถนำไปใช้เพื่อศึกษาการยอมรับของผู้บริโภคในแง่ของสี กลิ่น และรสชาติที่มีต่อชาที่ชงในสภาวะดังกล่าวต่อไป

คำสำคัญ: ชาสมุนไพร รางแดง การชงชา ฟีนอลิก ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

Abstract

This study aimed to investigate the effect of brewing temperature (70, 80, 90 and 100 °C), time (1, 3, 5, 10 and 15 minutes) and method of tea infusion (bagged tea, potted tea and filtered tea) on the amount of phenolics, tannins, flavonoids and antioxidant activity in *Ventilago denticulata* Willd. herbal tea. The results revealed that total phenolics, tannins, flavonoids and % antioxidant towards DPPH radical scavenging activity increased significantly with increasing brewing temperature and time, with the maximum value at 100 °C within 10 minutes. After this brewing time, the chemical contents were not significantly different ($p>0.05$). Furthermore, the content of phytochemicals in bagged tea were greater than those of potted and filtered tea ($p<0.05$). Values of Pearson's correlation coefficient suggested that total phenolics, tannins, flavonoids and antioxidant activity were significantly correlated to brewing time and temperature ($r > 0.8$). In conclusion, the results of this study gave the best brewing conditions for *Ventilago denticulata* Willd. herbal tea thereby optimizing the extraction of phenolics, tannins, flavonoids and antioxidant

[1] รองศาสตราจารย์, สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์และเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยีอุตสาหกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก วิทยาเขตจันทบุรี ต.พลวง อ.เขาคิชฌกูฏ จ.จันทบุรี 22210
[1] นักวิชาการศึกษา, สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์และเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยีอุตสาหกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก วิทยาเขตจันทบุรี ต.พลวง อ.เขาคิชฌกูฏ จ.จันทบุรี 22210
[1] Associate Professor, Department of Applied Science and Biotechnology, Faculty of Agro-Industrial Technology, Rajamangala University of Technology Tawan-OK, Chanthaburi Campus, Pluang, Khao Kitchakoot District, Chanthaburi Province, 22210
[1] Science Educator, Department of Applied Science and Biotechnology, Faculty of Agro-Industrial Technology, Rajamangala University of Technology Tawan-OK, Chanthaburi Campus, Pluang, Khao Kitchakoot District, Chanthaburi Province, 22210
* Corresponding author: e-mail: rawinipa_sr@rmutto.ac.th

activity. Consequently, the color and sensory acceptance by consumers under these conditions will be an interesting future study.

Keywords: Herbal Tea, *Ventilago denticulata Willd*., Tea Infusion, Phenolics, Antioxidant Activity

บทนำ

ชาสมุนไพร (Herbal tea) เป็นการนำพืชสมุนไพรมาผ่านกระบวนการคั่วหรือทำให้แห้งเช่นเดียวกับใบชาปกติ แล้วนำไปชงดื่มในน้ำร้อน ชาสมุนไพรเป็นที่นิยมมากในปัจจุบัน เนื่องจากเป็นเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพ จากการศึกษาพบว่าชาสมุนไพรหลายชนิดมีสารต้านอนุมูลอิสระในปริมาณสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งฟีนอลิก (Phenolics) และฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) คาเทชิน (Catechin) ในรูปเอพิคาเทชิน (Epicatechin) เอพิแกลโลคาเทชิน (Epigallocatechin) แกลโลคาเทชิน (Gallocatechin) และเอพิคาเทชินแกลเลต (Epicatechin gallate) เป็นสารฟลาวานอล (Flavanols) ที่จัดอยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์ หรืออาจเรียกอีกอย่างว่านอนไฮโดรไลส์แทนนินหรือคอนเดนส์แทนนิน (Non-hydrolysed tannins/Condensed tannins) สารในกลุ่มคาเทชิน เป็นสารสำคัญที่ส่งผลต่อ สี กลิ่น และรสชาติขมฝาดของชา (Wang *et al*., 2000 ; Pérez-Burillo *et al*., 2018) สารเหล่านี้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ช่วยยับยั้งการเกิดโรคเรื้อรังที่เกิดจากความเสื่อมของเซลล์ ลดโอกาสการเกิดมะเร็ง โรคเบาหวาน โรคหัวใจและหลอดเลือด เป็นต้น (Kumamoto *et al*., 2001 ; ปิยาภัทร ไตรสนธิ, 2560) สรรพคุณของชาสมุนไพรขึ้นกับสารประกอบที่พบในพืชสมุนไพรที่นำมาผลิต ตัวอย่างเช่น ชามินต์ และชาคาร์โมมายล์ มีปริมาณฟลาโวนอยด์สูง ช่วยเสริมภูมิคุ้มกัน กระตุ้นการทำงานของเม็ดเลือดขาว ผ่อนคลายกล้ามเนื้อ ต้านเชื้อแบคทีเรีย ยับยั้งการอักเสบลดการหลั่ง prostaglandin E2 และช่วยให้นอนหลับสบาย (McKay & Blumberg, 2006 ; VeljkoviĆ *et al*., 2013) ชาใบขลู่ (*Pluchea indica* (L.) Less) และชาใบหม่อน (*Morus alba* L.) มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสและแอลฟาอะไมเลส ทำให้ลดการย่อยคาร์โบไฮเดรตและการดูดซึมกลูโคส ช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ (รวินิภา ศรีมูล และคณะ, 2561 ; อนงค์ ศรีโสภา และกาญจนา วงศ์กระจ่าง, 2562) ชาใบมะกรูด ช่วยลดความดันโลหิต มีน้ำมันหอมระเหยช่วยคลายความวิตกกังวลและช่วยในการนอนหลับ (Navarra *et al*., 2015) อย่างไรก็ตาม ปริมาณคาเทชินในชาสมุนไพรขึ้นกับกรรมวิธีการผลิต ชาสมุนไพรที่ผลิตแบบเดียวกับชาขาวและชาเขียวที่ผ่านกระบวนการทำให้แห้งหลายขั้นตอนมีปริมาณคาเทชินน้อยกว่าชาดำและชาแดง ซึ่งผ่านกระบวนการหมักและเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันอย่างเต็มที่ทำให้เกิดสารบางกลุ่มที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้น เช่น สารทีเอฟลาวิน (Teaflavins) ทีอะรูบิจิน (Thearubigin) และ ทีเอไซเนนซิน (Theasinensin) เป็นต้น (Cabrera *et al*., 2003 ; Vuong, 2014)

รางแดง (*Ventilago denticulata* Willd.) เป็นสมุนไพรพื้นบ้านทางภาคกลาง พบมากในตำบลเกาะเกร็ด อำเภอปากเกร็ด จังหวัดนนทบุรี มีฤทธิ์ทางยาคือ ช่วยลดไขมัน ลดความดันโลหิต ลดระดับน้ำตาลในเลือด ขับเสมหะ ช่วยให้เจริญอาหาร แก้ร้อนใน (Faculty of Pharmacy Mahidol University, 1996) จากการศึกษาของ Srimoon *et al.* (2020) พบว่า ในใบรางแดงอบแห้งและคั่วด้วยวิธีเดียวกับการผลิตชาเขียว มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และแทนนิน 88-94 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัม, 63 มิลลิกรัมรูทินต่อกรัม และ 89-91 มิลลิกรัมกรดแทนนิกต่อกรัม ตามลำดับ และมีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH) ได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) ที่ความเข้มข้น 0.03 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเทียบกับสารละลายโทรลอกซ์ เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบของสารที่พบในใบรางแดง พบกรดโปรโทคาเทชูอิก กรดวานิลลิก กรดไซแนปิก กรดเฟอรูลิก กรดแกลลิก เควอร์ซีทิน รูทิน และคาเทชิน นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและแอลฟากลูโคซิเดสที่ค่า IC_{50} 3-4 และ 11-13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ รางแดงถูกนำไปแปรรูปเป็นชาสมุนไพรโดยวิสาหกิจชุมชนที่มีชื่อเสียงในอำเภอเกาะเกร็ดจนได้รับเป็นผลิตภัณฑ์หนึ่งตำบลหนึ่งผลิตภัณฑ์ (OTOP)

อย่างไรก็ตาม ส่วนใหญ่การศึกษาเกี่ยวกับชาสมุนไพรจะศึกษาเกี่ยวกับการพัฒนากระบวนการผลิตใบชาที่ทำให้สารต้านอนุมูลอิสระสูงๆ ลดการสลายตัวของสารสำคัญ แต่ปริมาณสารต่างๆ ที่ผู้บริโภคชาสมุนไพรจะได้รับนอกจากจะขึ้นกับกรรมวิธีการผลิตแล้ว ขั้นตอนการชงชาสำหรับดื่มก็มีส่วนสำคัญที่มีผลต่อปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในน้ำชาด้วย ปัจจัยในการชงชา ได้แก่ อุณหภูมิของน้ำ เวลาในการชงชา ขนาดของใบชา รวมทั้งรูปแบบของการชง นอกจากจะมีผลต่อปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระแล้ว ยังมีผลต่อสี กลิ่น และรสชาติของชาอีกด้วย (Liu *et al*., 2018; Pérez-Burillo *et al*., 2018) ดังนั้น ในการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิน้ำและเวลาที่ใช้ชงชาใบรางแดง และรูปแบบของการชงชา ได้แก่ การชงชาแบบชาซองแช่ในถ้วยชา การชงชาแบบใช้ใบชาชงในกาน้ำชา และการชงชาโดยใช้ถุงกรองชา ที่มีต่อปริมาณฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ แทนนิน และฤทธิ์ต้านอนุมูลดีพีพีเอช รวมทั้งวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยที่ศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการชงชาเพื่อให้ผู้บริโภคได้รับประโยชน์สูงสุดจากการดื่มชาสมุนไพรใบรางแดง

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการศึกษา

1. อุปกรณ์และสารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัยทั้งหมดเป็นเกรดวิเคราะห์ (Analytical reagent grade): กรดแทนนิก (Tannic acid) และรูทิน (Rutin) ของ Alfa Aesar (UK) โทรลอกซ์ (Trolox) ดีพีพีเอช (DPPH หรือ 2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl) และกรดแกลลิก (Gallic acid) ของ Sigma-Aldrich (USA) โซเดียมไนไตรต์ ($NaNO_2$) ของ Univar Ajax Finechem (Australia) Folin-Ciocalteu phenol reagent ของ Loba Chemie (India) โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) และอะลูมิเนียมคลอไรด์ ($AlCl_3$) ของ Univar Ajax Finechem (New Zealand) โพแทสเซียมแอซีเตต (CH_3COOK) ของ Unilab (Australia) เอทานอล (Ethanol) และเมทานอล (Methanol) ของ Merck (Germany) เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ของ Libra S22 Biochrom เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) ของ Consort C3010

2. การออกแบบการทดลอง

ออกแบบการทดลองแบบ 3x4x5 factorial in CRD โดยมีปัจจัยที่ศึกษา 3 ปัจจัย คือ ปัจจัยที่ 1 รูปแบบการชงชา 3 รูปแบบ ได้แก่ การชงชาโดยใช้ชาซองแช่ในถ้วยชา การชงชาโดยนำใบชาชงในกา และการชงโดยใช้ใบชาในถุงกรองชา ปัจจัยที่ 2 อุณหภูมิน้ำที่ใช้ชง 4 ระดับ ได้แก่ 70, 80, 90 และ 100 องศาเซลเซียส และ ปัจจัยที่ 3 เวลาที่ใช้ชง 5 ช่วง ได้แก่ 1, 3, 5, 10 และ 15 นาที รวม 60 ทรีทเมนต์ แต่ละทรีทเมนต์ทำซ้ำ 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่างน้ำชาไปวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ฟลาโวนอยด์รวม แทนนินรวม ฤทธิ์ต้านอนุมูลดีพีพีเอช และวัด pH ของน้ำชา

3. ตัวอย่างชารางแดง

ตัวอย่างใบรางแดงได้มาจากวิสาหกิจชุมชนในตำบลเกาะเกร็ด อำเภอปากเกร็ด จังหวัดนนทบุรี (Figure 1) ใบอ่อนของรางแดงที่ยอด 1-3 ใบ ล้างด้วยน้ำให้สะอาด จากนั้นนำไปเตรียมเป็นใบชาตามวิธีการของ Srimoon *et al.* (2020) โดยลวกใบรางแดงในน้ำเดือดนาน 5 นาที นำไปผึ่งให้แห้ง จากนั้นนำไปคั่วในกระทะที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง นำไปอบอีกครั้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ตัวอย่างใบรางแดงได้รับการระบุชนิดพันธุ์ที่แน่นอนด้วยผู้เชี่ยวชาญด้านพืชและพรรณไม้ Voucher specimens คือ R.SRIMOON 1 และเก็บรักษาไว้ที่สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืชและภูมิทัศน์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก วิทยาเขตจันทบุรี

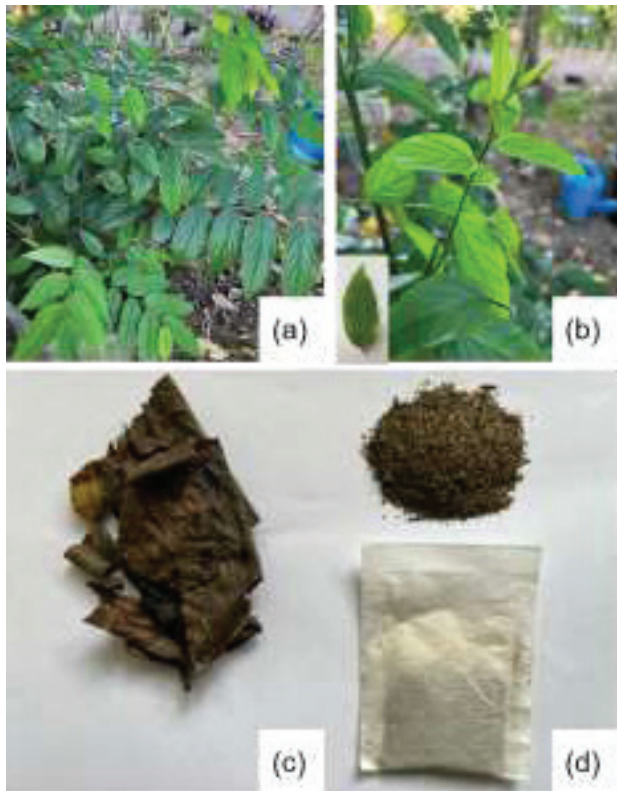

Figure 1 *Ventilago denticulata* Willd.: (a) living tree, (b) young leaves, (c) tea samples for potted tea and filtered tea, (d) blended tea samples for bagged tea

4. การเตรียมตัวอย่างน้ำชา

4.1 การชงชาโดยใช้ชาซอง (Bagged tea)

เตรียมชาชนิดซองโดยบดใบชารางแดงให้ละเอียด ชั่งน้ำหนัก 1.4 กรัม บรรจุลงในซองชาชนิดเยื่อกระดาษขนาด 4x6 เซนติเมตร ซีลปากถุงให้สนิท เตรียมถ้วยเซรามิกส์ซึ่งลวกด้วยน้ำร้อนตามอุณหภูมิที่ต้องการ (70, 80, 90 และ 100 องศาเซลเซียส) นำชาซองที่เตรียมไว้วางลงในถ้วย เทน้ำร้อนอุณหภูมิที่กำหนดลงไป 100 มิลลิลิตร (คิดเป็นร้อยละ 1.4 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) (Figure 2a) เก็บตัวอย่างน้ำชาไปวิเคราะห์ปริมาณต่างๆ ที่เวลา 1, 3, 5, 10 และ 15 นาที ตามลำดับ

4.2 การชงชาโดยใบชาชงในกาน้ำชา (Potted tea)

นำใบชาปริมาณ 1.4 กรัม ใส่ลงในกาเซรามิกส์ซึ่งลวกด้วยน้ำร้อนตามอุณหภูมิที่ต้องการ (70, 80, 90 และ 100 องศาเซลเซียส) เทน้ำร้อนอุณหภูมิที่กำหนดลงไป 100 มิลลิลิตร (Figure 2b) เก็บตัวอย่างน้ำชาไปวิเคราะห์ปริมาณต่างๆ ที่เวลา 1, 3, 5, 10 และ 15 นาที ตามลำดับ

4.3 การชงโดยใบชาในถุงกรองชา (Filtered tea)

เตรียมถ้วยเซรามิกส์ซึ่งลวกด้วยน้ำร้อนตามอุณหภูมิที่ต้องการ (70, 80, 90 และ 100 องศาเซลเซียส) นำใบชาปริมาณ 1.4 กรัม ใส่ในถุงกรองชาที่ทำจากผ้าขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 7 เซนติเมตร ความยาวถุง 12 เซนติเมตร เทน้ำร้อนอุณหภูมิที่กำหนดลงไป 100 มิลลิลิตร โดยเทที่ความสูงประมาณ 20 เซนติเมตรจากถุงกรอง ซึ่งเป็นวิธีทำให้ใบชาตื่นตัว จากนั้นแช่ถุงชาไว้ในถ้วย (Figure 2c) เก็บตัวอย่างน้ำชานอกถุงกรองไปวิเคราะห์ปริมาณต่างๆ ที่เวลา 1, 3, 5, 10 และ 15 นาที ตามลำดับ

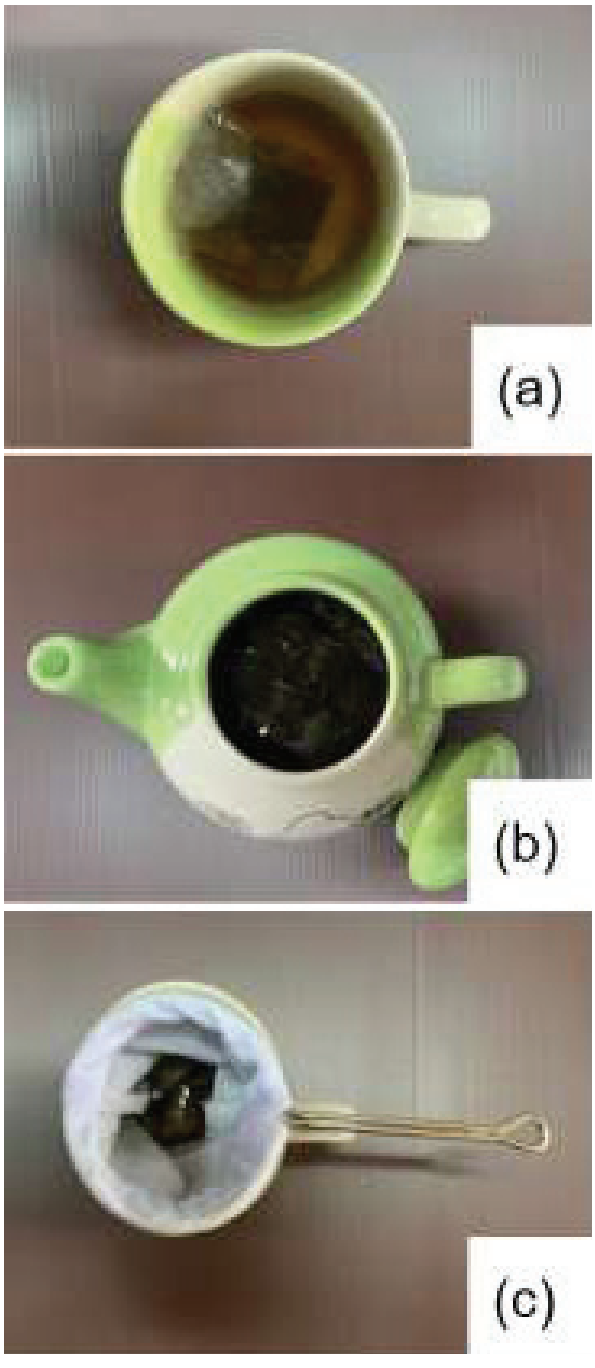

Figure 2 Brewing method: (a) bagged tea, (b) potted tea, (c) filtered tea

5. การวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ

5.1 ปริมาณฟีนอลิกรวม

ปริมาณฟีนอลิกรวมวิเคราะห์ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu ดัดแปลงจาก Wong *et al.* (2006) ผสมตัวอย่างน้ำชา 2 มิลลิลิตร กับสารละลาย Folin-Ciocalteu phenol reagent ร้อยละ 10 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที เติมสารละลาย Na_2CO_3 ร้อยละ 7.5 ลงไป 2 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร คำนวณปริมาณฟีนอลิกรวมในรูปมิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัม (mg GAE/g)

5.2 ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม

ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมใช้วิธีการของ Malla *et al.* (2013) ตัวอย่างน้ำชา 0.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร ตามด้วย $NaNO_2$ ร้อยละ 5 ปริมาตร 0.15 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 6 นาที เติมสารละลาย $AlCl_3$ ร้อยละ 10 ปริมาตร 0.15 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 6 นาที เติม NaOH ร้อยละ 4 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร คำนวณปริมาณฟลาโวนอยด์รวมในรูปของมิลลิกรัมรูทินต่อกรัม (mg RE/g)

5.3 ปริมาณแทนนินรวม

ปริมาณแทนนินรวมวิเคราะห์โดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu ซึ่งดัดแปลงจาก Shad *et al.* (2012) ผสมตัวอย่างน้ำชา 2 มิลลิลิตร กับสารละลาย Folin-Ciocalteu phenol reagent ร้อยละ 10 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที เติมสารละลาย Na_2CO_3 ร้อยละ 7.5 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร คำนวณปริมาณแทนนินรวมในรูปมิลลิกรัมกรดแทนนิกต่อกรัม (mg TE/g)

6. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลดีพีพีเอช

สมบัติในการต้านอนุมูลอิสระในรูปของค่าร้อยละของการกำจัดอนุมูลดีพีพีเอช (%DPPH radical scavenging) ด้วยวิธี DPPH assay ใช้โทรลอกซ์เป็นสารมาตรฐาน ตามวิธีการของ Shimada *et al.* (1992) ผสมสารละลายดีพีพีเอช 0.2 มิลลิโมลาร์ กับตัวอย่างน้ำชา 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ในที่มืดนาน 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร ทำเช่นเดียวกันซ้ำแต่ใช้สารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร คำนวณร้อยละของการยับยั้งอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (%DPPH radical scavenging) จากสมการที่ (1)

$$\%\text{DPPH radical scavenging} = \frac{(A_{ct} - A_{sp})}{A_{ct}} \times 100 \qquad (1)$$

เมื่อ A_{ct} และ A_{sp} คือ ค่าการดูดกลืนแสดงของตัวอย่างควบคุมที่ไม่มีสารสกัด (ใช้น้ำเป็นตัวอย่างควบคุม) และค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างน้ำชา ตามลำดับ

7. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

แต่ละการทดลองทำซ้ำ 3 ซ้ำ รายงานผลในรูปของค่าเฉลี่ย (mean±SD.) วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) ของผลการทดลอง และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแต่ละทรีทเมนต์ด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p<0.05$)

ผลการทดลองและอภิปรายผล

ผลของอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ชง รวมทั้งรูปแบบการชงชาที่มีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิก แทนนิน ฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลดีพีพีเอช แสดงใน Table 1

ผลของอุณหภูมิและเวลาที่ในการชงชา

จากผลการทดลองพบว่า เมื่อเพิ่มอุณหภูมิน้ำที่ใช้ชง ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม แทนนินรวม ฟลาโวนอยด์รวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลดีพีพีเอช มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ปริมาณสารต่างๆ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีค่ามากสุดเมื่อชงด้วยน้ำอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ($p<0.05$) จาก Figure 3 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก แทนนิน และฤทธิ์ต้านอนุมูลดีพีพีเอชเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเพิ่มอุณหภูมิจาก 80 เป็น 90 องศาเซลเซียส ในชาที่ชงโดยใช้ซองชาและชงในกา (เพิ่มขึ้นเฉลี่ยร้อยละ 65.9, 67.2 และ 47.5 ตามลำดับ) ในขณะที่ปริมาณฟลาโวนอยด์เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเมื่อเพิ่มอุณหภูมิจาก 70 เป็น 80 องศาเซลเซียส (เพิ่มขึ้นเฉลี่ยร้อยละ 126.2) สำหรับชาที่ชงด้วยถุงกรองอุณหภูมิน้ำมีผลน้อยกว่าการชงด้วยวิธีอื่น ปริมาณสารต่างๆ ในชาชงด้วยถุงกรองเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนเมื่ออุณหภูมิเพิ่มจาก 70 เป็น 80 องศาเซลเซียส (เพิ่มขึ้นเฉลี่ยร้อยละ 59.4, 62.5, 123.8 และ 47.4 สำหรับสารประกอบฟีนอลิก แทนนิน ฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลดีพีพีเอช ตามลำดับ)

Table 1 Total phenolics, total tannins, total flavonoids and %DPPH radical scavenging activity of *Ventilago denticulata* Willd. herbal tea in different infusion method, time and temperature (n=3)

Infusion method	Compounds	Temperature (°C)	Brewing time (min)				
			1	3	5	10	15
Bagged tea	Total phenolics (mg GAE/g)	70	1.26±0.04^{a,1}	3.12±0.04^{a,2}	5.75±0.07^{a,3}	8.24±0.03^{a,4}	9.37±0.01^{a,5}
		80	1.91±0.02^{b,1}	3.60±0.01^{b,2}	5.89±0.04^{a,3}	9.02±0.03^{b,4}	9.77±0.04^{b,4}
		90	2.84±0.02^{c,1}	7.57±0.03^{c,2}	6.10±0.04^{b,3}	14.47±0.38^{c,4}	15.62±0.22^{c,5}
		100	4.94±0.06^{d,1}	8.35±0.03^{d,2}	14.21±0.11^{c,3}	17.56±0.45^{d,4}	18.45±0.21^{d,5}
	Total tannins (mg TE/g)	70	1.28±0.04^{a,1}	3.16±0.04^{a,2}	6.65±0.09^{a,3}	8.61±0.01^{a,4}	9.48±0.01^{a,5}
		80	1.94±0.03^{b,1}	3.10±0.04^{a,2}	6.61±0.11^{a,3}	9.13±0.03^{b,4}	9.89±0.04^{b,4}
		90	2.87±0.02^{c,1}	6.46±0.27^{b,2}	9.97±0.05^{b,3}	14.90±0.07^{c,4}	15.82±0.22^{c,5}
		100	4.97±0.01^{d,1}	8.46±0.03^{c,2}	14.39±0.11^{c,3}	18.16±0.29^{d,4}	18.96±0.12^{d,4}
	Total flavonoids (mg RE/g)	70	0.68±0.20^{a,1}	1.42±0.05^{a,2}	1.86±0.03^{a,2}	5.97±0.41^{a,3}	11.18±0.09^{a,4}
		80	2.05±0.15^{b,1}	4.36±0.39^{b,2}	4.97±0.25^{b,2}	7.61±0.27^{b,3}	17.95±0.54^{b,4}
		90	1.82±0.26^{b,1}	4.17±.22^{b,2}	10.27±0.32^{c,3}	13.58±0.24^{c,4}	14.74±0.35^{c,5}
		100	4.21±0.08^{c,1}	8.11±0.40^{c,2}	6.03±0.10^{d,3}	13.45±0.38^{c,4}	19.28±0.14^{d,5}
	% DPPH radical scavenging activity	70	11.05±2.56^{a,1}	12.11±0.83^{a,1}	18.22±0.41^{a,2}	38.19±0.68^{a,3}	39.08±1.05^{a,3}
		80	14.81±0.26^{b,1}	12.99±0.83^{a,2}	26.55±0.33^{b,3}	40.26±2.06^{b,4}	45.31±0.86^{b,5}
		90	24.18±0.23^{c,1}	22.56±0.73^{b,2}	34.63±0.30^{c,3}	46.83±1.83^{c,4}	60.41±1.07^{c,5}
		100	34.04±0.20^{d,1}	32.63±0.64^{c,2}	43.13±0.26^{d,3}	53.74±1.59^{d,4}	67.62±0.31^{d,5}

Table 1 Total phenolics, total tannins, total flavonoids and %DPPH radical scavenging activity of *Ventilago denticulata* Willd. herbal tea in different infusion method, time and temperature (n=3) (cont.)

Infusion method	Compounds	Temperature (°C)	Brewing time (min)				
			1	3	5	10	15
Potted tea	Total phenolics (mg GAE/g)	70	1.32±0.06^{a,1}	2.81±0.08^{a,2}	4.92±0.01^{a,3}	6.49±0.14^{a,4}	7.64±0.08^{a,5}
		80	3.38±0.08^{b,1}	4.12±0.03^{b,1}	6.55±0.17^{b,2}	7.09±0.04^{b,2}	9.00±0.18^{b,3}
		90	6.53±0.03^{c,1}	9.93±0.04^{c,2}	10.20±0.07^{c,2}	11.22±0.02^{c,3}	11.62±0.20^{c,3}
		100	7.69±0.15^{d,1}	11.92±0.06^{d,2}	12.85±0.04^{d,3,}	13.84±0.33^{d,4}	15.01±0.02^{d,5}
	Total tannins (mg TE/g)	70	1.42±0.04^{a,1}	2.40±0.03^{a,2}	5.59±0.01^{a,3}	7.06±0.15^{a,4}	8.31±0.09^{a,5}
		80	3.68±0.08^{b,1}	3.96±0.08^{b,1}	7.21±0.02^{b,2}	8.41±0.21^{b,3}	9.79±0.20^{b,4}
		90	7.10±0.03^{c,1}	8.20±0.21^{c,2}	11.10±0.08^{c,3}	12.43±0.23^{c,4}	13.69±0.39^{c,5}
		100	6.18±0.27^{d,1}	11.55±0.09^{d,2}	14.07±0.19^{d,3}	15.27±0.04^{d,4}	16.32±0.24^{d,5}
	Total flavonoids (mg RE/g)	70	0.46±0.11^{a,1}	1.13±0.02^{a,2}	1.63±0.12^{a,2}	4.93±0.02^{a,3}	10.00±0.42^{a,4}
		80	1.37±0.19^{b,1}	3.39±0.36^{b,2}	4.07±0.04^{b,2}	6.30±0.31^{b,3}	12.18±0.56^{b,4}
		90	1.43±0.17^{b,1}	3.07±0.12^{b,2}	6.70±0.02^{c,3}	10.68±0.59^{c,4}	12.51±0.10^{b,5}
		100	2.98±0.02^{c,1}	4.96±0.02^{c,2}	5.10±0.08^{d,2}	9.97±0.15^{c,3}	13.55±0.26^{c,4}
	% DPPH radical scavenging activity	70	9.89±0.83^{a,1}	9.48±0.86^{a,1}	17.00±0.19^{a,2}	31.83±0.69^{a,3}	37.22±1.11^{a,4}
		80	14.52±0.89^{b,1}	15.38±0.88^{b,1}	31.30±1.13^{b,2}	33.36±0.37^{a,3}	43.89±2.20^{b,4}
		90	23.07±0.80^{c,1}	26.15±2.95^{c,2}	41.60±1.96^{c,3}	52.15±4.23^{b,4}	61.39±1.92^{c,5}
		100	24.16±1.21^{c,1}	25.91±0.23^{c,1}	47.76±0.35^{d,2}	58.31±0.16^{c,3}	64.90±0.77^{d,4}
Filtered tea	Total phenolics (mg GAE/g)	70	0.85±0.03^{a,1}	1.02±0.02^{a,1}	3.45±0.01^{a,2}	4.25±.05^{a,3}	4.42±0.02^{a,3}
		80	0.92±0.03^{a,1}	1.03±0.02^{a,1}	3.86±0.03^{b,2}	4.65±0.05^{b,3}	5.01±0.02^{b,3}
		90	1.11±0.07^{a,1}	1.47±.02^{b,1}	4.84±0.05^{c,2}	5.05±0.03^{c,2}	6.09±0.13^{c,3}
		100	1.24±0.03^{a,1}	3.86±.07^{c,2}	5.11±0.01^{c,3}	8.59±0.29^{d,4}	8.99±0.38^{d,4}
	Total tannins (mg TE/g)	70	0.86±0.03^{a,1}	1.03±0.02^{a,1}	3.50±0.02^{a,2}	4.30±0.05^{a,3}	4.48±0.02^{a,3}
		80	0.93±0.03^{a,1}	1.04±0.02^{a,1}	3.91±0.03^{b,2}	4.71±0.05^{b,3}	5.07±0.02^{b,3}
		90	1.13±0.07^{a,1}	1.49±0.02^{a,1}	4.94±0.04^{c,2}	5.34±0.09^{c,2}	6.68±0.16^{c,3}
		100	1.85±0.08^{b,1}	3.61±0.10^{b,2}	5.18±0.01^{c,3}	8.59±0.40^{d,4}	9.33±0.02^{d,5}
	Total flavonoids (mg RE/g)	70	0.29±0.02^{a,1}	0.88±0.07^{a,2}	1.34±0.20^{a,2}	3.81±0.21^{a,3}	7.62±0.45^{a,4}
		80	0.92±0.07^{b,1}	2.75±0.21^{b,2}	3.24±0.25^{b,2}	5.11±0.36^{b,3}	9.26±0.49^{b,4}
		90	1.29±0.10^{b,1}	2.54±0.20^{b,2}	5.31±0.41^{c,3}	9.37±0.23^{c,4}	10.43±0.26^{c,5}
		100	2.48±0.19^{c,1}	4.09±0.32^{c,2}	4.22±0.33^{d,2}	8.54±0.48^{d,3}	11.77±0.31^{d,4}
	% DPPH radical scavenging activity	70	6.37±2.69^{a,1}	10.38±1.87^{a,2}	13.92±0.43^{a,3}	35.17±0.23^{a,4}	36.10±0.44^{a,4}
		80	12.22±0.44^{b,1}	16.69±0.77^{b,2}	20.84±1.09^{b,3}	41.33±0.21^{b,4}	42.17±0.39^{b,4}
		90	21.08±0.39^{c,1}	22.28±0.25^{c,1}	28.83±0.98^{c,2}	37.51±0.36^{c,3}	47.55±0.36^{c,3}
		100	21.87±0.39^{c,1}	23.06±0.25^{c,1}	33.84±0.52^{d,2}	42.51±0.33^{b,3}	51.64±1.12^{d,4}

Different letters indicate statistically significant differences ($p<0.05$) within the same column and the compound

Different superscript numbers indicate statistically significant differences ($p<0.05$) within the same line

% DPPH radical scavenging activity of standard Trolox = 76.81±0.84%

เมื่อเพิ่มเวลาที่ใช้ชงชา ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม แทนนินรวม ฟลาโวนอยด์รวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลดีพีพีเอชมีแนวโน้มสูงขึ้น โดยในช่วง 5 นาทีแรก ปริมาณสารต่างๆ ส่วนใหญ่มีค่าไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) แต่เมื่อใช้เวลาชงชานาน 10 นาที มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) (เฉลี่ยเพิ่มขึ้นร้อยละ 87.3) แต่ไม่แตกต่างจากการชงนาน 15 นาที ($p>0.05$) (เพิ่มขึ้นเฉลี่ยร้อยละ 13.6) เมื่อพิจารณาการชงชาโดยใช้น้ำร้อนอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ชงชาได้ปริมาณสารต่างๆ ออกมามากที่สุด (Figure 4) จะเห็นว่า ปริมาณฟีนอลิก แทนนิน ฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ในน้ำชาที่ชงจากทั้งสามวิธี เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อชงชานาน 5 นาที ขึ้นไป ปริมาณฟีนอลิกและแทนนินมีแนวโน้มคงที่เมื่อเวลาผ่านไป 10 นาที ส่วน ฟลาโวนอยด์และฤทธิ์ต้านอนุมูลดีพีพีเอชมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจนสิ้นสุดการทดลอง อย่างไรก็ตาม ร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระในน้ำชาทุกช่วงเวลาและทุกอุณหภูมิ ก็ยังต่ำกว่าสารมาตรฐานโทรล็อกซ์ (ความสามารถในการต้านอนุมูลดีพีพีเอชเท่ากับร้อยละ 76.81±0.84) แต่ชาที่ชงนานเกินไปแม้จะมีสารต่างๆ ถูกสกัดออกมามากกว่า แต่รสชาติของชาจะขมฝาดกว่าด้วย นอกจากนี้ จากการวิเคราะห์อิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัยด้านอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการชงชา มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) หมายความว่า อุณหภูมิที่แตกต่างกันและเวลาที่ใช้ในการชงชามีผลต่อปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้ในน้ำชารางแดง ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Liu *et al.* (2018) ที่ศึกษาผลของอุณหภูมิและเวลาในการชงชาเขียว พบว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ วิตามินซี น้ำตาล ทีเอนีน เควอร์ซีทิน รูทิน คาเฟอีน และคาเทชิน รวมทั้งฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่วัดด้วยวิธี ORAC เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิและเวลาในการชงชา โดยมีค่าสูงสุดที่เวลา 5.1 นาที งานวิจัยของ Pérez-Burillo *et al.* (2018) ยังพบว่า ปริมาณคาเฟอีนและคาเทชิน และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเอทีบีเอส (ATBS) ในชาขาว มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิน้ำ และมีปริมาณสูงสุดเมื่อชงด้วยน้ำอุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส นาน 7-15 นาที

ทั้งนี้จากการศึกษาปริมาณฟีนอลิกรวม แทนนินรวม ฟลาโวนอยด์รวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลดีพีพีเอชในใบชารางแดงของผู้วิจัยเองซึ่งรายงานไว้ใน Srimoon *et al.* (2020) พบว่า ใบชารางแดงซึ่งสกัดด้วยวิธีดั้งเดิม (Maceration) โดยใช้เอทานอลร้อยละ 70 ในอัตราส่วนตัวอย่างใบชาต่อตัวทำละลายเท่ากับ 1:5 สกัดข้ามคืนซ้ำ 2 ครั้ง พบว่า ใบชารางแดงมีปริมาณฟีนอลิกรวม ฟลาโวนอยด์รวม แทนนินรวม เท่ากับ 88.10-94.25 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัม, 89.34-91.66 มิลลิกรัมกรดแทนนิกต่อกรัม และ 62.57-63.09 มิลลิกรัมรูทินต่อกรัม ตามลำดับ และฤทธิ์ต้านอนุมูลดีพีพีเอชในรูปค่า IC_{50} เท่ากับ 100.38-101.83 มิลลิกรัมโทรลอกซ์ต่อกรัม ใบชารางแดงมีปริมาณสารต่างๆ และฤทธิต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าผลที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้ ทั้งนี้ ก็เนื่องจากความแตกต่างของตัวทำละลายและเวลาที่ใช้สกัด เมื่อนำใบชามาชงแล้วบริโภคน้ำชา ใช้น้ำเป็นตัวทำละลายและใช้เวลาสกัดสั้นกว่า ย่อมได้ปริมาณสารต่างๆ ออกมาจากใบชาน้อยกว่านั่นเอง

ผลของรูปแบบการชงชา

จากการทดลองพบว่า ชารางแดงที่ชงแบบชาซองมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก แทนนิน ฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลดีพีพีเอช สูงกว่าชาที่ชงในกา และชาที่ชงโดยใช้ถุงกรองชา ตามลำดับ ในช่วง 5 นาทีแรกของการชงชา ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและแทนนินในชาซองมีค่าต่ำกว่าในชาที่ชงในกา ร้อยละ 28.6 และ 25.0 ตามลำดับ แต่หลังจาก 5 นาทีไปแล้ว ปริมาณฟีนอลิกและแทนนินในชาซองสูงกว่าการชงในกาประมาณร้อยละ 21.6 และ 11.57 และมากกว่าชงด้วยถุงกรองถึงร้อยละ 143.4 และ 136.1 ตามลำดับ ในขณะที่ปริมาณฟลาโวนอยด์และฤทธิ์ต้านอนุมูลดีพีพีเอชในชาซองสูงกว่าชาชงในกาและชาจากถุงกรอง ร้อยละ 32.6 และ 66.4 สำหรับปริมาณฟลาโวนอยด์ และร้อยละ 14.5 และ 25.8 สำหรับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ตามลำดับ สาเหตุที่ทำให้ปริมาณสารต่างๆ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในชาที่ชงแบบซองมีค่าสูงกว่าการชงชาในกาและการชงชาในถุงกรองชาเนื่องจากผลของขนาดใบชา ชารางแดงที่บรรจุในซองมีการบดใบรางแดงให้มีขนาดเล็กลงเพื่อสามารถบรรจุในซองได้ ในขณะที่ชาที่ชงในกาและในถุงกรองชาใช้ใบชาทั้งใบ เมื่อนำไปชงด้วยน้ำร้อนที่อุณหภูมิต่างๆ ใบชาที่มีขนาดเล็กกว่าจะถูกสกัดสารต่างๆ ออกมาได้มากกว่า ซึ่งเป็นผลมากจากการเพิ่มพื้นที่ผิวของใบชาทำให้สัมผัสกับตัวทำละลาย คือ น้ำร้อน ได้ดีกว่า ผลการศึกษาในครั้งนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Castiglioni *et al.* (2015) ที่ศึกษาผลของขนาดใบชา (*Camellia sinensis*) ที่มีต่อปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งผู้วิจัยได้พบว่า เมื่อบดใบชาให้มีขนาดเล็กลง ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ฟลาโวนอยด์รวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลเอทีบีเอส มีค่าเพิ่มขึ้น 2-4 เท่า เมื่อเทียบกับใบชาทั้งใบที่ไม่ได้นำไปบด และยังให้สี กลิ่น และรสขมฝาดมากกว่าอีกด้วย และยังสอดคล้องกับ Pérez-Burillo *et al.* (2018) ที่พบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเอทีบีเอสในชาขาวชนิดซองมีค่าสูงกว่าชาแบบใบประมาณสองเท่า Yu *et al.* (2021) ก็รายงานเช่นเดียวกันว่า ปริมาณฟีอลิก ฟลาโวนอยด์ คาเฟอีน คาเทชิน และฟลาโวนอล มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อขนาดอนุภาคชาเล็กลง

นอกจากนี้ ปริมาณสารต่างๆ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในน้ำชาที่ชงจากกาน้ำชามีค่าสูงกว่าน้ำชาที่ชงโดยใช้ถุงกรอง ทั้งที่ใช้ใบชาขนาดใหญ่เช่นเดียวกัน อาจเป็นผล

มาจากการที่กาน้ำชาสามารถเก็บความร้อนได้ดีกว่าถุงกรองที่วางไว้ในถ้วยชาและน้ำในกาน้ำชายังสามารถสัมผัสใบชาได้โดยไม่มีตัวขวางกั้น นอกจากนี้ การเก็บตัวอย่างน้ำชาจากถุงกรองจะเก็บน้ำชาที่อยู่นอกถุงกรอง จึงเป็นไปได้ว่าน้ำซึ่งเป็นตัวทำละลายไม่ได้สัมผัสกับใบชาภายในถุงกรองอย่างทั่วถึง และน้ำร้อนที่ใช้ชงเมื่อผ่านการชงที่ต้องเทจากที่สูงและผ่านถุงกรองทำให้น้ำมีอุณหภูมิลดลง ทำให้ปริมาณสารต่าง ๆ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในน้ำชาที่ได้จากการชงด้วยถุงกรองชามีค่าน้อยที่สุด น้ำชาที่ได้จากการชงโดยใช้กาน้ำชาและถุงกรองชา ซึ่งมีขนาดใบชาใหญ่กว่าชาที่ชงที่บรรจุในซองชานั้น หากต้องการให้ได้รับปริมาณฟีนอลิก แทนนิน ฟลาโวนอยด์ รวมถึงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ใกล้เคียงกับน้ำชาที่ชงโดยใช้ชาบรรจุซอง จะต้องชงด้วยน้ำร้อน 100 องศาเซลเซียส ไม่ต่ำกว่า 15 นาที จึงจะได้ปริมาณสารต่าง ๆ สูงขึ้น แม้ว่าจะยังต่ำกว่าปริมาณที่ได้จากน้ำชาที่ชงจากชาบรรจุซองก็ตาม ซึ่งการชงชาโดยใช้เวลานานขนาดนั้นจะทำให้ชามีรสขมและฝาดเกินไปได้

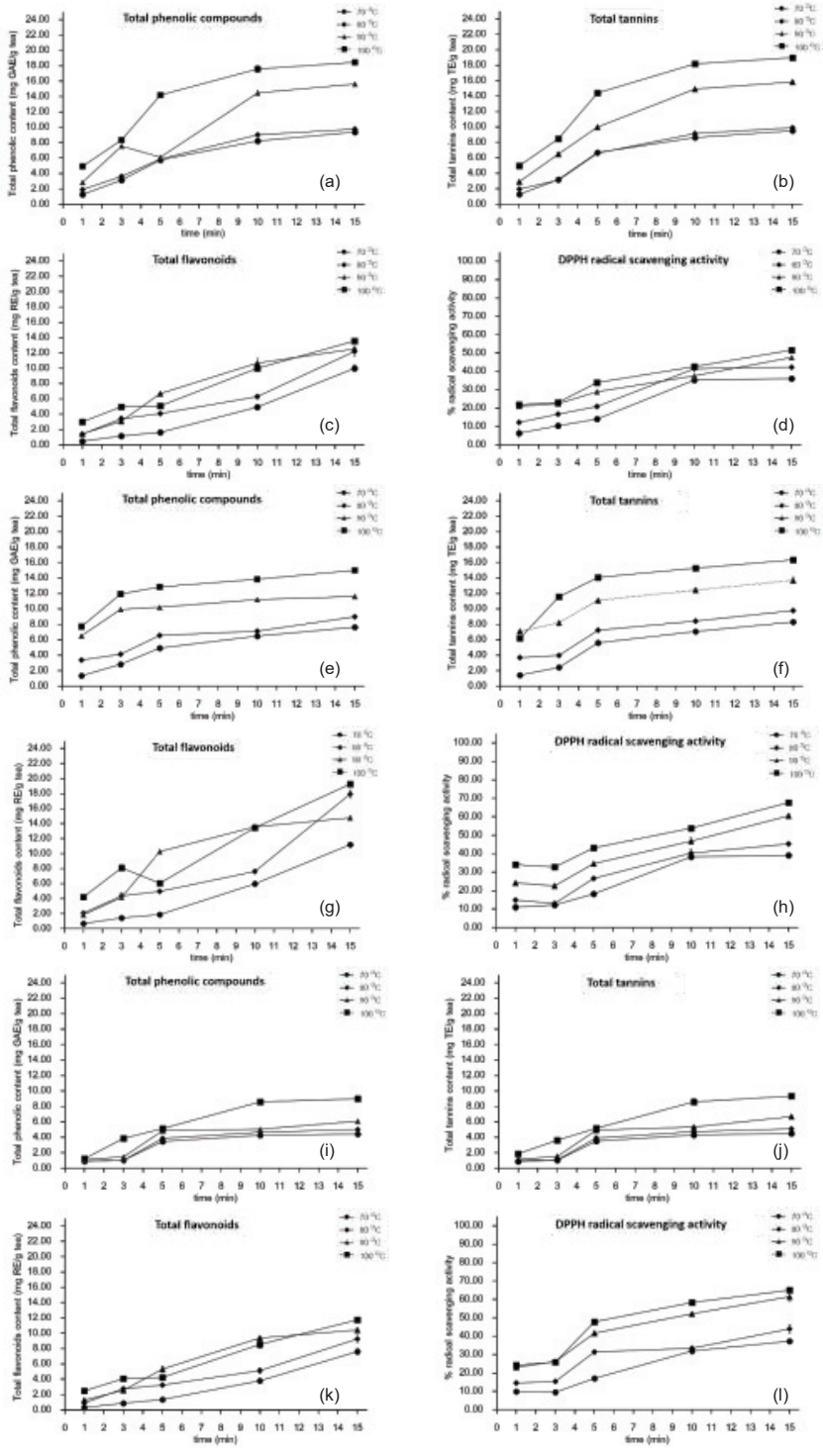

Figure 3 Total phenolics, total tannins, total flavonoids and %DPPH radical scavenging activity in tea in different brewing time and temperature; (a)-(d)=bagged tea, (e)-(h)=potted tea, (i)-(l)=filtered tea

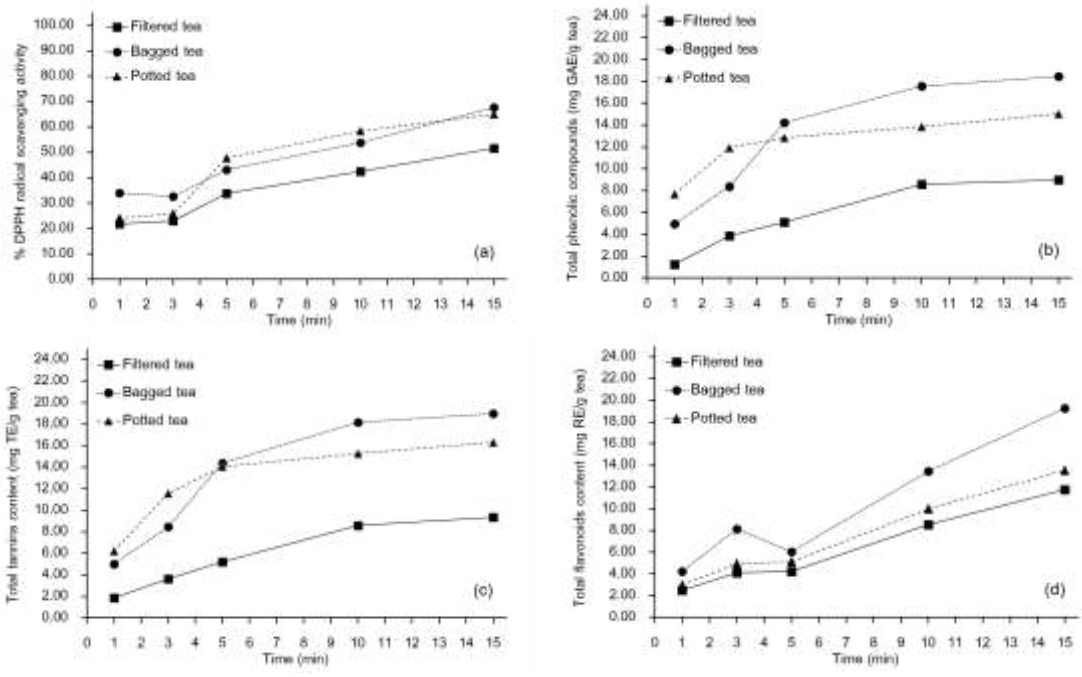

Figure 4 (a) % DPPH radical scavenging activity, (b) total phenolics, (c) total tannins, and (d) total flavonoids, in tea at 100 °C with different brewing time

ความสัมพันธ์ของอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการชงชากับปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการชงชากับปริมาณสารประกอบฟีนอลิก แทนนิน ฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลดีพีพีเอช ใช้สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของ Pearson (Pearson correlation coefficient) ผลเป็นดัง Table 2 ถ้า $1.0 \geq r > 0.8$ แสดงว่ามีความสัมพันธ์กันสูงมาก ถ้า $0.8 \geq r > 0.6$ แสดงว่ามีความสัมพันธ์กันปานกลาง ถ้า $0.6 \geq r > 0.4$ แสดงว่ามีความสัมพันธ์กันเล็กน้อย และถ้า $0.4 \geq r > 0.0$ แสดงว่าไม่มีความสัมพันธ์กัน จากการวิเคราะห์ค่า r แสดงให้เห็นว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก แทนนิน ฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลดีพีพีเอชในน้ำชาที่ชงจากทั้ง 3 วิธี มีความสัมพันธ์กับเวลาที่ใช้ชงสูงมาก ($r > 0.8$) นั่นคือ เมื่อเพิ่มเวลาในการชง ปริมาณสารต่างๆ มีค่าเพิ่มขึ้น ในขณะที่สารประกอบฟีนอลิก แทนนิน และฟลาโวนอยด์ในชาที่ชงทั้ง 3 วิธีมีความสัมพันธ์กับอุณหภูมิที่ใช้ชงสูงมากเช่นกัน ($r > 0.8$) แต่ฤทธิ์ต้านอนุมูลดีพีพีเอชในชาชงแบบซองมีความสัมพันธ์กับอุณหภูมิปานกลาง ($0.8 \geq r > 0.6$) ส่วนชาที่ชงในกาและชาที่ใช้ถุงกรองชามีความสัมพันธ์กับอุณหภูมิเพียงเล็กน้อยเล็กน้อย ($0.6 \geq r > 0.4$)

Table 2 Pearson correlation coefficient of *Ventilago denticulata* Willd. herbal tea with difference infusion method, brewing time and temperature

Infusion method	Total phenolics	Total tannins	Total flavonoids	%DPPH radical scavenging
Relationship among brewing time				
Bagged tea	0.8881	0.8744	0.9127	0.9110
Potted tea	0.8041	0.8442	0.9599	0.9126
filtered tea	0.8086	0.8290	0.9629	0.9450
Relationship among brewing temperature				
Bagged tea	0.9350	0.8856	0.8327	0.6375
Potted tea	0.9296	0.9018	0.9126	0.5584
filtered tea	0.9323	0.8937	0.8727	0.5979

อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการชงต่อ pH ของน้ำชา

จาก Table 3 พบว่า เมื่อเพิ่มอุณหภูมิและเวลาในการชงชา ค่า pH ของน้ำชามีแนวโน้มลดลง โดยมีค่าอยู่ในช่วง 5.74-6.23 โดยน้ำที่นำมาชงชามีค่า pH ตั้งต้นเฉลี่ย 6.81±0.02 เมื่อเพิ่มอุณหภูมิ pH ของน้ำชาที่ได้ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) และที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ค่า pH มีค่าต่ำที่สุด สอดคล้องกับ Akyuz & Yarat (2010) ซึ่งพบว่า ชาสมุนไพรหลายชนิด เช่น ชาสะระแหน่ ชาเปปเปอร์มินต์ ชาเฟนเนลหรือผักชีล้อม และชาคาร์โมไมล์ มีค่า pH ตั้งต้นเฉลี่ย 7.17 เมื่อชงผ่านไปนาน 5 และ 10 นาที ค่า pH ลดลงเหลือ 6.68 และ 6.67 ตามลำดับ แต่ Labbé *et al.* (2006) พบว่า ค่า pH ของน้ำชาเขียวลดลงจาก 5.69 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็น 5.41 ที่ 80 องศาเซลเซียส ($p<0.001$) แต่ค่า pH ไม่แตกต่างกันแม้จะเพิ่มเวลาที่ใช้ชง ($p>0.334$) การที่ค่า pH ของน้ำชาลดลงเนื่องจาก ที่อุณหภูมิสูง สารประกอบฟลาโวนอยด์ที่พบมากในชาและชาสมุนไพร เช่น คาเทชิน สลายตัวได้ง่าย ในโมเลกุลของสารประกอบฟลาโวนอยด์มีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) หลายตำแหน่ง เมื่อสลายตัวจะทำให้ pH ของน้ำชาลดลง (Friedman & Jürgens, 2000)

จากการทดลองยังพบว่า ชาชงจากซองชามีค่า pH ลดลงมากสุด ($p<0.05$) ส่วนชาที่ชงจากถุงกรองชามีค่า pH ลดลงน้อยที่สุด ค่า pH ที่ลดลงนี้มีความสอดคล้องกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิก แทนนิน และฟลาโวนอยด์ในน้ำชาที่ชงแตกต่างกันทั้ง 3 แบบ คือ ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระกลุ่มต่างๆ ในน้ำชาที่ชงจากซองมีค่าสูงสุด รองลงมาคือ ชาที่ชงในกา และชาที่ชงจากถุงกรองชา ตามลำดับ สารต้านอนุมูลอิสระหลายกลุ่มที่พบมากในใบรางแดงมีสมบัติเป็นกรด เช่น กรดโปรโทคาเทชูอิก กรดวานิลลิก กรดไซแนปิก กรดเฟอรูลิก กรดแกลลิก (De Lourdes Reis Giada, 2013) เมื่อสารเหล่านี้ถูกสกัดออกมาได้มากขึ้น จึงไปเพิ่มเป็นความกรดของน้ำชา ทำให้ค่า pH ของน้ำชาลดลง

Table 3 pH value of *Ventilago denticulata* Willd. herbal tea with different infusion method, brewing time and temperature

Temperature (°C)	Infusion method		
	Bagged tea	Potted tea	Filtered tea
70	6.02±0.01^{a,1}	6.07±0.01^{a,2}	6.23±0.01^{a,3}
80	5.76±0.02^{b,1}	5.95±0.02^{a,2}	6.18±0.01^{b,3}
90	5.53±0.06^{c,1}	5.78±0.17^{b,2}	6.13±0.01^{c,3}
100	5.74±0.01^{b,1}	5.79±0.02^{b,2}	6.11±0.01^{d,3}

Different letters indicate statistically significant differences ($p<0.05$) within the same column

Different superscript numbers indicate statistically significant differences ($p<0.05$) within the same line

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก แทนนิน ฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในชาสมุนไพรใบรางแดงขึ้นกับอุณหภูมิน้ำ เวลาที่ใช้ชงชา และรูปแบบของการชงชา ปริมาณสารต่างๆ จะมากขึ้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิน้ำจนถึง 100 องศาเซลเซียส และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นถ้าเพิ่มอุณหภูมิน้ำให้สูงขึ้นอีก และใช้เวลาชงนาน 10 นาที ภายหลังจาก 10 นาทีไปแล้วพบว่าปริมาณสารต่างๆ เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย นอกจากนี้ ชาชงจากซองชาให้ปริมาณสารต่างๆ มากกว่าการชงชาในกาและชาที่ชงด้วยถุงกรองชาที่ใช้ใบชาแช่ทั้งใบ เนื่องจากใบชาที่บรรจุในซองชาต้องมีการบดให้มีขนาดเล็กลงเสียก่อน ทำให้สารต่างๆ ถูกสกัดออกมาได้ดีขึ้น อย่างไรก็ตาม การชงชาไม่จำเป็นต้องใช้น้ำเดือดอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเสมอไป เนื่องจากที่อุณหภูมิสูงมากและชงนาน ชาจะยิ่งมีรสขมฝาด โดยทั่วไปนิยมใช้น้ำที่อุณหภูมิประมาณ 80 องศาเซลเซียส และชงนาน 3-5 นาที แม้ว่าที่สภาวะนี้ปริมาณสารต่างๆ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะต่ำกว่าสภาวะที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ประมาณ 2-3 เท่า (เทียบที่สภาวะการชงชาแบบซอง โดยใช้น้ำร้อนอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ชงนาน 10 นาที กับน้ำร้อนอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ชงนาน 5 นาที) ซึ่งในงานวิจัยนี้ เป็นการหาสภาวะที่เหมาะสมในการชงชาสมุนไพรใบรางแดงให้ได้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก แทนนิน ฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด มิได้มุ่งเน้นการยอมรับของผู้บริโภคในแง่ของสี กลิ่น และรสชาติที่มีต่อชาที่ชงในสภาวะดังกล่าว ดังนั้น จึงเป็นงานวิจัยที่น่าสนใจต่อไป เพื่อให้การบริโภคชาสมุนไพรใบรางแดงได้ทั้งประโยชน์ต่อสุขภาพ และมีรสชาติดี เพิ่มสุนทรียภาพในการดื่มชาของผู้บริโภคไปด้วยพร้อมๆ กัน

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก ผู้วิจัยขอขอบคุณสาขาวิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์และเทคโนโลยีชีวภาพ สำหรับสถานที่ทำการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

ปิยาภัทร ไตรสนธิ. (2560). ชา: เครื่องดื่มเพื่อสุขภาพและสุนทรียภาพ. *อาหาร, 47*(4), 12-18.

รวินิภา ศรีมูล, พิริยาภรณ์ อันอาตม์งาม, และวิทยา คณาวงษ์. (2561). ประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสและแอลฟาอะไมเลสของสารสกัดจากใบชาขลู่ในหลอดทดลอง. *วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก, 11*(1), 1-8.

อนงค์ ศรีโสภา และกาญจนา วงศ์กระจ่าง. (2562). การพัฒนาสูตรชาสมุนไพรใบหม่อนผสมสมุนไพรให้กลิ่นหอมที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านเอนไซม์กลูโคซิเดส. *Thai Journal of Science and Technology, 9*(2), 218-229.

Akyuz, S., & Yarat, A. (2010). The pH and neutralisable acidity of the most-consumed Turkish fruit and herbal teas. *Journal of Oral Health and Dental Management, 10*(2), 75-78.

Cabrera, C., Giménez, R., & López, M. C. (2003). Determination of tea components with antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51*, 4427-4435.

Castiglioni, S., Damiani, E., Astolfi, P., & Carloni, P. (2015). Influence of steeping conditions (time, temperature, and particle size) on antioxidant properties and sensory attributes of some white and green teas. *International Journal of Food Sciences and Nutrition, 66*, 491-497.

De Lourdes Reis Giada, M. (2013). Chapter 4: Food phenolic compounds: main classes, sources and their antioxidant power. In Morales-González, J. A. (Ed.), *Oxidative stress and chronic degenerative disease-A role for antioxidants* (pp. 87-111). InTech Open.

Faculty of Pharmacy Mahidol University. (1996). *Lanna Traditional Herbs*. Amarin Printing and Publishing.

Friedman, M., & Jürgens, H. S. (2000). Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48*, 2101-2110.

Kumamoto, M., Sonda, T., Nagayama, K., & Tabata, M. (2001). Effects of pH and metal ions on antioxidative activities of catechins. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 65*(1), 126-132.

Labbé, D., Tremblay, A., & Bazinet, L. (2006). Effect of brewing temperature and duration on green tea catechin solubilization: basis for production of EGC and EGCG-enriched fractions. *Separation and Purification Technology*, *49*, 1-9.

Liu, Y., Luo, L., Lia, C., Chen, L., Wang, J., & Zeng, L. (2018). Effects of brewing conditions on the phytochemical composition, sensory qualities and antioxidant activity of green tea infusion: a study using response surface methodology. *Food Chemistry, 269,* 24-34.

Malla, M. Y., Sharma, M., Saxena, R. C., Mir, M. I., Mir, A. H., & Bhat, S. H. (2013). Phyto chemical screening and spectroscopic determination of total phenolic and flavonoid contents of *Eclipta Alba* Linn. *Journal of Natural Product and Plant Resources, 3*(2), 86-91.

McKay, D. L., & Blumberg, J. B. (2006). A review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea (*Matricaria recutita* L.). *Phytotherapy Research, 20*, 519-530.

Navarra, M., Mannucci, C., Delbò, M., & Calapai, G. (2015) *Citrus bergamia* essential oil: from basic research to clinical application. *Frontiers in Pharmacology*, *6*, 36-36.

Pérez-Burillo, S., Giméneza, R., Rufián-Henares, J. A., & Pastoriza, S. (2018). Effect of brewing time and temperature on antioxidant capacity and phenols of white tea: relationship with sensory properties. *Food Chemistry, 248,* 111-118**.**

Shad, M. A., Nawaz, H., Rehman, T., Ahmad, H. B., & Hassain, M. (2012). Optimization of extraction efficiency of tannins from Cichorium intybus L: application of response surface methodology. *Journal of Medicinal Plants Research, 28*, 4467-4474.

Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K., & Nakamura, T. (1992). Antioxidative properties of xanthans on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 40*(6), 945-948.

Srimoon, R., Anartgnam, P., & Tilarux, P. (2020). *In vitro* inhibitory efficiency of *Ventilago denticulata* Willd. dried leaves extract on alpha-glucosidase, alpha-amylase and lipase and antioxidant activities. *Science & Technology Asia, 25*(4), 135-149.

VeljkoviĆ, J. N., PavloviĆ, A. N., MitiĆ, S. S., TošiĆ, S. B., StojanoviĆ, G. S., KaliČanin, B. M., StankoviĆ, D. M., StojkoviĆ, M. B., MitiĆ, M. N., & BrcanoviĆ, J. M. (2013). Evaluation of individual phenolic compounds and antioxidant properties of black, green, herbal and fruit tea infusions consumed in Serbia: spectrophotometrical and electrochemical approaches. *Journal of Food and Nutrition Research, 52*(1), 12-24.

Vuong, Q.V. (2014). Epidemiological evidence linking tea consumption to human health: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 54,* 523-536.

Wang, H., Provan, G. J., & Helliwell, K. (2000). Tea flavonoids: their functions, utilization and analysis. *Trends in Food Science & Technology*, *11*, 152-160.

Wong, S. P., Leong, L. P., & Koh, J. H. W. (2006). Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. *Food Chemistry, 99*, 775-783.

Yu, J., Liu, Y., Zhang, S., Luo, L., & Zeng, L. (2021). Effect of brewing conditions on phytochemicals and sensory profiles of black tea infusions: a primary study on the effects of geraniol and β-ionone on taste perception of black tea infusions. *Food Chemistry, 354,* 129504.