การเปรียบเทียบปริมาณฟลูออไรด์และคาเทชินในสารสกัดชาเขียว ตามแต่ละพื้นที่ในประเทศไทย

ภาณุพงศ์ กุลรัตน์ ท.บ.*, นงนภัส ดวงดี วท.บ., วท.ม., Dr.rer.nat**, นพมาศ ศุภรพันธ์ ท.บ., MSD. *, เอศเธระ ประทีปทองคำ ท.บ., ว.ท., Dr.med.dent.*
* สถาบันทันตกรรม กรมการแพทย์ ตำบลตลาดขวัญ อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี 11000
** ศูนย์วิจัยค้นคว้าและพัฒนายา สำนักงานวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีชั้นสูง มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ (ศูนย์รังสิต) ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

Abstract: Comparison of Fluoride and Catechin Levels in Green Tea Extract at Various Geographical Locations in Thailand

Kulrath P*, Duangdee N**, Supornpun N*, Prateeptongkum E*
* Institute of Dentistry, Department of Medical Services, Talad Khwan, Mueang, Nonthaburi, 11000
** Drug Discovery and Development Center, Office of Advanced Science and Technology, Thammasat University (Rangsit campus), Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani, 12120
(E-Mail: salasuang@gmail.com)
(Received: November 28, 2018; Revised: November 29, 2018; Accepted: January 25, 2019)

Fluoride and catechin are essential compounds for dental caries prevention which commonly found in green tea *(Camellia sinensis).* However, their quantitative levels depend on geographical locations. This research aimed to determine the content of fluoride and epigallocatechin gallate (EGCG) as a type of catechin, and also identify the suitable method for green tea extraction. The green tea products were collected from each province in Thailand. After dissolution 1 g of the dried green tea in 100 mL of boiled water, the fluoride ion concentrations were measured by ion selective electrode (ISE). In addition, the active component EGCG was observed by high-performance liquid chromatography (HPLC) after 70% methanol extraction. The results showed that fluoride content in the green tea from each province in Thailand was significantly different (p=0.01) with the concentrations from 0.14-0.99 ppm. EGCG content was also statistically different (p=0.00). The highest and lowest amount of EGCG were 99.99 mg/g and 33.25 mg/g, respectively. EGCG concentration extracted with 70% methanol was obtained the highest extract yield. In conclusion, fluoride and EGCG levels in each area of Thailand were different. According to the previous studies, the amount of fluoride in Thai green tea was possibly enough for remineralization on the teeth. Moreover, EGCG concentration in 30 minutes of brewing groups in the present study may represent the anti-cariogenic properties.
Keywords: Green tea, *Camellia sinensis,* Fluoride, Anti-cariogenic

บทคัดย่อ

ฟลูออไรด์และสารกลุ่มคาเทชินเป็นหนึ่งในองค์ประกอบสำคัญที่ช่วยในการป้องกันฟันผุและส่งเสริมสุขภาพช่องปากซึ่งพบได้มากในชาเขียว *(Camellia sinensis)* อย่างไรก็ตามปริมาณของฟลูออไรด์และสารกลุ่มคาเทชินที่พบนั้นจะแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับลักษณะทางภูมิศาสตร์และสภาพภูมิอากาศ งานวิจัยนี้จัดทำเพื่อเปรียบเทียบปริมาณฟลูออไรด์และอีพิกัลโลคาเทชินกัลเลต (Epigallocatechin gallate, EGCG) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของสารกลุ่มคาเทชินตามแต่ละพื้นที่ รวมถึงหาวิธีการสกัดสารสำคัญจากชาเขียวที่เหมาะสม โดยทำการสุ่มตัวอย่างผลิตภัณฑ์ชาเขียวเพื่อเป็นตัวแทนแต่ละจังหวัดในประเทศไทย นำมาวิเคราะห์หาปริมาณฟลูออไรด์ด้วยวิธีฟลูออไรด์ซีเลคทีฟอิเล็กโทรด (fluoride ion selective electrode, F-ISE) วัดสารละลายชาเขียวที่ปริมาณ 1 g ละลายในน้ำ 100 mL ในรูปแบบการต้มเพื่อจำลองลักษณะการดื่มชาเขียวปกติ สำหรับการหาปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญ EGCG นั้น ใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high-performance liquid chromatography, HPLC) หลังจากที่ทำการสกัดด้วยตัวทำละลาย 70% เมทานอล และสกัดด้วยน้ำร้อนเพื่อดูปริมาณจากการดื่มปกติ ผลที่พบคือปริมาณฟลูออไรด์ในชาเขียวจากแต่ละแหล่งปลูกในประเทศไทยมีระดับที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.01) โดยมีความเข้มข้นตั้งแต่ 0.14-0.99 ppm ทั้งนี้ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างแหล่งปลูกกับปริมาณฟลูออไรด์ที่กระจายในน้ำบาดาล รวมถึงพันธุ์ที่ใช้ในการปลูก นอกจากนี้ปริมาณ EGCG ในแต่ละแหล่งปลูกนั้นมีความแตกต่างกันไปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.00) ปริมาณสูงสุดอยู่ที่ 99.99 mg/g และต่ำสุดอยู่ที่ 33.25 mg/g พบสภาวะการสกัดด้วยตัวทำละลาย 70% เมทานอลให้ค่าการสกัดสูงสุด ทั้งนี้ปริมาณฟลูออไรด์และ EGCG ในแต่ละแหล่งปลูกมีระดับที่แตกต่างกันออกไป โดยปริมาณฟลูออไรด์ในรูปแบบการดื่มปกติแนวโน้มมีปริมาณมากเพียงพอที่จะช่วยทำให้เกิดการคืนกลับแร่ธาตุบนผิวฟันได้ ส่วนปริมาณ EGCG นั้นพบว่าหากต้มที่ระยะเวลา 30 นาที ปริมาณ EGCG มีเพียงพอให้ฤทธิ์ในการต่อต้านการเกิดฟันผุได้เมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นในการทดลองทางห้องปฏิบัติการจากการศึกษาก่อนหน้า
คำสำคัญ: ชาเขียว คาเมเลีย ไซเนนซิส ฟลูออไรด์ การต้านฟันผุ

บทนำ

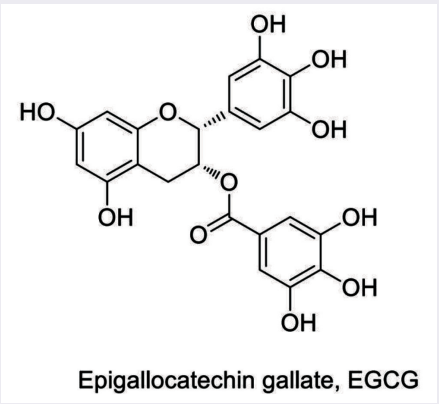
สถานการณ์โรคฟันผุในปัจจุบันยังถือว่าเป็นปัญหาที่สำคัญต่อสุขภาพโดยรวมของคนทั่วโลกที่ได้รับผลกระทบจากโรคฟันผุ รวมถึงมีการสูญเสียฟันที่เป็นสาเหตุจากฟันผุในกลุ่มผู้ใหญ่[1] และเมื่อดูในกลุ่มประเทศที่กำลังพัฒนายังคงมีปัญหาโรคฟันผุอยู่ เนื่องจากประชากรเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมการบริโภคอาหารจากผักและผลไม้เป็นการบริโภค

อาหารจำพวกแป้งและน้ำตาลเพิ่มมากขึ้น รวมถึงขาดการดูแลและการรักษาทางสุขภาพช่องปากที่ดี มีผลทำให้ค่าเฉลี่ยฟันผุ ถอน อุด (decayed, missing and filled teeth, DMFT) ในกลุ่มประเทศกำลังพัฒนานี้มีแนวโน้มสูงขึ้น[2] ถึงแม้สถานการณ์โรคฟันผุในประเทศไทยจากการสำรวจทันตสุขภาพแห่งชาติครั้งนี้เป็นครั้งที่ 8 ดำเนินการเก็บข้อมูลในปี 2560 จัดทำขึ้นโดยกรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุขพบว่าสุขภาพช่องปากของคนไทยใกล้เคียงเดิมในแต่ละกลุ่มอายุแต่ยังควรส่งเสริมป้องกันควบคุมโรคอย่างต่อเนื่องเพราะยังคงมีปัจจัยเสี่ยงต่างๆ ที่ทำให้เกิดฟันผุอยู่[3]

กระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคฟันผุประกอบด้วย กระบวนการสลายแร่ธาตุ (demineralization) และกระบวนการคืนกลับแร่ธาตุ (remineralization) ซึ่งเมื่อใดก็ตามที่มีกระบวนการสลายแร่ธาตุมากกว่ากระบวนการคืนกลับแร่ธาตุจะก่อให้เกิดการทำลายฟันและเกิดเป็นรอยโรคฟันผุตามมา โดยปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดโรคฟันผุ นั้นประกอบด้วยฟัน (sound tooth) เชื้อจุลชีพก่อโรคฟันผุ (cariogenic flora) ได้แก่ เชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ *(Streptococcus mutans, S.mutans)* เชื้อสเตรปโตคอคคัส ซอบรินัส *(Streptococcus sobrinus, S. sobrinus)* และอาหาร (diet)[4-5]

ปัจจุบันมีการพัฒนาสารสังเคราะห์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรคฟันผุ เช่น ไตรโคลซาน (Triclosan), คลอเฮกซิดีน (Chlorhexidine), และเซทิลไพริดิเนียมคลอไรด์ (Cetylpyridinium chloride) เป็นต้น ซึ่งสารเหล่านี้รบกวนการยึดเกาะของแบคทีเรียกับผิวฟันทำให้ลดการเกิดคราบจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุโรคฟันผุในช่องปาก แต่ต่างก็มีผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์ร่วมด้วย เช่น อาการแสบร้อน เกิดคราบสีบนตัวฟัน (staining) คลื่นไส้อาเจียน[6] และเมื่อใช้เป็นระยะเวลานานอาจส่งผลให้เชื้อดื้อต่อสารดังกล่าวได้อีกด้วย[7] ดังนั้นการค้นคว้าและศึกษาหาสารชนิดใหม่ที่สามารถหาได้ง่ายจากธรรมชาติที่มีประสิทธิภาพและมีผลข้างเคียงน้อยจึงเป็นเรื่องที่มีความสำคัญ

สารสกัดคาเทชินพบมากในชาเขียวมีองค์ประกอบสำคัญคืออีพิกัลโลคาเทชินกัลเลต (Epigallocatechin gallate, EGCG) มีลักษณะโครงสร้าง (ภาพที่ 1) พบได้ในพืชตระกูลคาเมเลีย ไซเนนซิส *(Camellia sinensis)* โดยชาเป็นพืชที่ปลูกมาอย่างยาวนาน บางแหล่งอ้างอิงว่าเริ่มมาจากจีนและอินเดียในช่วงแรกโดยใช้เป็นเครื่องดื่มและยา[8] สำหรับการปลูกชาในประเทศไทยนั้นแหล่งปลูกส่วนมากจะอยู่ตามภูเขาทางภาคเหนือของประเทศ โดยจะกระจายอยู่ในหลายจังหวัดได้แก่ เชียงใหม่ เชียงราย แม่ฮ่องสอน แพร่ น่าน ลำปาง ตากและนราธิวาส[9]



Epigallocatechin gallate, EGCG

ภาพที่ 1 ลักษณะโครงสร้างสาร EGCG

องค์ประกอบของชามีผลช่วยในการลดการเกิดฟันผุจากงานวิจัยทั้งในมนุษย์และสัตว์ทดลอง เนื่องจากพบองค์ประกอบในส่วนของฟลูออไรด์และคาเทชินโดยที่ปริมาณสารทั้งสองชนิดจะแตกต่างกันไปตามแต่ละแหล่งขึ้นอยู่กับสภาพแหล่งปลูกและภูมิอากาศ[10- 11] และพบว่าคาเทชินสามารถช่วยในการยับยั้งการเจริญเติบโต การสังเคราะห์กลูแคน (Glucan synthesis) และการสร้างแผ่นคราบจุลินทรีย์บนผิวฟัน (dental plaque) ของเชื้อ *S.mutans* โดยขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารละลาย[8, 12] นอกจากนี้ คาเทชินยังช่วยเพิ่มการต้านทานต่อกรด (acid resistance) ที่ผิวฟัน และจะยิ่งต้านทานได้สูงขึ้นเมื่อผสมร่วมกับฟลูออไรด์[13-14]

บทความนี้เป็นการนำเสนอการศึกษาเพื่อวิเคราะห์เชิงเปรียบเทียบปริมาณของสารสำคัญฟลูออไรด์และคาเทชินที่มีความหลากหลายตามแต่ละพื้นที่ปลูกโดยอาศัยหลักการที่ว่าไม่มีสารสมุนไพรใดที่มีองค์ประกอบและปริมาณสารที่เหมือนกันทุกอย่าง ผลการตรวจสอบจะเป็นลักษณะเฉพาะตัวเปรียบเทียบเสมือนลายพิมพ์นิ้วมือ (fingerprint) ของสารนั้นๆ รวมถึงการหาวิธีการสกัดที่เหมาะสมเพื่อให้ได้ปริมาณความเข้มข้นสารที่เพียงพอนั้นมีความสำคัญ ซึ่งสามารถนำข้อมูลที่ได้มาพิจารณาถึงประสิทธิภาพในการป้องกันฟันผุของชาเขียวที่พบในประเทศไทย ไปจนถึงนำข้อมูลทั้งแหล่งปลูกที่ให้ปริมาณสารสำคัญมากที่สุดและขั้นตอนที่เหมาะสมในการสกัดนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ทางเลือกใหม่ได้ต่อไปในอนาคต

วัตถุและวิธีการ

ผลิตภัณฑ์ชาเขียวสำเร็จรูป จากแหล่งสหกรณ์ร้านค้าหนึ่งผลิตภัณฑ์หนึ่งตำบลของจังหวัดที่เชียงใหม่ เชียงราย แม่ฮ่องสอน แพร่ น่าน ลำปาง ตาก และนราธิวาสอย่างละ 1 ตัวอย่าง จากการสุ่มจากรายชื่อผลิตภัณฑ์เป็นตัวแทนแต่ละจังหวัด หากไม่สามารถหาได้เลือกจากแหล่งใกล้เคียงในจังหวัดเดียวกันเป็นตัวอย่างแทน ทั้งนี้ผลิตภัณฑ์ผลิตในช่วงระหว่างวันที่ 1 มีนาคม ถึง 1 มิถุนายน 2561 หรือไม่เกิน 3 เดือนนับจากวันที่ทำการทดลอง และเลือกผลิตภัณฑ์ชาเขียวจากประเทศจีน 1 ตัวอย่างเพื่อเป็นตัวเปรียบเทียบ

การวิเคราะห์หาปริมาณฟลูออไรด์

สารมาตรฐานและสารเคมี

สารมาตรฐาน: โซเดียมฟลูออไรด์ ความบริสุทธิ์ไม่น้อยกว่า 99% ผลิตภัณฑ์ของ Loba chemie

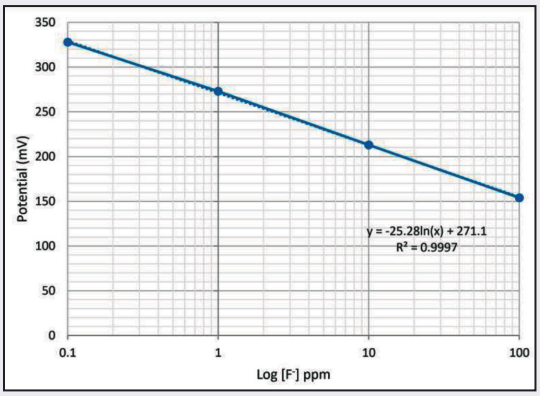
สารเคมี: สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับปรับความแรงไอออน (total ionic strength adjuster buffer II, TISAB II), น้ำปราศจากอิออน (deionized water)

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องวัดปริมาณไอออน: รุ่น Bante 930 Benchtop pH/Ion Meter และฟลูออไรด์ไอออนซีเล็คทีฟอิเล็กโทรด รุ่น F-US Fluoride Electrode ผลิตภัณฑ์ของ Bante instruments, เครื่องชั่งเชิงวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ของ Mettler

การเตรียมสารละลายและกราฟมาตรฐาน

เตรียมสารละลายฟลูออไรด์มาตรฐาน 1,000 ppm โดยชั่งโซเดียมฟลูออไรด์ 2.210 g ละลายในน้ำปราศจากไอออนที่ปริมาตร 1,000 mL แล้วเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 100, 10, 1, 0.1 ppm นำมาวิเคราะห์เพื่อให้ได้กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างปริมาณฟลูออไรด์และค่าความต่างศักย์เป็นการยืนยันความถูกต้องในการวัดและใช้คำนวณค่าในสมการเพื่อหาความเข้มข้นของสารตัวอย่างจากค่าความต่างศักย์ที่วัดได้ (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณฟลูออไรด์ที่ความเข้มข้นสารมาตรฐานและค่าความต่างศักย์ มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 0.9997

การวิเคราะห์ปริมาณฟลูออไรด์ในชาเขียวแต่ละแหล่งปลูก

นำชาแต่ละชนิดที่ปริมาณ 1 g ละลายในน้ำปราศจากไอออน 100 mL ที่อุณหภูมิจุดเดือดในขวดก้นกลมและรักษาอุณหภูมิไว้ให้อยู่ในช่วง 89 ถึง 92°C และเมื่อเวลาผ่านไป 5 นาที นำสารละลายปริมาณ 5 mL ละลายกับสารละลาย TISABII 5 mL เพื่อปรับความแรงไอออน คงสภาวะสารละลายอยู่ที่ pH 5.2 และนำมาวัดปริมาณฟลูออไรด์ ทำขั้นตอนซ้ำ 3 ครั้งของแต่ละชนิดชาและบันทึกข้อมูลค่าความต่างศักย์ที่ได้เทียบกราฟมาตรฐาน[15]

การวิเคราะห์หาปริมาณ EGCG

สารมาตรฐานและสารเคมี

สารมาตรฐาน: EGCG ความบริสุทธิ์ไม่น้อยกว่าร้อยละ 98.0 ผลิตภัณฑ์ของ Tokyo chemical

สารเคมี: เมทานอล เอทานอล และกรดแอซีติก ระดับความบริสุทธิ์ HPLC ผลิตภัณฑ์ของ RCI labscan, น้ำปราศจากอิออน (deionized water)

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่อง HPLC ผลิตภัณฑ์ของ Agilent รุ่น 1260 โดยใช้คอลัมน์ BDS Hypersil C18 ผลิตภัณฑ์ของ Thermo Fisher Scientific, เครื่องระเหยสูญญากาศแบบหมุน ผลิตภัณฑ์ของ Heidolph, อ่างควบคุมอุณหภูมิความถี่สูง ผลิตภัณฑ์ของ Bandelin, เครื่องชั่งเชิงวิเคราะห์ 5 ตำแหน่ง ผลิตภัณฑ์ของ Mettler

สภาวะของเครื่อง HPLC

Column: BDS Hypersil C18 ขนาด 250 mm X 4.6 mm 1.D., 5 µm

Mobile phase: (A) 0.5% acetic acid, (B) methanol

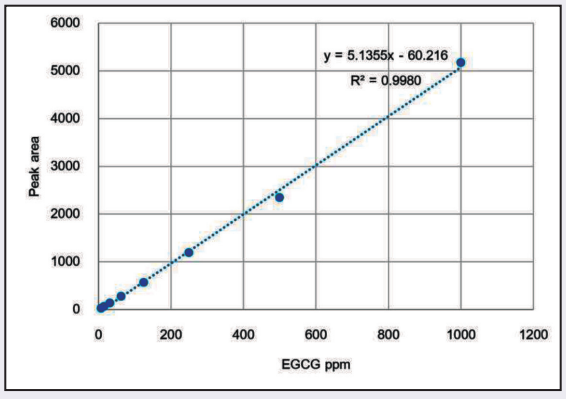
Gradient elution:

Time	0	70	80	80.01	90
%A	100	0	0	100	100
%B	0	100	100	0	0

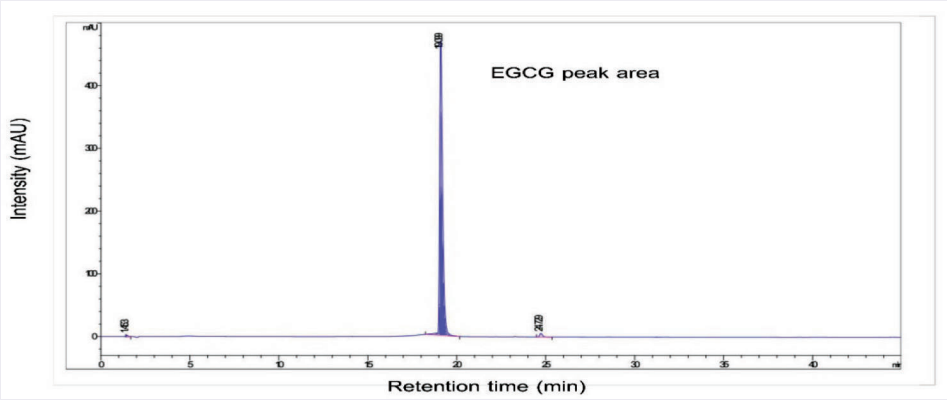
Column temp: 25 °C, Detection: 254 nm, Flow rate: 1 mL/min, Injection volume: 10 µL

การเตรียมสารละลายและกราฟมาตรฐาน

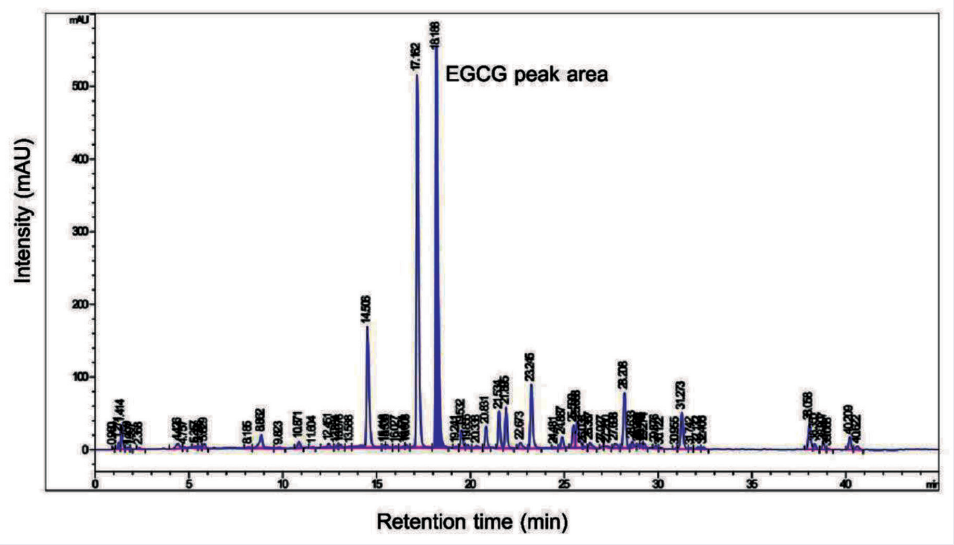
เตรียมสารละลายมาตรฐาน EGCG ที่ความเข้มข้น 1,000 ppm ละลายในสารละลาย 50% เมทานอล ทำการปรับการเจือจางที่ความเข้มข้น 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62 และ 7.81 ppm นำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญด้วย HPLC เพื่อให้ได้กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างความเข้มข้นสารมาตรฐาน EGCG และพื้นที่ใต้พีคจาก HPLC โครมาโตแกรม (chromatogram) เป็นการยืนยันความถูกต้องในการวัดและใช้คำนวณค่าในสมการเพื่อหาความเข้มข้น EGCG ของสารตัวอย่างจากพื้นที่ใต้พีคที่หาได้ (ภาพที่ 3) หารีเทนชันไทม์ (retention time) เป็นการยืนยันเอกลักษณ์ของสาร EGCG มาตรฐาน (ภาพที่ 4) และนำ retention time ที่ได้มาเทียบกับ HPLC chromatogram สารตัวอย่างที่ช่วงเวลาใกล้เคียงกันเพื่อหาปริมาณ EGCG (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 3 กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณ EGCG ที่ความเข้มข้นสารมาตรฐานและพื้นที่ใต้พีคของ HPLC chromatogram มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R2) เท่ากับ 0.9980



ภาพที่ 4 HPLC chromatogram และพื้นที่ใต้พีคตัวอย่างสารมาตรฐาน EGCG ที่ความเข้มข้น 1,000 ppm มี retention time แสดงลักษณะเอกลักษณ์ของ EGCG ที่เวลา 19.01 นาที และพื้นที่ใต้พีค



ภาพที่ 5 HPLC chromatogram ตัวอย่างสารสกัดชาเขียวด้วย 70% เมทานอล มี retention time แสดงลักษณะเอกลักษณ์ของ EGCG ใกล้เคียงที่เวลา 18.18 นาที และพื้นที่ใต้พีค

การวิเคราะห์ปริมาณ EGCG ในแต่ละแหล่งปลูก

ทำการทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาสภาวะการสกัดที่เหมาะสมโดยเลือกตัวอย่าง 1 จังหวัด นำตัวอย่าง 400 mg ใส่ลงในขวดแก้ว สกัดด้วยตัวทำละลายที่ต้องการทดสอบที่ปริมาตร 10 mL ปิดด้วยกระดาษฟอยล์ตั้งไว้บนอ่างควบคุมอุณหภูมิความถี่สูง ที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 15 นาที กรองเพื่อเอากากชาออกด้วยสำลี นำสารสกัดของเหลวที่ได้มาระเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่องกลั่นระเหยระบบสุญญากาศแบบหมุน เมื่อตัวทำละลายระเหยหมด ทำการชั่งน้ำหนักสารสกัดที่ได้และนำสารสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญด้วย HPLC ขั้นตอนการหาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดโดยใช้น้ำปราศจากอิออน, เอทานอลและเมทานอลที่ความเข้มข้น 50%, 70% และ 100%

ใช้ตัวทำละลายที่ให้ค่าสูงสุดในการทดสอบเบื้องต้นนำมาเปรียบเทียบปริมาณ EGCG ในแต่ละแหล่งปลูกโดยใช้วิธีการสกัดเช่นเดิมทำซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นเมื่อได้ตัวอย่างที่ให้ค่าปริมาณ EGCG มากที่สุด นำมาสกัดด้วยน้ำปริมาณ 100 mL ที่ปริมาณ 1 g ในอุณหภูมิจุดเดือดและรักษาอุณหภูมิไว้ให้อยู่ในช่วงประมาณ 90°C ทำการวัดค่าตามวิธีข้างต้นที่เวลา 5, 15 และ 30 นาที เพื่อวัดปริมาณ EGCG ที่ได้ในรูปแบบการดื่มแต่ละช่วงเวลาการต้ม

นำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยปริมาณฟลูออไรด์และคาเทชินในแต่ละกลุ่มโดยใช้สถิติ One-Way ANOVA หรือ Kruskal Wallis กรณีข้อมูลไม่แจกแจงปกติ

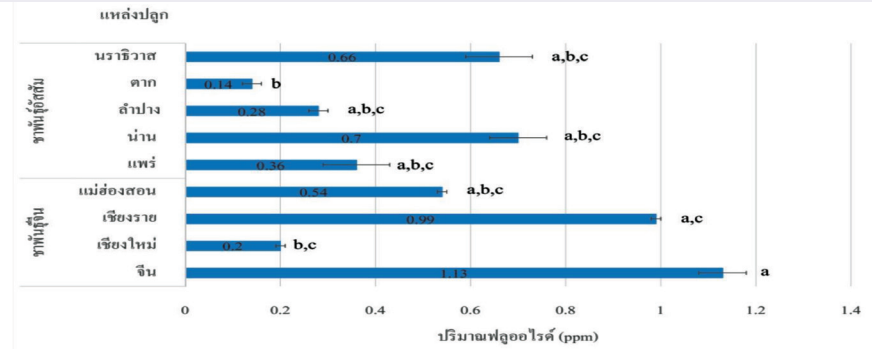
ผล

ชนิดของพันธุ์ชาเขียวที่ได้ แบ่งได้เป็น 2 สายพันธุ์หลัก ได้แก่ กลุ่มชาพันธุ์อัสสัม (Assam tea) กลุ่มนี้มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Camellia sinensis var. assamica* จากจังหวัดแพร่ น่าน ลำปาง ตาก นราธิวาส ลักษณะจะเป็นลำต้นเดี่ยว ต้นใหญ่ ใบเดียวขนาดใหญ่หรือเรียกว่าชาเมี่ยง อีกกลุ่มคือชาพันธุ์จีน (Chinese tea) กลุ่มนี้มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Camellia sinensis var. sinensis* จากจังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย แม่ฮ่องสอน ลักษณะลำต้นเป็นพุ่มเตี้ยสูง ใบมีลักษณะเล็กสีเขียวเข้ม โดยผลิตภัณฑ์ชาเขียวในแต่ละจังหวัดสามารถหาได้ (ตารางที่ 1) ยกเว้นในจังหวัดตากซึ่งไม่มีผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจำหน่ายจึงใช้ตัวอย่างจากการเก็บนำมาวิเคราะห์แทน

ตารางที่ 1 ข้อมูลทั่วไปผลิตภัณฑ์ชาเขียวในประเทศไทยในแต่ละจังหวัดแบ่งตามชนิดพันธุ์ชาและแหล่งปลูก

จังหวัด	พันธุ์ชา	แหล่งปลูก
เชียงใหม่	C. sinensis	ดอยอ่างขาง ต.แม่งอน อ.ฝาง
เชียงราย	C. sinensis	ดอยแม่สลอง ต.แม่สลองนอก อ.แม่ฟ้าหลวง
แม่ฮ่องสอน	C. sinensis	บ้านรักไทย ต.หมอกจำแป่ อ.เมือง
แพร่	C. assamica	ต.ป่าแดง อ.เมืองแพร่
น่าน	C. assamica	บ้านศรีนาป่า ต.เรือง อ.เมืองน่าน
ลำปาง	C. assamica	ดอยแม่แจ่ม ต.แจซ้อน อ.เมืองปาน
ตาก	C. assamica	สถานีทดลองพืชสวนดอยมูเซอ หมู่บ้านมูเซอ ต.แม่ท้อ อ.เมือง
นราธิวาส	C. assamica	บ้านเจ๊ะเหม ต.แว้ง อ.แว้ง

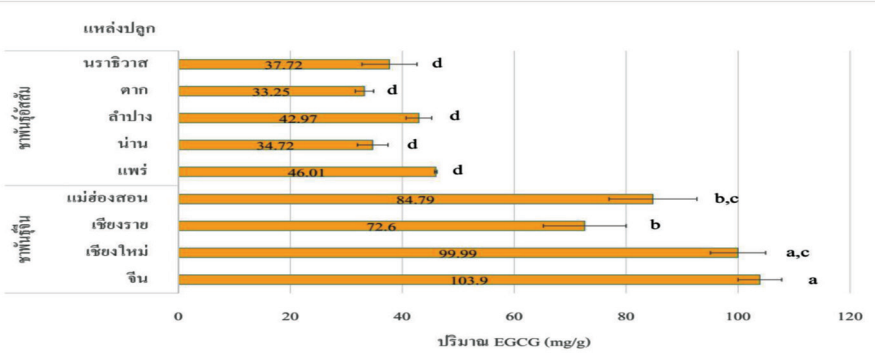
ความเข้มข้นฟลูออไรด์ในแต่ละแหล่งปลูกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 พบปริมาณฟลูออไรด์มีค่าน้อยสุดอยู่ที่ 0.14 ppm ในกลุ่มตัวอย่างจังหวัดตากและมากสุดอยู่ที่ 0.99 ppm ในกลุ่มตัวอย่างจังหวัดเชียงราย (ภาพที่ 6) และเมื่อพิจารณาปริมาณฟลูออไรด์แยกตามสายพันธุ์ชาแล้วพบว่าไม่มีขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ชาแต่อย่างใด



ภาพที่ 6 ปริมาณฟลูออไรด์ ในแต่ละจังหวัดแยกตามชนิดชาพันธุ์อัสสัมและจีน ตัวอักษรกำกับที่แตกต่างกันในแต่ละแหล่งปลูกแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

ตัวทำละลายที่สามารถสกัดปริมาณ EGCG มากที่สุดคือตัวทำละลายเมทานอล ที่ความเข้มข้น 70% ให้ปริมาณของ EGCG อยู่ที่ 28.02 mg/g รองลงมาคือการใช้ตัวทำละลาย 70% เอทานอล, 100% เมทานอล, 50% เอทานอล น้ำปราศจากอิออน, 50% เมทานอล ตามลำดับ และตัวทำละลาย 100% เอทานอลที่ให้ปริมาณการสกัด EGCG น้อยที่สุดอยู่ที่ 0.81 mg/g

เพราะฉะนั้นหากพิจารณาที่ปริมาณ EGCG ในแต่ละตัวทำละลายแล้ว การเลือกวิธีการสกัดที่ให้ได้ปริมาณสูงสุดคือการใช้ตัวทำละลาย 70% เมทานอล ซึ่งเป็นตัวทำละลายในการศึกษานี้ที่เลือกใช้ในการเปรียบเทียบปริมาณ EGCG แต่ละแหล่งปลูกในประเทศไทยในขั้นการทดลองต่อไป ปริมาณคาเทชิน EGCG ในแต่ละแหล่งปลูกในประเทศไทยเมื่อใช้ตัวทำละลาย 70% เมทานอล พบว่ามีปริมาณแตกต่างกันออกไปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 โดยที่จังหวัดเชียงใหม่มีปริมาณ EGCG สูงที่สุดอยู่ที่ความเข้มข้น 99.99 mg/g และไม่ได้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับชาจากจีน (ภาพที่ 7) เมื่อพิจารณาในส่วนของพันธุ์ชาพบว่ากลุ่มชาพันธุ์อัสสัมซึ่งได้แก่ แพร่ น่าน ลำปาง ตากและนราธิวาสมีปริมาณ EGCG เฉลี่ยน้อยกว่ากลุ่มชาพันธุ์จีนได้แก่ เชียงใหม่ เชียงราย แม่ฮ่องสอน และพบปริมาณ EGCG มากที่สุดเมื่อทำการต้มเป็นระยะเวลา 30 นาทีอยู่ที่ 624.21 ppm จากกลุ่มตัวอย่างจังหวัดเชียงใหม่ที่ให้ปริมาณสูงสุด (ตารางที่ 2)



ภาพที่ 7 ปริมาณ EGCG ในแต่ละจังหวัดแยกตามชนิดชาพันธุ์อัสสัมและจีน ตัวอักษรกำกับที่แตกต่างกันในแต่ละแหล่งปลูกแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

ตารางที่ 2 ตัวอย่างชาเขียวจังหวัดเชียงใหม่ที่มีปริมาณความเข้มข้นสูงที่สุดนำมาวิเคราะห์หาปริมาณ EGCG ในลักษณะการต้มด้วยน้ำร้อน และทิ้งไว้ที่ระยะเวลา 5, 15 และ 30 นาที

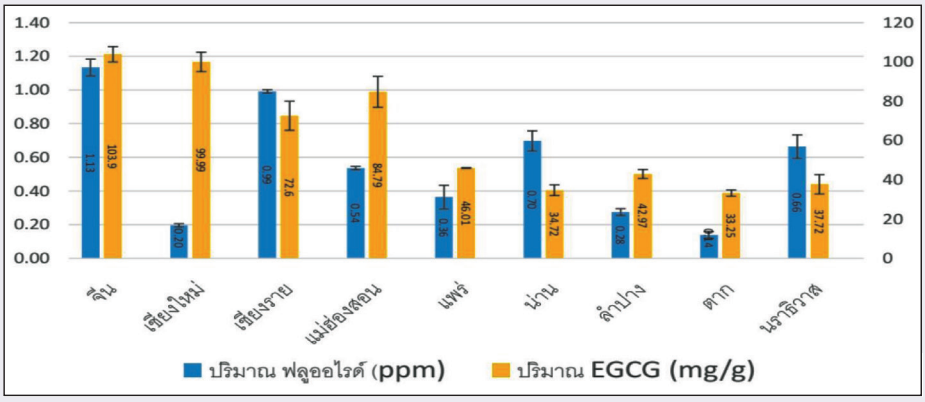
ระยะเวลาการต้ม	ค่าเฉลี่ยปริมาณ EGCG (ppm)	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
ระยะเวลา 5 นาที	301.24	5.92
ระยะเวลา 15 นาที	490.86	49.78
ระยะเวลา 30 นาที	624.21	129.57

วิจารณ์

จากการศึกษาเปรียบเทียบปริมาณฟลูออไรด์และคาเทชินในแต่ละแหล่งปลูกในประเทศไทยนั้นพบว่ามีปริมาณที่แตกต่างกันออกไปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยฟลูออไรด์ไม่ได้ขึ้นกับชนิดของพันธุ์ชาที่ปลูก อย่างไรก็ตามพบว่าระดับความเข้มข้นมีความหลากหลายในแต่ละพื้นที่และมีปริมาณเพียงพอต่อการคืนกลับแร่ธาตุผิวฟันที่ต้องใช้ระดับความเข้มข้นอย่างน้อยอยู่ที่ 0.058-0.138 ppm[5] ในทางกลับกันหากมองที่ความปลอดภัยในการรับประทานชาจากความเป็นพิษของฟลูออไรด์กรณีได้รับมากกว่าเกณฑ์ความปลอดภัยที่ 6 mg/day[16] ประเมินจากการรับประทานชาเขียวอยู่ที่ 5 แก้วต่อวันหรือที่ประมาณ 500-1,000 mL พบว่าปริมาณฟลูออไรด์ที่ได้รับจากการดื่มชาเขียวในแต่ละพื้นที่ยังอยู่ในเกณฑ์ขั้นต่ำและอยู่ในช่วงที่ปลอดภัยต่อความเป็นพิษของฟลูออไรด์

ในการเปรียบเทียบวิธีการสกัดชาเขียวพบว่าการใช้ 70% เมทานอลเป็นตัวทำละลายให้ปริมาณการสกัด EGCG สูงที่สุด รองลงมาคือ 70% เอทานอล ที่ให้ผลใกล้เคียงกัน ซึ่งผลของการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้า[17] อย่างไรก็ตามหากพิจารณาเรื่องความปลอดภัยของตัวทำละลายเปรียบเทียบระหว่างเมทานอลและเอทานอล พบว่าความเป็นพิษของเอทานอลนั้นมีค่าต่ำกว่าเมทานอลมาก เนื่องจากเมทานอลเมื่อเข้าสู่ร่างกายในปริมาณที่มากพอสามารถทำให้เกิดภาวะเลือดเป็นกรด (metabolic acidosis), ตาบอด (blindness), คลื่นไส้ (nausea), เจ็บช่องท้อง abdominal pain), ปวดหัว (headache) และอาจเสียชีวิตได้[18] ในการศึกษานี้เลือกใช้ 70% เมทานอลเป็นตัวทำละลายในการเปรียบเทียบปริมาณ EGCG เนื่องให้ปริมาณมากที่สุดและลดขั้นตอน รวมถึงความคลาดเคลื่อนที่อาจเกิดขึ้นได้ เนื่องจากต้องปรับสารละลายเป็น 50% เมทานอลก่อนเข้าเครื่องวัด แต่หากต้องการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์หรือใช้งานในรูปแบบอื่นๆ และไม่สามารถกำจัดตัวทำละลายเมทานอลออกได้หมด การเลือกใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายแทนเมทานอลเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถทำได้ โดยที่ยังให้ปริมาณการสกัด EGCG ที่ใกล้เคียงกันอยู่

ปริมาณ EGCG ในแต่ละแหล่งปลูกมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นเดียวกับปริมาณฟลูออไรด์ โดยที่ปริมาณ EGCG และฟลูออไรด์ในแต่ละแหล่งไม่พบความสัมพันธ์กัน (ภาพที่ 8) ทั้งนี้ปริมาณ EGCG จะสัมพันธ์กับชนิดของพันธุ์ชาโดยพบว่าพันธุ์ชาจีนจะพบปริมาณ EGCG มากกว่าชาพันธุ์อัสสัม พื้นที่ปลูกที่พบปริมาณ EGCG มากที่สุดได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่และหากพิจารณาปริมาณ EGCG ในรูปแบบการดื่มปกติจากการต้มในน้ำเดือดพบว่าปริมาณจะมีมากที่สุดในช่วง 30 นาที ซึ่งปริมาณ EGCG เพียงพอที่จะมีฤทธิ์ในการฆ่าและยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อโรคฟันผุได้หากเปรียบเทียบความเข้มข้นในการศึกษาทางห้องปฏิบัติการก่อนหน้า[13,19-20]



ภาพที่ 8 ปริมาณเปรียบเทียบฟลูออไรด์และ EGCG ในแต่ละจังหวัด

ผลที่ได้จากการศึกษานี้สามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบการหาแหล่งชาเขียวที่มีปริมาณคาเทชินและฟลูออไรด์ที่เหมาะสม รวมถึงทราบวิธีการที่เหมาะสมในการสกัดสารดังกล่าว นำไปพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์ทางเลือกทางทันตกรรม เช่น ยาสีฟัน น้ำยาบ้วนปาก ฟลูออไรด์เจลที่มีส่วนผสมสารสกัดชาเขียวจากแหล่งปลูกในประเทศไทย และทำการวิจัยศึกษาในระดับขั้นตอนต่อไป นอกจากนี้ยังสามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการให้คำแนะนำเครื่องดื่มที่มีฤทธิ์ส่งเสริมและป้องกันฟันผุแก่ผู้ป่วยที่มีปัญหาสุขภาพช่องปาก เช่น ในกลุ่มผู้สูงอายุที่เป็นกลุ่มเป้าหมายสำคัญและคาดการณ์ว่าจะมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นในอนาคตได้

สรุป

ปริมาณฟลูออไรด์และองค์ประกอบหลักคาเทชิน EGCG ในชาเขียวของประเทศไทยมีความแตกต่างกันไปในแต่ละพื้นที่ โดย EGCG พบมากที่เชียงใหม่และในกลุ่มชาพันธุ์จีน สามารถสกัดออกมาได้มากสุดด้วยตัวทำละลาย 70% เมทานอล นอกจากนี้ปริมาณฟลูออไรด์ไม่ได้ขึ้นกับชนิดพันธุ์ชา โดยพบว่าในทุกแหล่งปลูกมีปริมาณฟลูออไรด์มากเพียงพอที่ช่วยให้เกิดการคืนกลับแร่ธาตุที่ผิวฟันได้ รวมถึง EGCG ที่พบมากสุดที่เชียงใหม่นั้นเมื่อต้มที่เวลา 30 นาทีพบว่ามีปริมาณเพียงพอในการต้านเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคฟันผุ จากข้อมูลเหล่านี้ทำให้สามารถใช้เป็นทางเลือกในการหาแหล่งปลูกหากต้องการคาเทชินปริมาณมาก รวมถึง

ทราบแนวโน้มคุณสมบัติการป้องกันฟันผุของชาเขียวในประเทศไทยเพื่อนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์และทำการวิจัยศึกษาต่อไปได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสถาบันทันตกรรม นางสาวงามพักตร์ ทายะนา รวมถึงบุคลากรทุกท่านจากศูนย์วิจัยค้นคว้าและพัฒนายา สำนักงานวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีชั้นสูง มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ (ศูนย์รังสิต) ที่ช่วยสนับสนุนทำให้งานวิจัยสามารถลุล่วงไปได้อย่างดี

References

1. Petersen PE, Ogawa H. Prevention of dental caries through the use of fluoride–the WHO approach. Community Dent Health 2016;33:66-8.
2. Petersen PE. The World Oral Health Report 2003: continuous improvement of oral health in the 21st century–the approach of the WHO Global Oral Health Programme. Community Dent Oral Epidemiol 2003; 31:3-24.
3. Bureau of Dental Health. Report on the Eighth National Oral Health Survey of Thailand 2017. Nonthaburi: Department of Health, Ministry of Public Health; 2018.
4. Marsh PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. Adv Dent Res. 1994; 8:263-71.
5. Koontongkaew S. Cariology. 2 ed. Bangkok: iGroup Press Limited; 2009.
6. Van Strydonck DA, Slot DE, Van der Velden U, Van der Weijden F. Effect of a chlorhexidine mouthrinse on plaque, gingival inflammation and staining in gingivitis patients: a systematic review. J Clin Periodontol. 2012;39:1042-55.
7. McBain AJ, Ledder RG, Sreenivasan P, Gilbert P. Selection for high-level resistance by chronic triclosan exposure is not universal. J Antimicrob Chemother 2004;53:772-7.
8. Juneja LR, Kapoor MP, Okubo T, Rao T. Green Tea Polyphenols: Nutraceuticals of Modern Life: CRC Press; 2013.
9. Ketcharoen S, Pudmeetes U. Tea. Bangkok: Extension and Training Office, Kasetsart University.
10. Saad R, Fadli Asmani P, Khan J, Kaleemullah M, Aldahlli S, Kazi H, et al. Influence of Geographical Location on the Antioxidant Activity of Green Tea. Int J Pure App Biosci 2016; 4:56-63.
11. Mutuku A, Wanyoko J, Wachira F, Kamunya S, Chalo R, Kimutai S, et al. Influence of Geographical Regions on Catechin and Caffeine Levels in Tea (Camellia sinensis). American Journal of Plant Sciences 2016; 7:562-71.
12. Cabrera C, Artacho R, Gimenez R. Beneficial effects of green tea--a review. J Am Coll Nutr 2006; 25:79-99.
13. Yu H, Oho T, Xu LX. Effects of several tea components on acid resistance of human tooth enamel. J Dent 1995; 23:101-5.
14. Suyama E, Tamura T, Ozawa T, Suzuki A, Iijima Y, Saito T. Remineralization and acid resistance of enamel lesions after chewing gum containing fluoride extracted from green tea. Aust Dent J 2011; 56:394-400.
15. ISO. ISO 10359-1:1992 Preview Water quality -- Determination of fluoride -- Part 1: Electrochemical probe method for potable and lightly polluted water; 1992.
16. WHO. Guidelines for drinking-water quality 4th edition. WHO Chron. 2011; 38:104-8.
17. Perva-Uzunalić A, Škerget M, Knez Ž, Weinreich B, Otto F, Grüner S. Extraction of active ingredients from green tea (Camellia sinensis): Extraction efficiency of major catechins and caffeine. Food Chem 2006; 96:597-605.
18. Patnaik P. A comprehensive guide to the hazardous properties of chemical substances: John Wiley & Sons; 2007.
19. Sakanaka S, Kim M, Taniguchi M, Yamamoto T. Antibacterial substances in Japanese green tea extract against Streptococcus mutans, a cariogenic bacterium. Agric Biol Chem 1989; 53:2307-11.
20. Otake S, Makimura M, Kuroki T, Nishihara Y, Hirasawa M. Anticaries effects of polyphenolic compounds from Japanese green tea. Caries Res 1991; 25:438-43.