

# รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

ความสามารถของสารสกัดใบชา 3 ชนิดต่อการป้องกัน

การเสียหายของดีเอ็นเอจากอนุมูลอิสระ

โดย

ผศ.รัตนา สัมพันธ์ชิต หัวหน้าโครงการวิจัย

รศ.ดร.ธารรัตน์ ศุภศิริ ที่ปรึกษาโครงการวิจัย

## บทคัดย่อ

ได้ศึกษาความสามารถของสารสกัดใบชาสายพันธุ์อัสสัม (*Camellia sinensis* var. *assamica*) 3 ชนิด คือ ชาเขียว ชาอูหลง และชาดำ ในการป้องกันการเสียหายของดีเอ็นเอจากอนุมูลอิสระ AAPH (2,2'-azobis (2-amidinopropane hydrochloride) โดยผสมพลาสมิด pBluescript กับ trolox หรือ สารสกัดใบชา จากนั้นให้ทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ AAPH แล้วหาค่า  $IC_{50}$  (ความเข้มข้นที่ทำให้พลาสมิดอยู่ในสภาพที่ถูกทำลายสภาพธรรมชาติ (ในรูปของผลรวมของโครงสร้าง open circular และ linear) และไม่ถูกทำลายสภาพธรรมชาติ (โครงสร้าง supercoil) อย่างละ 50 %) พบว่า trolox และสารสกัดใบชาทั้ง 3 ชนิด แสดงการยับยั้งในลักษณะแปรตามความเข้มข้นของสารที่ใช้ (dose dependent) โดยสารสกัดชาเขียวมีความสามารถป้องกันการเสียหายของพลาสมิดดีกว่าชาอูหลงประมาณ 1.2 เท่า ( $p < 0.01$ ) และดีกว่าชาดำประมาณ 8 เท่า โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $182 \pm 15$   $218 \pm 10$  และ  $1,520 \pm 61$  ng ใบชา ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระวัดในรูป  $IC_{50}$  ของการยับยั้ง DPPH $^{\bullet}$  (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical) ซึ่งพบในสารสกัดชาเขียวมากกว่าชาอูหลงประมาณ 1.3 เท่า ( $p < 0.01$ ) และมากกว่าชาดำประมาณ 8 เท่าเช่นกัน โดยมีค่าเท่ากับ  $10.83 \pm 0.15$   $14.03 \pm 1.27$  และ  $87.94 \pm 2.98$   $\mu$ g ใบชา ตามลำดับ และสอดคล้องกับปริมาณสารประกอบฟีนอล และคาเทชินที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC โดยพบว่าสารสกัดใบชาที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูง มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และปริมาณคาเทชินรวมสูงด้วย

## Abstract

The antioxidant protecting activity of three kinds of tea (*Camellia sinensis* var. *assamica*): green, oolong and black tea against oxidative damage of DNA strands, initiated by AAPH (2,2'-azobis (2-amidinopropane hydrochloride) was studied. Trolox (a water-soluble analogue of  $\alpha$ -tocopherol) or tea infusions were mixed with pBluescript followed by incubating with AAPH. The ability of the tea infusions inhibiting the oxidative DNA damage were assessed by measuring the conversion of supercoiled pBluescript to the open circular and linear forms.  $IC_{50}$  which describes the concentration that causes the half-maximal denatured forms of plasmids (open circular plus linear forms) were determined. All kinds of tea infusions showed dose dependent inhibition to oxidative DNA damage. The  $IC_{50}$  of green tea, oolong tea, and black tea infusions were  $182 \pm 15$ ,  $218 \pm 10$  and  $1,520 \pm 61$  ng, respectively, which is significantly different at  $p < 0.01$  for green and oolong tea infusions. It was found that green tea infusions exhibited significant protecting activity 1.2 fold of oolong tea and 8 fold of black tea infusions. This result corresponded with the  $IC_{50}$  to scavenge DPPH $^{\bullet}$  ((2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical) of which green tea infusions showed significant ability ( $p < 0.01$ ) 1.3 fold of oolong tea infusions and 8 fold of black tea infusions ( $10.83 \pm 0.15$ ,  $14.03 \pm 1.27$  and  $87.94 \pm 2.98$   $\mu$ g respectively). The potential bioactivity of these three kinds of tea infusions were associated with their polyphenolic contents and their total catechin contents analyzed by HPLC.

## ประกาศคุณูปการ

โครงการวิจัยเรื่อง “ความสามารถของสารสกัดใบชา 3 ชนิดต่อการป้องกันการเสียหายของดีเอ็นเอจากอนุมูลอิสระ” ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากเงินรายได้ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประจำปีงบประมาณ 2550 และใช้ครุภัณฑ์ของภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ประกอบการทำวิจัยบางส่วน ผู้วิจัยขอขอบคุณ รศ.ดร.ธารรัตน์ สุภศิริ ที่ปรึกษางานวิจัย ที่ได้ให้คำปรึกษาทั้งการวิจัย และการจัดทำรายงาน และได้สนับสนุน ส่งเสริมงานวิจัยนี้ จนเสร็จสมบูรณ์ด้วยดี ผู้วิจัยขอขอบคุณ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือในการวิจัย และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการคณะแพทยศาสตร์ ที่ได้อำนวยความสะดวกในการใช้ห้องและเครื่องมือ ขอขอบคุณ ผศ.ดร.ปรินทร์ ชัยวิสุทธางกูร ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ได้อนุเคราะห์ทดลองเทคนิคต้นแบบสำหรับการวิจัย และขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่เห็นความสำคัญของงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์ โดยให้ทุนสนับสนุนการทำวิจัยนี้ ทำให้เกิดความเข้มแข็งทางการวิจัย ทางวิชาการ และก่อให้เกิดบรรยากาศของการวิจัยในหน่วยงาน และได้ผลงานที่เป็นประโยชน์นำไปใช้ในการเรียน การสอน และนำไปสู่การเผยแพร่เพื่อประโยชน์แก่ผู้สนใจอื่นๆ ต่อไป

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ .....	i
Abstract .....	ii
ประกาศคุณูปการ .....	iii
สารบัญ .....	iv
บัญชีตาราง .....	vi
บัญชีภาพประกอบ .....	vii
<b>บทที่ 1 บทนำ</b> .....	<b>1</b>
อนุมูลอิสระ .....	1
การใช้ประโยชน์ของอนุมูลอิสระในร่างกาย.....	4
ระบบที่ควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระในร่างกายให้อยู่ในสมดุล.....	5
ผลเสียหายของการมีอนุมูลอิสระเกินในร่างกาย.....	6
โรคที่เกิดจากอนุมูลอิสระ.....	10
สารต้านอนุมูลอิสระที่ใช้ในการวิจัย .....	11
ฟลาโวนอยด์ .....	12
ไบซา .....	14
การวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่าง.....	17
การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก .....	18
การศึกษาความเสียหายของดีเอ็นเอเนื่องจากการถูกออกซิไดส์.....	18
จุดมุ่งหมายของการวิจัย .....	19
<b>บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง</b> .....	<b>20</b>
<b>บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย</b> .....	<b>25</b>
อุปกรณ์และสารเคมี .....	25
วิธีวิจัย .....	27
เตรียมสกัดสารจากใบชาด้วยน้ำร้อน .....	27
วิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบชาเป็น $IC_{50}$ โดย	
วิธี DPPH .....	27
วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดใบชา .....	28

วิเคราะห์ปริมาณ flavonoids กลุ่ม catechin ในสารสกัดใบชาโดยวิธี HPLC .....	28
ศึกษาความสามารถของสารสกัดใบชาต่อการป้องกันการทำลายดีเอ็นเอจากอนุมูลอิสระ .....	29
การเตรียมสารละลาย .....	29
ศึกษาความเข้มข้นของ AAPH ที่มีผลต่อการทำลาย pBluescript.....	29
ศึกษาความสามารถของ Trolox ต่อการป้องกันการทำลาย pBluescript จาก AAPH ...	30
ศึกษาความสามารถของสารสกัดจากใบชา 3 ชนิด ชาเขียว ชาอูหลง และชาดำ .....	31
ต่อการป้องกันการทำลาย pBluescript จาก AAPH.....	31
ศึกษาผลของสารสกัดชาเขียวต่อการป้องกันการทำลาย pBluescript จาก AAPH .....	31
ศึกษาผลของสารสกัดชาอูหลงต่อการป้องกันการทำลาย pBluescript จาก AAPH.....	33
ศึกษาผลของสารสกัดชาดำต่อการป้องกันการทำลาย pBluescript จาก AAPH.....	33
<b>บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....</b>	<b>13</b>
การวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดชาเขียว .....	35
ชาอูหลง และชาดำ .....	35
การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดชาเขียว ชาอูหลง และชาดำ .....	35
การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์กลุ่มคาเทชินในสารสกัดใบชาโดย HPLC .....	36
ศึกษาความสามารถของสารสกัดใบชาต่อการป้องกันการทำลายดีเอ็นเอจากอนุมูลอิสระ... ..	39
ศึกษาความเข้มข้นของ AAPH ที่มีผลต่อการทำลาย pBluescript .....	39
ศึกษาความสามารถของ Trolox ต่อการป้องกันการทำลาย pBluescript จาก AAPH....	40
ศึกษาผลของสารสกัดชาเขียวต่อการป้องกันการทำลาย pBluescript จาก AAPH.....	42
ศึกษาผลของสารสกัดชาอูหลงต่อการป้องกันการทำลาย pBluescript จาก AAPH .....	43
ศึกษาผลของสารสกัดชาดำต่อการป้องกันการทำลาย pBluescript จาก AAPH .....	45
<b>บทที่ 5. สรุปและอภิปรายผลการวิจัย .....</b>	<b>46</b>
<b>บรรณานุกรม .....</b>	<b>52</b>
<b>ภาคผนวก .....</b>	<b>57</b>
สถิติที่ใช้ในการวิจัย .....	57
ภาพประกอบการวิเคราะห์ค่า $IC_{50}$ ในสารสกัดใบชา .....	58
กราฟแสดงการลดลงของ DPPH radical โดยสารต้านอนุมูลอิสระทั่วไป .....	58
กราฟแสดงการหาค่า $IC_{50}$ ของสารต้านอนุมูลอิสระทั่วไป.....	58

การวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบชา	
โดยการหาค่า $IC_{50}$ ของการยับยั้ง DPPH radical .....	59
การหาค่า $IC_{50}$ ของสารสกัดชาเขียว .....	59
การหาค่า $IC_{50}$ ของสารสกัดชาอูหลง .....	60
การหาค่า $IC_{50}$ ของสารสกัดชาดำ .....	62
การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเป็น mgGAE ในสารสกัดใบชา .....	63
กราฟมาตรฐานของ gallic acid .....	64
การวิเคราะห์ปริมาณคาเทชินในสารสกัดใบชาโดยวิธี HPLC .....	64
การวิเคราะห์ปริมาณคาเทชินในสารสกัดชาเขียว.....	64
การวิเคราะห์ปริมาณคาเทชินในสารสกัดชาอูหลง .....	66
การวิเคราะห์ปริมาณคาเทชินในสารสกัดชาดำ.....	67
รูปแบบ agarose gel electrophoresis ของ pBluescript ในกรณีต่างๆ .....	69
รูปแบบ electrophoresis เมื่อ pBluescript ทำปฏิกิริยากับ AAPH .....	69
รูปแบบ electrophoresis เมื่อ pBluescript ผสมกับ trolox และทำปฏิกิริยากับ AAPH ..	69
รูปแบบ electrophoresis เมื่อ pBluescript ผสมกับสารสกัดชาเขียว	
และทำปฏิกิริยากับAAPH .....	69
รูปแบบ electrophoresis เมื่อ pBluescript ผสมกับสารสกัดชาอูหลง	
และทำปฏิกิริยากับAAPH .....	70
รูปแบบ electrophoresis เมื่อ pBluescript ผสมกับสารสกัดชาดำ	
และทำปฏิกิริยากับAAPH .....	70
การหาค่า $IC_{50}$ ของสารสกัดใบชาต่อการป้องกันการเสียหายของ pBluescript จาก AAPH... 71	
การหาค่า $IC_{50}$ ของสารสกัดชาเขียว ชาอูหลง และ ชาดำ .....	71
ข้อมูลปริมาณโครงสร้างต่างๆ ของพลาสมิดเป็น raw volume วิเคราะห์จาก	
software Genetool .....	72
เมื่อ pBluescript ทำปฏิกิริยากับ AAPH .....	72
เมื่อ pBluescript ผสมกับ trolox แล้วทำปฏิกิริยากับ AAPH .....	73
เมื่อ pBluescript ผสมกับสารสกัดชาเขียว แล้วทำปฏิกิริยากับ AAPH.....	74
เมื่อ pBluescript ผสมกับสารสกัดชาอูหลง แล้วทำปฏิกิริยากับ AAPH.....	75
เมื่อ pBluescript ผสมกับสารสกัดชาดำ แล้วทำปฏิกิริยากับ AAPH.....	76

การคำนวณเป็นร้อยละของโครงสร้างพลาสมิดที่ถูกทำลาย (circular + linear) และ	
ไม่ถูกทำลายสภาพธรรมชาติ (supercoil) .....	77
เมื่อ pBluescript ทำปฏิกิริยากับ AAPH.....	77
เมื่อ pBluescript ผสมกับ trolox แล้วทำปฏิกิริยากับ AAPH .....	77
เมื่อ pBluescript ผสมกับสารสกัดชาเขียว แล้วทำปฏิกิริยากับ AAPH .....	77
เมื่อ pBluescript ผสมกับสารสกัดชาอูหลง แล้วทำปฏิกิริยากับ AAPH .....	77
เมื่อ pBluescript ผสมกับสารสกัดชาดำ แล้วทำปฏิกิริยากับ AAPH .....	77
อภิธานศัพท์ .....	78
ประวัติย่อผู้วิจัย .....	79



## บัญชีตาราง

ตารางที่	หน้า
1.1 อนุมูลอิสระชนิดต่างๆ .....	3
1.2 สภาวะทางคลินิกที่เกิดจากการทำลายโดยอนุมูลอิสระ.....	10
3.1 ระบบตัวทำลายและอัตราเร็วของการชะลอด้วยแบบ linear gradient ที่ใช้ในการแยกคาเทชิน โดยวิธี HPLC .....	28
3.2 ศึกษาความเข้มข้นของ AAPH ที่มีผลต่อการทำลาย pBluescript .....	29
3.3 ตัวอย่างข้อมูลปริมาณ โครงรูปต่างๆ (raw volume) จาก software Genetool และปริมาณ โครงรูปที่คำนวณได้เป็น % .....	30
3.4 การศึกษาความสามารถของ Trolox ต่อการป้องกันการทำลาย pBluescript จาก AAPH .....	31
3.5 การศึกษาผลของสารสกัดชาเขียวต่อการป้องกันการทำลาย pBluescript จาก AAPH .....	32
3.6 การศึกษาผลของสารสกัดชาอูหลงต่อการป้องกันการทำลาย pBluescript จาก AAPH .....	33
3.7 การศึกษาผลของสารสกัดชาดำต่อการป้องกันการทำลาย pBluescript จาก AAPH .....	34
4.1 ค่า $IC_{50}$ ของสารสกัดชาเขียว ชาอูหลง และชาดำในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH .....	35
4.2 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในชาเขียว ชาอูหลง และชาดำ.....	36
4.3 ปริมาณคาเฟอีนและคาเทชินต่างๆ ในสารสกัดชาเขียว .....	38
4.4 ปริมาณคาเฟอีนและคาเทชินต่างๆ ในสารสกัดชาอูหลง.....	38
4.5 ปริมาณคาเฟอีนและคาเทชินต่างๆ ในสารสกัดชาดำ.....	39
5.1 ปริมาณคาเฟอีนและคาเทชินรวมในสารสกัดชาเขียว ชาอูหลง และชาดำ .....	48
5.2 ความสามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH ( $IC_{50}$ ) ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ปริมาณคาเทชินรวม และความสามารถในการป้องกันการเสียหายของพลาสมิด ( $IC_{50}$ ) ของ trolox ของสารสกัดชาเขียว ชาอูหลง และชาดำ .....	50

## บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบที่	หน้า
1.1 แสดงการเกิดอนุมูลอิสระของอะตอมออกซิเจน ซึ่งไม่เสถียรจะเข้าไป แย่งอิเล็กตรอนจาก โมเลกุลข้างเคียงเพื่อให้ตัวเองเสถียร .....	2
1.2 แสดง unpaired electron ของอนุมูลอิสระบางชนิด .....	2
1.3 แสดงแหล่งของอนุมูลอิสระ .....	4
1.4 การทำงานของเอนไซม์ 3 ชนิดที่ช่วยควบคุมระดับอนุมูลอิสระให้อยู่ในสมดุล .....	5
1.5 การเกิดอนุมูลอิสระมากเกินไประบบป้องกันของร่างกาย จะนำไปสู่ สภาวะ oxidative stress เกิดการทำลายชีวโมเลกุลของร่างกาย .....	7
1.6 การตอบสนองของเซลล์ในระดับต่างๆ เมื่อตีเอ็นเอถูกทำลาย .....	9
1.7 แสดงโครงสร้างวิตามินอีและ Trolox (trolox) .....	11
1.8 โครงสร้างของฟลาโวนอยด์ ก. โครงสร้างพื้นฐานฟลาเวน ข. โครงสร้างหลักของฟลาโวนอยด์กลุ่มย่อยต่างๆ .....	13
1.9 โครงสร้างของฟลาโวนอยด์ในใบชา .....	15
1.10 การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของพลาสมิดเมื่อถูกออกซิไดส์ .....	19
1.11 โครงสร้างทั่วไปของพลาสมิด pBluescript .....	19
3.1 กำการดูดกลืนแสงของ DPPH ลดลงเมื่อปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น .....	27
3.2 การหาค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบชาเป็น $IC_{50}$ .....	27
4.1 เปรียบเทียบโครมาโทแกรมของการแยกสารกลุ่ม catechin โดยวิธี reversed phase HPLC ด้วยคอลัมน์ deactivated monomeric $C_{18}$ ะคอลัมน์แบบ linear gradient ก. caffeine และ flavonoid มาตรฐาน 6 ชนิด ข. สารสกัดชาเขียว 7.14 mg/ml ค. สารสกัดชาอูหลง 1.43 mg/ml ง. สารสกัดชาดำ 30 mg/ml .....	37
4.2 รูปแบบ agarose gel electrophoresis ของพลาสมิด pBluescript (25 ng/ $\mu$ l) ปริมาตร 10 $\mu$ l ทำปฏิกิริยากับ AAPH ที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 10 $\mu$ l ใน PBS pH 7.4 ปริมาตร 10 $\mu$ l ที่ 37 °C เป็นเวลา 90 นาที Lane 1 : ควบคุม; Lane 2 : 2.5 mM AAPH; Lane 3 : 5 mM AAPH; Lane 4 : 10 mM AAPH; Lane 5 : 20 mM AAPH; Lane 6 : 40 mM AAPH; Lane 7 : 80 mM AAPH .....	40

- 4.3 ปริมาณร้อยละของโครงสร้างพลาสมิด pBluescript ที่ถูกทำลายสภาพธรรมชาติ (circular + linear) แปรตามปริมาณของ AAPH ที่เพิ่มขึ้น .....40
- 4.4 ผลของ trolox ที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 10  $\mu\text{l}$  ต่อการป้องกันการทำลายพลาสมิด pBluescript (25 ng/ $\mu\text{l}$ ) ปริมาตร 5  $\mu\text{l}$  ที่ถูกชักนำด้วย 10 mM AAPH ปริมาตร 10  $\mu\text{l}$  ใน PBS pH 7.4 ปริมาตร 10  $\mu\text{l}$  ที่ 37 °C เป็นเวลา 90 นาที Lane 1 : ควบคุม; Lane 2 : 0 mM Trolox; Lane 3 : 2.5 mM Trolox; Lane 4 : 5 mM Trolox; Lane 5 : 10 mM Trolox; Lane 6 : 20 mM Trolox ; Lane 7 : 40 mM Trolox; Lane 8 : 80 mM Trolox... ....41
- 4.5 ผลของ Trolox ที่ความเข้มข้น 0 2.5 5 10 20 40 และ 80 mM ต่อร้อยละของโครงสร้างพลาสมิด pBluescript ที่ถูกชักนำให้เกิดการทำลายสภาพธรรมชาติด้วย 10 mM AAPH ปริมาตร 10  $\mu\text{l}$  ..... 41
- 4.6 ผลของสารสกัดชาเขียวที่ความเข้มข้น 0-250 ng/ $\mu\text{l}$  ปริมาตร 10  $\mu\text{l}$  ต่อพลาสมิด pBluescript เข้มข้น 25ng/ $\mu\text{l}$  ปริมาตร 5  $\mu\text{l}$  ที่ถูกชักนำด้วย 10 mM AAPH ปริมาตร 10  $\mu\text{l}$  ในบัฟเฟอร์ PBS pH 7.4 ที่ 37 °C เป็นเวลา 90 นาที Lane 1 : ควบคุม; Lane 2 : สารสกัดชาเขียว 0 ng/ $\mu\text{l}$ ; Lane 3 : สารสกัดชาเขียว 7.8 ng/ $\mu\text{l}$ ; Lane 4 : สารสกัดชาเขียว 15.6 ng/ $\mu\text{l}$ ; Lane 5 : สารสกัดชาเขียว 31.3ng/ $\mu\text{l}$  ; Lane 6 : สารสกัดชาเขียว 62.5 ng/ $\mu\text{l}$ ; Lane 7 : สารสกัดชาเขียว 125 ng/ $\mu\text{l}$ ; Lane 8 : สารสกัดชาเขียว 250 ng/ $\mu\text{l}$  ..... 42
- 4.7 ผลของสารสกัดชาเขียวที่ความเข้มข้น 0- 250 ng/ $\mu\text{l}$  ต่อร้อยละของโครงสร้างของพลาสมิด pBluescript ที่ถูกชักนำให้เกิดการทำลายสภาพธรรมชาติด้วย AAPH ..... 43
- 4.8 ผลของสารสกัดชาอูหลงที่ความเข้มข้น 0-250 ng/ $\mu\text{l}$  ปริมาตร 10  $\mu\text{l}$  ต่อพลาสมิด pBluescript เข้มข้น 25ng/ $\mu\text{l}$  ปริมาตร 5  $\mu\text{l}$  ที่ถูกชักนำด้วย 10 mM AAPH ปริมาตร 10  $\mu\text{l}$  ในบัฟเฟอร์ PBS pH 7.4 ที่ 37 °C เป็นเวลา 90 นาที Lane 1 : ควบคุม; Lane 2 : สารสกัดชาเขียว 0 ng/ $\mu\text{l}$ ; Lane 3 : สารสกัดชาอูหลง 7.8 ng/ $\mu\text{l}$ ; Lane 4 : สารสกัดชาอูหลง 15.6 ng/ $\mu\text{l}$ ; Lane 5 : สารสกัดชาอูหลง 31.3 ng/ $\mu\text{l}$  ; Lane 6 : สารสกัดชาอูหลง 62.5 ng/ $\mu\text{l}$ ; Lane 7 : สารสกัดชาอูหลง 125 ng/ $\mu\text{l}$ ; Lane 8 : สารสกัดชาอูหลง 250 ng/ $\mu\text{l}$  ..... 44
- 4.9 สารสกัดชาเขียวที่ความเข้มข้น 0- 250 ng/ $\mu\text{l}$  ต่อร้อยละของโครงสร้างของพลาสมิด pBluescript ที่ถูกชักนำให้เกิดการทำลายสภาพธรรมชาติด้วย AAPH ..... 44

4.10 ผลของสารสกัดชาดำที่ความเข้มข้น 0-5,000 ng/μl ปริมาตร 10 μl ต่อพลาสมิด pBluescript เข้มข้น 5ng/μl ปริมาตร 5 μl ที่ถูกชักนำด้วย 10 mM AAPH ปริมาตร 10 μl ในบัฟเฟอร์ PBS pH 7.4 ที่ 37 °C เป็นเวลา 90 นาที

Lane 1 : ควบคุม; Lane 2 : สารสกัดชาดำ 0 ng/μl;

Lane 3 : สารสกัดชาดำ 156 ng/μl; Lane 4 : สารสกัดชาดำ 313 ng/μl;

Lane 5 : สารสกัดชาดำ 625 ng/μl ; Lane 6 : สารสกัดชาดำ 1,250 ng/μl;

Lane 7 : สารสกัดชาดำ 2,500 ng/μl; Lane 8 : สารสกัดชาดำ 5,000 ng/μl ..... 45

4.11 ผลของสารสกัดชาดำที่ความเข้มข้น 0- 5,000 ng/μl ต่อร้อยละของโครงรูปของ

พลาสมิด pBluescript ที่ถูกชักนำให้เกิดการทำลายสภาพธรรมชาติด้วย AAPH ..... 45



# บทที่ 1

## บทนำ

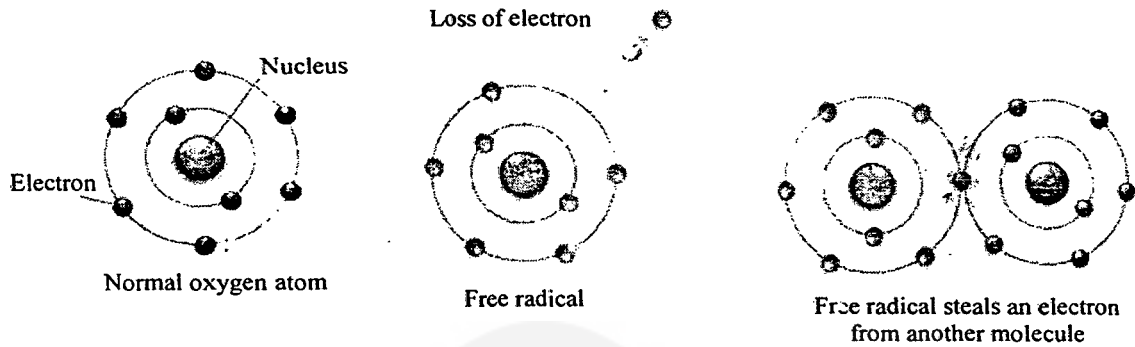
ปัจจุบันพบว่าโรคภัยไข้เจ็บหลายโรคมีสาเหตุมาจากอนุมูลอิสระ (free radicals) ร่างกายได้รับอนุมูลอิสระจาก 2 ทาง คือจากการสร้างขึ้นภายในร่างกาย ซึ่งเกิดได้เองตลอดเวลา จากกระบวนการเผาผลาญสารอาหาร และอีกทางหนึ่งได้รับจากภายนอก ทั้งจากการบริโภคโดยตรงหรือจากสิ่งแวดล้อม อนุมูลอิสระเหล่านี้ไม่เสถียร มีความว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับสารชีวโมเลกุลต่าง ๆ ซึ่งจะก่อให้เกิดผลเสียแก่เซลล์ อย่างไรก็ตามร่างกายมีระบบที่สามารถกำจัดอนุมูลอิสระได้ ดังนั้นหากอนุมูลอิสระมีมากเกินไปที่ร่างกายจะกำจัดได้ทัน อนุมูลอิสระส่วนเกินจะไปออกซิไดส์สารชีวโมเลกุลในเซลล์ เช่น โปรตีน ลิพิด และ ดีเอ็นเอ ทำให้องค์ประกอบต่างๆ ในเซลล์รวมทั้งเยื่อเซลล์เสียหาย ก่อให้เกิดภาวะการถูกบีบคั้นจากการออกซิไดส์ขึ้นภายในเซลล์ เรียกว่าสภาวะ oxidative stress เป็นผลเสียต่อร่างกายมากมาย นำไปสู่โรคภัยไข้เจ็บต่างๆ ความชราภาพก่อนวัย (aging) โรคหัวใจ โรคมะเร็ง ฯลฯ โดยเฉพาะอย่างยิ่งพบว่าโรคมะเร็งหลายโรคมีสาเหตุมาจากเกิดความเสียหายของดีเอ็นเอ ร่างกายจึงจำเป็นต้องได้รับสารที่ทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระ เรียกว่า สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) เช่น เบตา-แคโรทีน วิตามินซี วิตามินอี และ สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ซึ่งพบได้ทั่วไปในพืช ผัก ผลไม้ และ ใบชา สารสกัดใบชา (น้ำชา) เป็นแหล่งสำคัญแหล่งหนึ่งที่ให้ฟลาโวนอยด์จำนวนมากแก่ผู้บริโภค ใบชาที่คนไทยนิยมบริโภคมี 3 ชนิดคือ ชาเขียว ชาอูหลง และชาดำซึ่งแตกต่างกันที่กระบวนการหมัก ซึ่งเป็นสาเหตุให้มีสารต้านอนุมูลอิสระฟลาโวนอยด์ไม่เท่ากัน การหาความสามารถของสารสกัดในใบชาทั้ง 3 ชนิดต่อการป้องกันความเสียหายของดีเอ็นเอ จะนำไปสู่การเลือกบริโภคน้ำชาที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกายสูงสุด

## 1. อนุมูลอิสระ

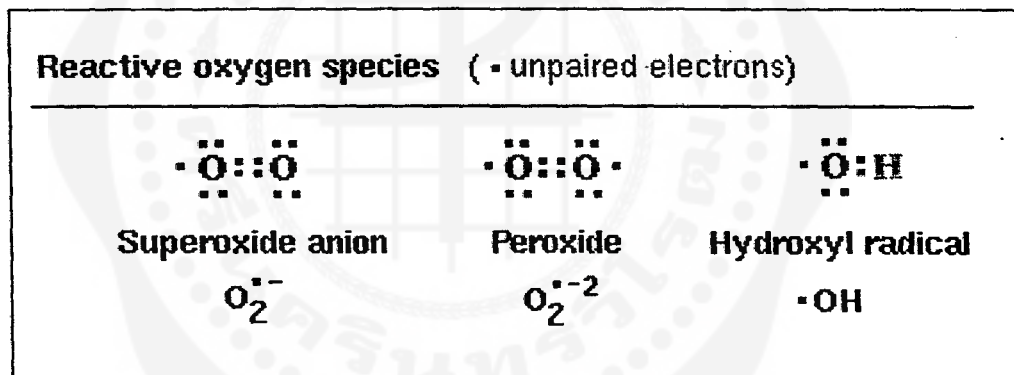
### 1.1 อนุมูลอิสระคืออะไร

อนุมูลอิสระ คืออะตอม โมเลกุล หรือสารประกอบที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยวไม่ครบคู่ (unpaired electron) อยู่ภายนอกสุดของออร์บิทัล จึงไม่เสถียร สามารถทำปฏิกิริยากับอะตอมหรือโมเลกุลอื่นที่อยู่รอบ ๆ ตัว โดยรับหรือให้อิเล็กตรอนแก่โมเลกุลข้างเคียงเพื่อให้ตัวเองมีความเสถียร (ภาพประกอบที่ 1) โมเลกุลข้างเคียงที่สูญเสียหรือรับอิเล็กตรอนจะกลายเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่ที่มีความไม่เสถียรต่อไป และจะเข้าทำปฏิกิริยากับ โมเลกุลอื่น ๆ ที่อยู่ข้างเคียงจนเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain reaction) ดังนั้นอนุมูลอิสระจึงมีความไวสูงในการเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นๆ (Halliwell & Gutteridge, 1997)

อนุมูลอิสระที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ จะไวต่อการเกิดปฏิกิริยามากกว่าอนุมูลที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง อนุมูลอิสระมีทั้งที่เป็นกลางทางไฟฟ้า ( $A^\bullet$ ) และที่มีประจุไฟฟ้า ซึ่งมีทั้งที่มีประจุลบ ( $A^{\bullet-}$ ) (ภาพประกอบที่ 1.2) และที่มีประจุบวก ( $A^{\bullet+}$ )



ภาพประกอบที่ 1.1 การเกิดอนุมูลอิสระของอะตอมออกซิเจน ซึ่งไม่เสถียรจะเข้าไปแย่งอิเล็กตรอนจากโมเลกุลข้างเคียงเพื่อให้ตัวเองเสถียร

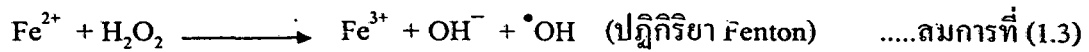
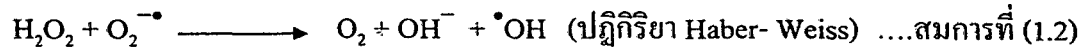


ภาพประกอบที่ 1.2 แสดง unpaired electron ของอนุมูลอิสระบางชนิด

## 1.2 ชนิดของอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระแบ่งเป็น 3 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ (reactive oxygen species, ROS) เช่น อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (superoxide anion radical,  $O_2^{\bullet-}$ ) อนุมูลไฮดรอกซิล (hydroxyl radical,  $\cdot OH$ ) และ อนุมูลไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (hydroperoxyl radical,  $H_2O^\bullet$ ) เป็นต้น กลุ่มที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ (reactive nitrogen species, RNS) เช่น อนุมูลไนตริกออกไซด์ (nitric oxide radical,  $NO^\bullet$ ) และอนุมูลไนโตรเจนไดออกไซด์ (nitrogen dioxide radical,  $NO_2^\bullet$ ) เป็นต้น และกลุ่มที่มีคลอรีนเป็นองค์ประกอบ (reactive chlorine species, RCS) (ตารางที่ 1.1)

นอกจากนี้ยังมีโมเลกุลที่ไม่ใช่อนุมูลอิสระ มีความเสถียรต่ำ สลายตัวได้ง่าย สามารถก่อให้เกิดการสร้างอนุมูลอิสระขึ้นได้ เช่น โอโซน ( $O_3$ ) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $H_2O_2$ ) ในบรรดาอนุมูลอิสระทั้งหลายพบว่าอนุมูลไฮดรอกซิล  $\cdot OH$  เป็นตัวออกซิไดส์ที่แรงที่สุด จึงเป็นอันตรายที่สุด ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สามารถก่อให้เกิดอนุมูลไฮดรอกซิลขึ้นได้จากหลายปฏิกิริยา เช่น จากการสลายตัวของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยตรง (สมการที่ 1.1) จากปฏิกิริยา Haber-Weiss (สมการที่ 1.2) และปฏิกิริยา Fenton ซึ่งเกิดขึ้นเมื่อมีเหล็กหรือทองแดงอยู่ด้วย (สมการที่ 1.3)



ตารางที่ 1.1 อนุมูลอิสระชนิดต่างๆ

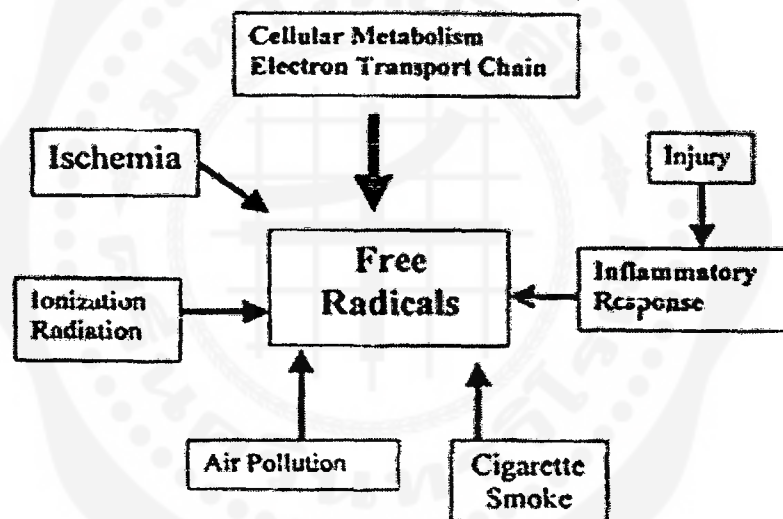
อนุมูลอิสระ	
<i>Reactive oxygen species (ROS)</i>	Superoxide, Superoxide anion $O_2^{\cdot-}$ Hydroxyl, $\cdot OH$ Hydroperoxyl, $H_2O\cdot$ Peroxyl, $RO_2\cdot$ Alkoxy, $RO\cdot$ Carbonate $CO_3^{\cdot-}$ Carbondioxide, $CO_2^{\cdot-}$
<i>Reactive nitrogen species (RNS)</i>	Nitric oxide, $NO\cdot$ Nitrogen dioxide, $NO_2\cdot$ , $NO_2^{\cdot-}$
<i>Reactive chlorine species (RCS)</i>	Atomic chlorine
<i>Others</i>	Thiyl radical ( $RS\cdot$ )

ที่มา: โอภา วัชรกุลป์ และคณะ, 2549 ตารางที่ 1 หน้า 2

### 1.3 แหล่งของอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระเกิดขึ้นได้เองภายในร่างกายทั้งในสภาวะปกติ โดยเป็นผลผลิตของกระบวนการเผาผลาญสารอาหารด้วยออกซิเจน อนุมูลที่พบในเซลล์มากกว่าอนุมูลอื่นๆ คือ  $O_2^{\cdot-}$  และ  $\cdot OH$  และในสภาวะที่ไม่ปกติ เช่น จากความผิดปกติของการทำงานของไมโทคอนเดรีย อนุมูล  $O_2^{\cdot-}$  เป็นอนุมูลอิสระเริ่มต้นที่เป็นอันตรายและพบมากที่สุดในเซลล์ เกิดขึ้นจากการรั่วไหลหรือการบกพร่องของการส่งผ่านอิเล็กตรอนในลูกโซ่ขนส่งอิเล็กตรอนในไมโทคอนเดรีย (Evans et al., 1997; Raha, 2000)

อนุมูล  $O_2^{\cdot-}$  สามารถเปลี่ยนไปเป็นอนุมูล  $\cdot OH$  ซึ่งเป็นอันตรายต่อร่างกายที่สุด นอกจากนี้อนุมูลอิสระในสภาวะไม่ปกติยังเกิดขึ้นได้จากหลายสาเหตุ เช่น จากภาวะที่ร่างกายขาดเลือดชั่วคราวขณะเนื่องจากเส้นโลหิตอุดตัน (ischemia) จากภาวะช็อกและการอักเสบเนื่องจากติดเชื้อทั้งจากแบคทีเรียและไวรัส (Roessner et al., 2008) จากการอักเสบตัวเอง (auto-immune diseases) เช่น ข้ออักเสบ รูมาตอยด์ โรคเกาต์ และจากความเครียด นอกจากนี้ร่างกายยังอาจได้รับอนุมูลอิสระจากภายนอก เช่น จากการทำให้อาหารพิษจากสิ่งแวดล้อม ได้แก่ มลพิษในอากาศ ไอเสียจากรถยนต์ ไอพิษจากโรงงานอุตสาหกรรม ฝุ่น ควันทูบหรี่ (Moller, et al., 2008) โอโซน ไนโตรไดออกไซด์ ไนโตรเจนไดออกไซด์ จากการรับประทานอาหารที่มีสารกันบูด สารแต่งกลิ่น สารแต่งสี สารเพิ่มความกรอบในอาหาร อาหารปิ้งย่างจนเกรียมจัด อาหารรมควัน หรืออาหารที่ปรุงจากน้ำมันใช้ซ้ำหลายๆ ครั้ง (Borek 1997) จากการได้รับแสงแดดจัดเป็นเวลานานๆ จากความร้อน รังสีแกมมา รังสีอัลตราไวโอเล็ตในแสงแดด และรังสีต่างๆ (Rinalducci et al., 2008) และยังสามารถได้รับสารอนุมูลอิสระจากยาบางชนิด เป็นต้น (ภาพประกอบที่ 1.3)



ภาพประกอบที่ 1.3 แสดงแหล่งของอนุมูลอิสระ

## 2. การใช้ประโยชน์ของอนุมูลอิสระในร่างกาย

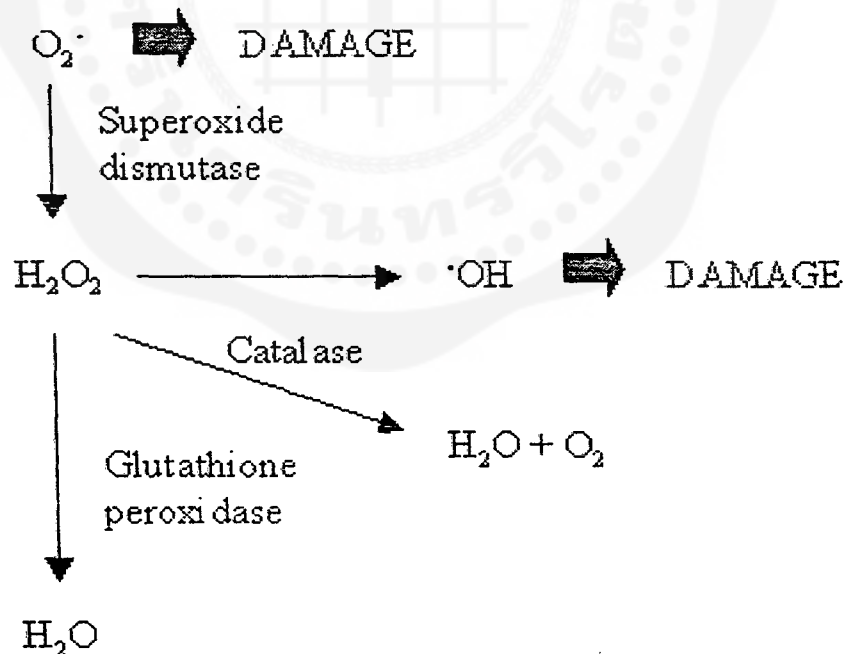
ร่างกายใช้อนุมูลอิสระจำนวนหนึ่งในการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ กล่าวคืออนุมูลอิสระบางชนิด เช่น  $NO^{\cdot}$  และ  $O_2^{\cdot-}$  ถูกสร้างขึ้นในปริมาณมากในเซลล์ที่ติดเชื้อ เพื่อใช้กำจัดไวรัส และแบคทีเรียที่รุกราน (Bakdash & Williams, 2008) ใช้ในการแปลงสัญญาณจากภายนอกเซลล์ (signal transduction) เพื่อควบคุมการปิดและเปิดการทำงานของยีน ใช้ในการควบคุมการตายของเซลล์แบบ apoptosis (Sawada et al., (2008) ใช้ในการฆ่าเซลล์มะเร็ง ยารักษาโรคมะเร็งบางชนิดมีกลไกที่สามารถเพิ่มปริมาณอนุมูลอิสระเพื่อใช้ฆ่าเซลล์มะเร็ง

### 3. ระบบที่ควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระในร่างกายให้อยู่ในสมดุล

จากที่กล่าวมาแล้วว่าอนุมูลอิสระถูกสร้างขึ้นเองทั้งจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของร่างกาย และในภาวะที่ผิดปกติ เช่น ภาวะของโรค หรือภาวะที่ร่างกายแวดล้อมด้วยมลพิษ โดยในภาวะที่ผิดปกติจะส่งผลให้ร่างกายเกิดการสะสมของอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น ซึ่งเป็นอันตราย ดังนั้นร่างกายจึงต้องมีระบบที่ปกป้องตัวเองจากการถูกทำลาย (defense system) โดยทำหน้าที่ควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระให้อยู่ในสมดุล ประกอบด้วยเอนไซม์ และสารบางชนิด ดังนี้

#### 3.1 เอนไซม์

ประกอบด้วยเอนไซม์ 3 ชนิดทำงานต่อเนื่องกัน เป็นกลไกสำคัญขั้นแรกในการควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระให้อยู่ในสมดุล เริ่มจากเอนไซม์ ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (Superoxide dismutase, SOD) เปลี่ยนอนุมูล  $O_2^{\cdot-}$  ไปเป็น  $H_2O_2$  ซึ่งต้องถูกกำจัดออกไปทันทีเพื่อป้องกันไม่ให้เปลี่ยนเป็นอนุมูล  $\cdot OH$  ที่อันตรายมากขึ้น เอนไซม์ที่ใช้กำจัด  $\cdot OH$  มี 2 ชนิด คือ คาตาเลส (catalase) และกลูตาไทโอนเปอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase) โดยเปลี่ยน  $\cdot OH$  ไปเป็น  $H_2O$  (ภาพประกอบที่ 1.4) นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์กลุ่มนี้มีโลหะเป็นองค์ประกอบ เช่น ทองแดงและสังกะสีเป็นส่วนประกอบของเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส และซีลีเนียมเป็นส่วนประกอบหนึ่งของเอนไซม์กลูตาไทโอนเปอร์ออกซิเดส (Michiels et al., 1994)



ภาพประกอบที่ 1.4 การทำงานของเอนไซม์ 3 ชนิดที่ช่วยควบคุมระดับอนุมูลอิสระให้อยู่ในสมดุล

### 3.2 โพรตีน

โพรตีนกลุ่มนี้ทำหน้าที่ป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระ (preventive antioxidant) เนื่องจากสามารถจับ (chelate) กับโลหะทรานซิชัน เช่น เหล็ก และ ทองแดง กลายเป็นโพรตีนเชิงซ้อน ทำให้ช่วยลดการสร้างอนุมูลอิสระที่ถูกเร่งโดยโลหะ (metal-catalyzed free radicals) ) เช่น สามารถลดการสร้างอนุมูล  $\cdot\text{OH}$  ซึ่งถูกเร่งให้สร้างเมื่อมีเหล็กหรือทองแดงอยู่ด้วย (สมการที่ 1.3) สารที่เร่งปฏิกิริยาการเกิดหรือเปลี่ยนเป็นอนุมูลอิสระจะเรียกว่า โปรออกซิแดนซ์ (pro-oxidant) ตัวอย่างโพรตีนประเภทนี้ได้แก่โพรตีนที่จับเหล็ก เช่น ทรานส์เฟอร์ริน (transferrin) เฟอริติน (ferritin) และแลคโตเฟอร์ริน (lactoferrin) ตัวอย่างโพรตีนที่จับทองแดง เช่น เซรูโลพลาสมีน (ceruloplasmin) และอัลบูมิน (albumin) เป็นต้น (Halliwell & Gutteridge, 1992)

### 3.3 สารต้านอนุมูลอิสระ

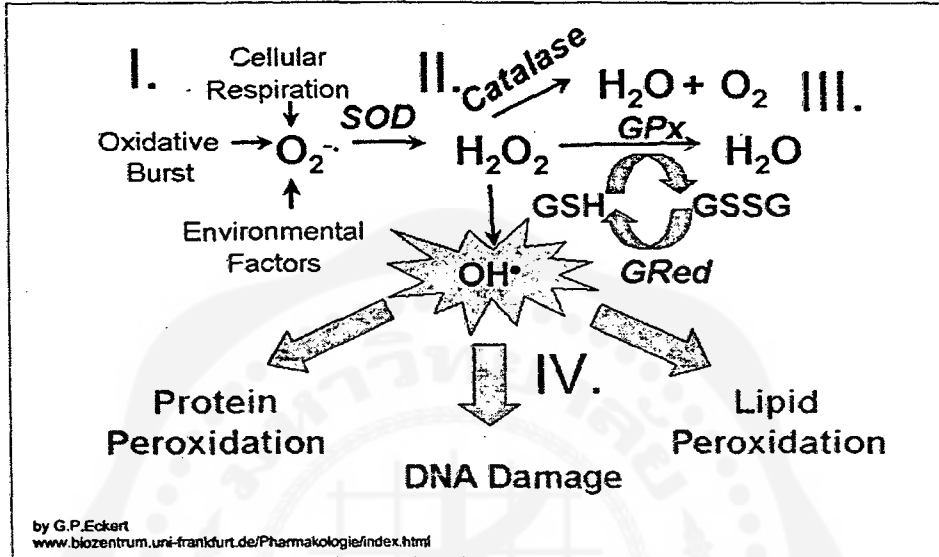
สามารถแบ่งสารต้านอนุมูลอิสระตามกลไกการยับยั้งได้เป็น 2 ชนิด คือ สารที่กำจัดอนุมูลอิสระ (free radical scavenging) ให้หมดไป เช่น กรดยูริก (uric acid) และ บิลิรูบิน (bilirubin) และสารที่หยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain breaking antioxidant) เช่น วิตามินอี วิตามินซี กลูตาไทโอน (glutathione) เบตาแคโรทีน ยูบิควิโนน (ubiquinone หรือ coenzyme  $\text{Q}_{10}$ ) และ กรดไลโปอิก (lipoic acid) สารในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่ได้มาจากผักและผลไม้ (Stahl & Sies, 2005) และจากบางส่วนของพืช เช่น จากเมล็ดคองุ่น จากเปลือกต้นสน (Jayaprakasha et al., (2001)

นอกจากสารดังกล่าวแล้ว ในพืช ผัก และสมุนไพร ยังมีสารต้านอนุมูลอิสระชนิดอื่นอยู่ด้วย โดยสารกลุ่มนี้มีฟอสฟีนอลเป็นองค์ประกอบสำคัญ เรียกว่า ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) พบได้ในพืชต่างๆ มีจำนวนชนิดถึงกว่า 5,000 ชนิด แบ่งตามโครงสร้างทางเคมีได้เป็นอย่างน้อย 10 กลุ่ม ฟลาโวนอยด์ที่มีการศึกษากันอย่างกว้างขวาง ได้แก่ เคอร์ซีติน (quercetin) และคาเทชิน (catechin) พบมากในใบชา ซึ่งจะได้อีกถึงรายละเอียดในหัวข้อถัดไป

## 4. ผลเสียหายของการมีอนุมูลอิสระเกินในร่างกาย

ในบางสภาวะ ร่างกายมีปริมาณอนุมูลอิสระมากเกินไปที่ระบบป้องกันจะควบคุมให้อยู่ในสมดุลได้ ทำให้เกิดสภาวะ oxidative stress ที่เซลล์ถูกบีบคั้นจากการถูกออกซิไดส์ขึ้นในเซลล์ ส่งผลให้เกิดความเสียหายต่อชีวโมเลกุลที่สำคัญในการดำรงชีพ ชีวโมเลกุลที่เป็นเป้าหมาย คือ ลิพิด โพรตีน และดีเอ็นเอ (ภาพประกอบที่ 1.5) หากเสียหายมากจะนำไปสู่การตายของเซลล์ ซึ่งมีกลไก 2 ชนิด คือ กลไกการตายของเนื้อเยื่อหรือเซลล์จากสารพิษหรือจากเชื้อโรคต่างๆ เรียกว่าตายแบบ necrosis และกลไกการตายตามอายุขัย ตามธรรมชาติของเซลล์นั้นๆ โดยการทำลายตัวเอง (cell suicide) เรียกว่าตายแบบ apoptosis

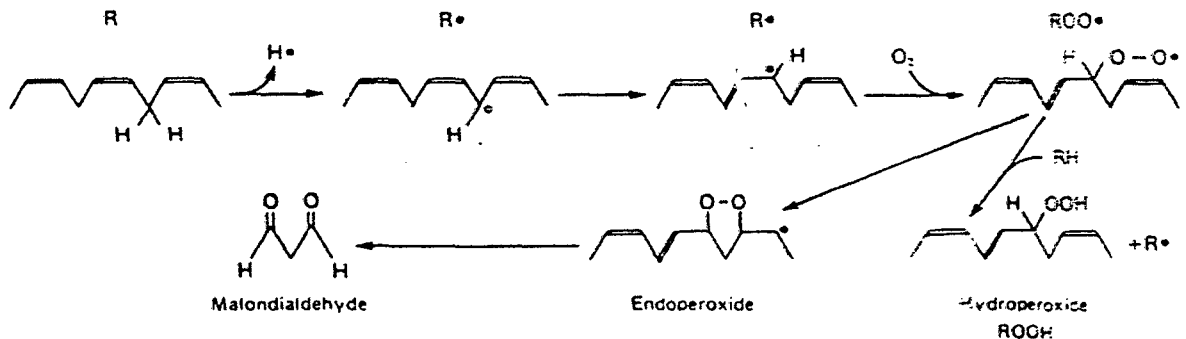
การตายแบบ necrosis เซลล์จะบวมหรือพองตัวและแตกออก ทำให้องค์ประกอบและสิ่งที่อยู่ภายในเซลล์ เช่น เอนไซม์คาตาเลส เอนไซม์กลูตาไทโอนเปอร์ออกซิเดส รวมทั้งโปรออกซิแดนท์ต่างๆ กระจายออกมายังบริเวณที่ล้อมรอบ ทำให้มีผลกระทบต่อเซลล์อื่นๆ ที่อยู่ใกล้เคียง ส่วนการตายแบบ apoptosis ไม่มีการปล่อยองค์ประกอบดังกล่าวออกมาจึงไม่รบกวนเซลล์ข้างเคียง แต่อย่างไรก็ตามอาจไปเร่งหรือก่อให้เกิดโรคบางโรค เช่น ที่เกี่ยวกับการเสื่อมของระบบประสาท



ภาพประกอบที่ 1.5 การเกิดอนุมูลอิสระมากเกินไประบบป้องกันของร่างกาย จะนำไปสู่สภาวะ oxidative stress เกิดการทำลายชีวโมเลกุลของร่างกาย

4.1 ผลเสียหายต่อลิพิด

ความเสียหายของอนุมูลอิสระต่อลิพิดที่พบได้ง่าย คือการเกิดเปอร์ออกซิเดชันของลิพิดตรงตำแหน่งคาร์บอน -CH<sub>2</sub> ที่คั่นอยู่ระหว่าง 2 พันธะคู่ของกรดไขมันไม่อิ่มตัวซึ่งเป็นองค์ประกอบในฟอสโฟลิพิดและไกลลิพิดของเยื่อเซลล์ (Niki et al., 2005) ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ ขั้นเริ่ม (initiation) ขั้นเพิ่มทวี (propagation) และขั้นหยุด (initiation) ดังสมการที่ 1.4



..... สมการที่ 1.4

ขั้นเริ่มต้น คือการเกิดอนุมูลลิพิด ( $R^\bullet$ ) จากกรดไขมันไม่อิ่มตัว ( $R$ ) แล้วเข้าสู่ขั้นเพิ่มทวีคูณ โดยอนุมูลลิพิด  $R^\bullet$  จะทำปฏิกิริยากับ โมเลกุลออกซิเจนอย่างรวดเร็วเกิดเป็นอนุมูลลิพิดเปอร์ออกซิล (lipid peroxy radical,  $ROO^\bullet$ ) อนุมูล  $ROO^\bullet$  ที่เกิดขึ้นสามารถทำปฏิกิริยาต่อไปกับลิพิด โมเลกุลอื่น ( $RH$ ) กลายเป็นลิพิดไฮโดรเปอร์ออกไซด์ ( $ROOH$ ) และอนุมูลลิพิด  $R^\bullet$  เกิดใหม่ จึงมีอนุมูล  $R^\bullet$  ที่เพิ่มขึ้นเข้าสู่จรวดเกิดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ จากการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ทำให้อนุมูลเพียง 1 อนุมูลสามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับ โมเลกุลอีกมากมาย นับเป็นจำนวนหลายร้อยโมเลกุลก่อนสิ้นสุดปฏิกิริยา และขั้นหยุดเกิดขึ้นเมื่อ 2 อนุมูลทำปฏิกิริยากันเองกลายเป็นผลิตภัณฑ์ที่ไม่เป็นอนุมูลอิสระ หรือทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น วิตามิน อี วิตามิน ซี ฯลฯ

อนุมูล  $ROO^\bullet$  ที่เกิดขึ้นสามารถเปลี่ยนโครงสร้างไปเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายของกระบวนการลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน คือสารประกอบจำพวก แอลดีไฮด์ คีโตน และไฮโดรคาร์บอนต่างๆ เช่น อีเทน (ethane) และเอทิลีน (ethylene) แอลดีไฮด์ที่เป็นผลิตภัณฑ์ของการออกซิไดส์ที่สำคัญคือ มาลอนไดอัลดีไฮด์ (malon dialdehyde, MDA) ปริมาณ MDA ถูกนำมาใช้เป็นตัวชี้วัดการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชันของเซลล์ได้ (Esterbauer et al., 1991) ผลของการที่ลิพิดนับจำนวนหลายร้อยโมเลกุลถูกออกซิไดส์ก่อนสิ้นสุดปฏิกิริยานั้น นำไปสู่การรั่วของเยื่อเซลล์และเยื่อหุ้มออร์แกเนลล์ (organelle) ต่างๆ

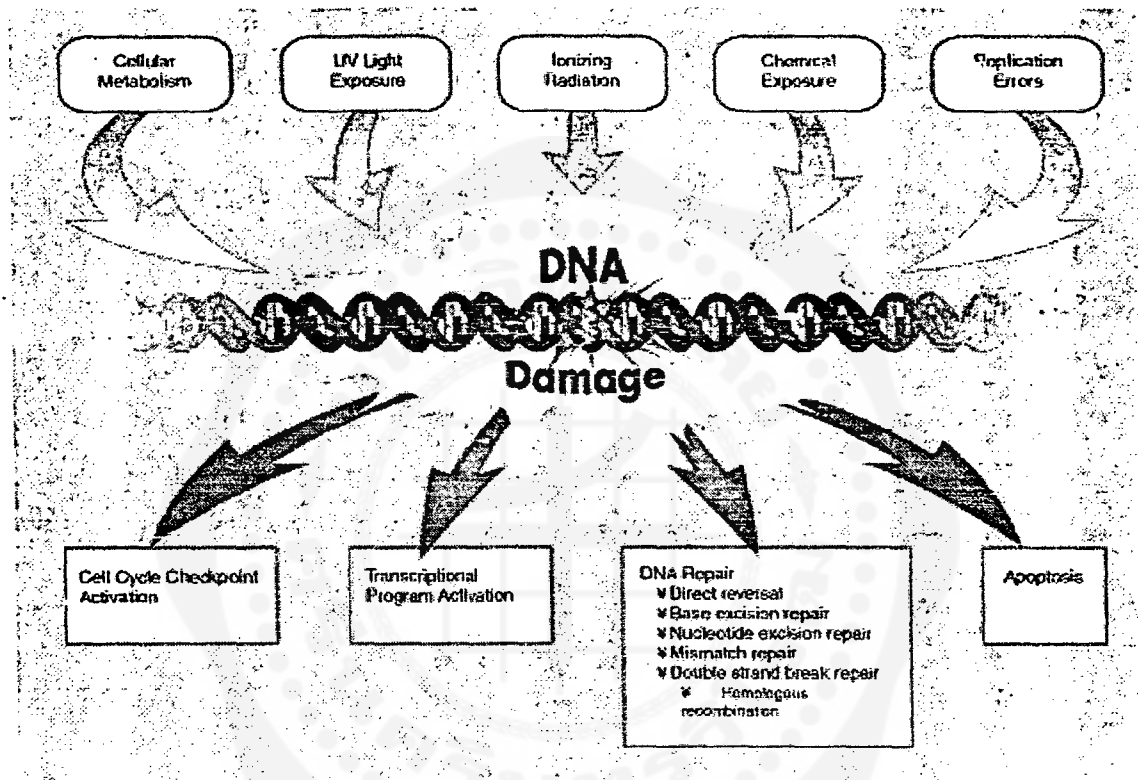
อย่างไรก็ตามความเสียหายอันเนื่องมาจากลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน อาจไม่ได้เกิดขึ้นเฉพาะกับเยื่อเซลล์เท่านั้น ยังอาจเกิดขึ้นได้กับตัวขนส่งลิพิดในเลือดคือ low density lipoprotein, (LDL) และลิพิดในของเหลวของร่างกายต่างๆ และยังอาจขยายวงกว้างไปองค์ประกอบอื่น ๆ ในเซลล์ที่สามารถนำไปสู่การตายของเซลล์

#### 4.2 ผลเสียหายต่อโปรตีน

โปรตีนมีบทบาทแทบทุกกระบวนการในร่างกาย เช่น เป็นเอนไซม์ใช้ในการเร่งปฏิกิริยา เป็นตัวขนส่งสาร เป็นตัวดักจับ เป็นตัวควบคุมการเจริญเติบโตและพัฒนาการของเซลล์ ฯลฯ ดังนั้นการออกซิไดส์โปรตีนโดยเฉพาะที่บริเวณสำคัญ เช่น active site ของเอนไซม์ จึงมีผลกระทบต่อการทำงานของร่างกาย การออกซิไดส์โปรตีนเกิดจากการที่กรดอะมิโนบางชนิดถูกออกซิไดส์ เช่น ฮิสติดีนกลายเป็นออกซิฮิสติดีน หรือเมไทโอนีนกลายเป็นเมไทโอนีนซัลฟอกไซด์ หรือเกิดการออกซิไดส์ระหว่างหมู่ -SH ในซิสเทอีน 2 หมู่กลายเป็นพันธะไดซัลไฟด์ (-S-S) การเปลี่ยนแปลงอันเนื่องมาจากการออกซิเดชันของโปรตีนดังกล่าว จึงมีผลทำให้เอนไซม์ ตัวดักจับ และสารที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบไม่สามารถทำงานได้ตามปกติหรือมีประสิทธิภาพการทำงานลดลง (Stadtman, 1992)

### 4.3 ผลเสียหายต่อดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอเป็นรหัสพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต การเกิดความเสียหายแก่ดีเอ็นเอโดยอนุมูลอิสระจะก่อให้เกิดการกลายพันธุ์และนำไปสู่โรคมะเร็ง อนุมูลอิสระจะออกซิไดส์เบสหรือน้ำตาล ซึ่งเป็นองค์ประกอบของนิวคลีโอไทด์ในดีเอ็นเอ ส่งผลให้ดีเอ็นเอเปลี่ยนโครงสร้างไปในลักษณะต่างๆ อย่างไรก็ตามร่างกายมีการตอบสนองเพื่อให้พ้นจากอันตราย โดยมีระบบที่ตรวจและซ่อมความผิดปกติในหลายระดับ หรือหากเสียหายมากจะทำให้เกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis (ภาพประกอบที่ 1.6)



ภาพประกอบที่ 1.6 การตอบสนองของเซลล์ในระดับต่างๆ เมื่อดีเอ็นเอถูกทำลาย

หากร่างกายไม่สามารถซ่อมแซมได้ จะทำให้เกิดความผิดปกติของดีเอ็นเอขึ้น เช่น สายของดีเอ็นเอขาดไป (DNA strand break) การจับคู่เบสในดีเอ็นเอผิดไป การเรียงลำดับของนิวคลีโอไทด์ผิดไป การหายไปของนิวคลีโอไทด์ หรือดีเอ็นเอบางส่วน การมีนิวคลีโอไทด์หรือดีเอ็นเอบางส่วนเข้าสอดแทรก และการเพิ่มขึ้นของดีเอ็นเอ เป็นต้น อนุมูลอิสระจึงเป็นตัวการสำคัญที่ก่อให้เกิดความเสียหายแก่ดีเอ็นเอ (DNA damage) (Marnett, 2000; Franco, et al., (2008)

อนุมูลอิสระต่างชนิดกันจะมีผลต่อดีเอ็นเอในรูปแบบที่แตกต่างกัน เช่น อนุมูล  $\cdot\text{OH}$  เป็นอนุมูลที่มีความแรงสูง จะเข้าไปออกซิไดส์เบสเพียวรีนหรือไพริมิดีนและน้ำตาลคือออกซิไรโบสได้ ผลิตภัณฑ์หลากหลายรูปแบบ เป็นผลให้มีการจับคู่ของเบสคู่สมผิดไป ที่มีการศึกษากันมากคือนิวคลีโอไซด์

กวานโนซีนถูกออกซิไดส์ไปเป็น 8-ไฮดรอกซี-ดีออกซีกวานโนซีน (8-OH-deoxyguanosine, 8-OH-dG) ทำให้การจับคู่ของเบสเปลี่ยนจาก GC ไปเป็น TA พบในยีน p53 ในมะเร็งปอดและมะเร็งตับ (Cooke et al., 2003) อนุมูล  $O_2^{\cdot-}$  จะทำปฏิกิริยาเฉพาะกับเบส กวานีนเท่านั้น ส่วน  $H_2O_2$  ไม่ทำปฏิกิริยากับเบสในดีเอ็นเอ ในตริกออกไซด์และสารออกซิไดส์อื่นๆ ที่มีฤทธิ์แรง เช่น  $NO_2^{\cdot-}$ ,  $ONOO^-$ ,  $N_2O$ , และ  $HNO_2$  ทำให้เกิดปฏิกิริยาการที่มีหมู่ในโตรหรือหมู่เอมีนอยู่ในโครงสร้างของเบส จึงทำให้ยีนเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมเกิดการก่อกลายพันธุ์ขึ้น (Kow, 2002) อีกปฏิกิริยาหนึ่งคือการให้หมู่เมทิล (methylation) แก่เบสในดีเอ็นเอมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการแสดงออกของยีน ในขั้นตอนการเกิดมะเร็งพบว่าการเกิดปฏิกิริยาให้หมู่เมทิลเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม (Patz, 2008)

## 5. โรคที่เกิดจากอนุมูลอิสระ

จะเห็นได้ว่าการมีอนุมูลอิสระเกินสมดุล จะก่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่สร้างความเสียหายแก่ชีวโมเลกุลต่างๆ ของร่างกาย เช่น เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับลิพิดโดยเฉพาะที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อเซลล์ เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับโปรตีนซึ่งอาจเป็นเอนไซม์ เป็นตัวดื้อรับ (receptor) หรือสารสื่อประสาท (neurotransmitter) ฯลฯ และที่เป็นอันตรายยิ่งคือเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับดีเอ็นเอซึ่งจะก่อให้เกิดการกลายพันธุ์และนำไปสู่มะเร็งในที่สุด (Halliwell & Gutteridge, 1999)

สภาวะ oxidative stress จึงทำให้เกิดการทำลายทั้งเยื่อหุ้มเซลล์และตัวเซลล์เอง ทำให้เซลล์เสื่อมสภาพเร็วกว่าปกติ ก่อให้เกิดความชราก่อนวัย (Bulteau et al., 2006) เกิดโรคแห่งความเสื่อมของร่างกาย เช่น โรคผนังหลอดเลือดแข็งตัว โรคหัวใจ ต้อกระจก การอักเสบของผิวหนัง นอกจากนี้ยังเป็นปัจจัยที่ทำให้โรคพัฒนาไปอย่างรวดเร็วและรุนแรงขึ้น โดยเฉพาะโรคที่เกี่ยวกับความเสื่อมและความบกพร่องของเซลล์ประสาท และระบบสื่อประสาทในสมอง โรคมะเร็ง (ตารางที่ 1.2) (Sundaramahalingam et al et al., 2006, Halliwell, 2002:)

ตารางที่ 1.2 สภาวะทางคลินิกที่เกิดจากการทำลายโดยอนุมูลอิสระ

### Clinical Conditions Associated With Free Radical Damage

- Alzheimer's
- Amyotrophic Lateral Sclerosis
- Arthritis
- Atherosclerosis
- Cancer
- Cataracts
- Chronic Gout
- Chronic Obstructive Pulmonary Disease
- Diabetes
- Coronary Artery Disease
- Heart Failure
- Hypertension
- Inflammatory Bowel Disease
- Macular Degeneration
- Multiple Sclerosis
- Parkinson's
- Raynaud's Phenomenon
- Reperfusion Injuries

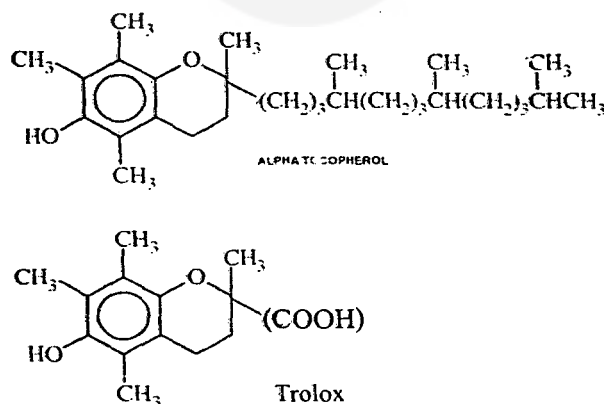
เนื่องจากดีเอ็นเอเป็นตัวถ่ายทอดข้อความทางพันธุกรรมจากรุ่นหนึ่งไปยังอีกรุ่นหนึ่ง ดังนั้นการเกิดความเสียหายของดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาออกซิเดชันจึงได้รับความสนใจมาก ทั้งนี้เพราะจะนำไปสู่ความสัมพันธ์ระหว่างความเสียหายจากการถูกออกซิไดส์กับความชราและโรคมะเร็ง การทำการวิจัยในขอบข่ายนี้จะช่วยให้เห็นความชัดเจนเกี่ยวกับการเสียหายของดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาออกซิเดชันและทำให้ทราบถึงความสามารถของการป้องกันการเสียหายดังกล่าวโดยสารต้านอนุมูลอิสระในธรรมชาติ

## 6. สารต้านอนุมูลอิสระที่ใช้ในการวิจัย

เมื่อมีอนุมูลอิสระมากเกินไปในร่างกายจะมีระบบต้านอนุมูลอิสระใช้ทำลายอนุมูลอิสระที่มากเกินไป ซึ่งมีทั้งที่จัดเป็นเอนไซม์ และไม่จัดเป็นเอนไซม์ แต่จากการศึกษาพบว่า แม้จะมีระบบต้านอนุมูลอิสระในร่างกายแล้ว ก็ยังคงไม่เพียงพอ ดังนั้นร่างกายจึงต้องการสารต้านอนุมูลอิสระจากภายนอก เช่น จากวิตามินซี, วิตามินอี หรือ เบตา-แคโรทีน จากพืช ผักและผลไม้หลายชนิด และปัจจุบันพบว่าสารที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระอย่างมีประสิทธิภาพ คือสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ซึ่งจัดเป็นสารพอลิฟีนอล (polyphenols) ในที่นี้จะกล่าวถึงสารต้านอนุมูลอิสระที่ใช้ในการวิจัยนี้ 2 ชนิดคือ อนุพันธ์ของวิตามินอี ชื่อว่า โทรลอกซ์ (Trolox) และฟลาโวนอยด์ในใบชา

### 6.1 โทรลอกซ์ (Trolox)

เป็นอนุพันธ์ของวิตามินอีที่พัฒนาขึ้นเพื่อให้ละลายน้ำได้ (ภาพประกอบที่ 1.7) การออกฤทธิ์จึงเหมือนกับวิตามินอีแต่จะเร็วกว่า เป็นที่รู้จักกันโดยทั่วไปว่า วิตามินอีหรือโทโคฟีรอล (tocopherol) สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดีมากทั้งในพืชและสัตว์ วิตามินอีละลายได้ดีในน้ำมันหรือลิพิด ดังนั้นจึงสามารถผ่านเยื่อเซลล์ได้ วิตามินอีช่วยปกป้องเยื่อเซลล์จากอนุมูลอิสระ โดยออกฤทธิ์ต้านลิพิดเปอร์ออกซิเดชันของเยื่อเซลล์ กล่าวคือวิตามินอีจะให้อะตอมไฮโดรเจนที่สามารถจับกับลิพิดเปอร์ออกซิด (ROO<sup>•</sup>) จึงขาดอนุมูลที่จะเข้าโจมตีลิพิดโมเลกุลข้างเคียง ทำให้ชั้นเพิ่มทวีของลิพิดเปอร์ออกซิเดชันหยุดลง (Wang & Quin, 1999)



ภาพประกอบที่ 1.7 แสดงโครงสร้างวิตามินอีและ โทรลอกซ์ (trolox)

## 6.2 สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compound)

พบได้มากในพืชพันธุ์ธรรมชาติทั่วไป เช่น พืช ผัก ผลไม้ ใบชา ชอกโกแล็ต และไวน์แดง เป็นต้น ปัจจุบันพบสารประกอบฟีนอลิกได้มากกว่า 8,000 ชนิด (Harborne, 1993) แบ่งตามความซับซ้อนของโครงสร้างจากง่ายไปจนถึงซับซ้อนเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

1.) กลุ่มฟีนอล (simple phenolic compound) มีโครงสร้างง่ายที่สุดคือเป็นอนุพันธ์ของฟีนอล เช่น กรดแกลลิก (gallic acid) กรดคาเฟอิก (caffeic acid)

2.) กลุ่มพอลิฟีนอล (polyphenolic compound) เป็นกลุ่มที่มีปริมาณมากที่สุดถึง 2/3 ของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด มีโครงสร้างพื้นฐานเป็นฟลาเวน (flavan) กล่าวคือมีวงเบนซีน 2 วง (วง A และวง B) จับกับคาร์บอนที่ติดกัน 3 อะตอมซึ่งอาจจับกับอะตอมออกซิเจนต่อกันเป็นวง (ภาพประกอบที่ 8 ก.) อาจเรียกสารกลุ่มนี้ว่าฟลาโวนอยด์ จากโครงสร้างพื้นฐานนี้อาจมีหมู่มาต่อเป็นอนุพันธ์ อีเทอร์ คีโตน รวมทั้งอาจมีหมู่ไฮดรอกซิลแทนที่บนวงเอโรแมติกในโมเลกุล ทำให้สามารถแบ่งฟลาโวนอยด์ออกเป็น 6 กลุ่มย่อย (subclass) (ภาพประกอบที่ 1.8 ข) ได้แก่

- ฟลาวาโนน (flavanone) ตัวอย่างเช่น hesperetin, tangeretin
- ฟลาโวนอล (flavonol) ตัวอย่างเช่น quercetin, kaempferol
- ฟลาวานอล (flavanol) ตัวอย่างเช่น epicatechin, catechin
- ฟลาโวน (flavone) ตัวอย่างเช่น luteolin, apigenin
- ไอโซฟลาโวน (isoflavone) ตัวอย่างเช่น genistein, daidzein
- แอนโทไซยานิน (anthocyanin) ตัวอย่างเช่น delphinidin, cyanidin

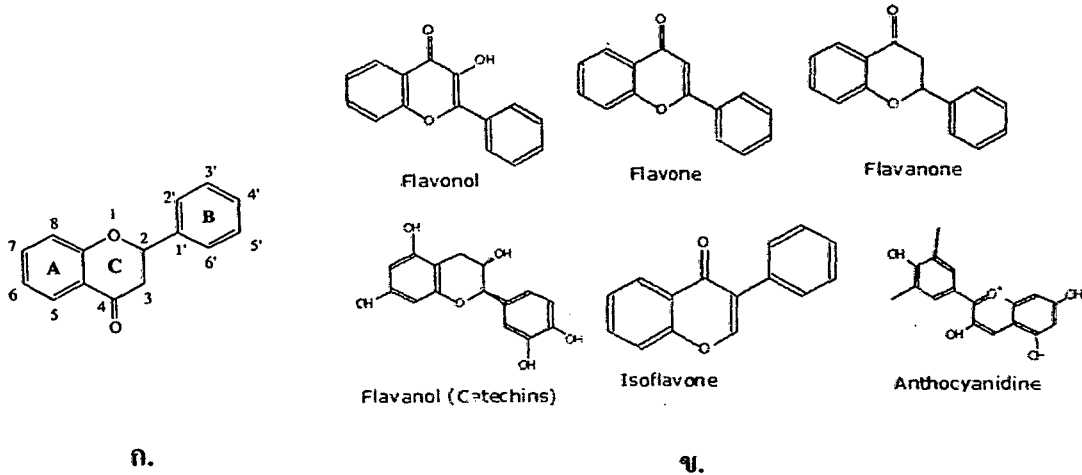
3.) กลุ่มฟลาโวนอยด์เชิงซ้อน (complex flavonoids) เป็นพอลิเมอร์ของฟลาโวนอยด์ หรืออาจเรียกว่า โปรแอนโทไซยานิน (proanthocyanin) เช่น แทนนิน (tannin) ลิกนิน (lignin)

สารประกอบฟีนอลิกอาจจับกับน้ำตาล 1, 2 หรือมากกว่ากลายเป็นสารประกอบไกลโคไซด์ (glycoside) หรืออาจจับกับลิพิด เอมีน หรือกรดคาร์บอกซิลิก สารประกอบไกลโคไซด์เมื่อไม่จับกับน้ำตาลใดๆ จะเรียกว่าอะไกลโคน (aglycone)

## 7. ฟลาโวนอยด์

### 7.1 แหล่งที่พบ

สารกลุ่มฟลาโวนอยด์พบได้ทั่วไปในพืช ผัก และผลไม้ เช่น ใบชา พืชตระกูลส้ม องุ่น แอปเปิ้ล บรอกโคลี เป็นต้น และพบในทุกส่วนของพืชไม่ว่าจะเป็น ใบ ราก เนื้อไม้ เปลือกไม้ ดอก ผล หรือเมล็ด เป็นสารที่ทำให้ดอกหรือผลมีสีสวย เช่น สีเหลือง ชมพู แดง ฟ้า หรือม่วง และในทางเภสัชวิทยาฟลาโวนอยด์จัดเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพสูง ช่วยในการป้องกันและรักษาโรคต่างๆ เช่น โรคเกี่ยวกับหัวใจและหลอดเลือด ฤทธิ์ต้านมะเร็ง ด้านแบคทีเรีย ด้านการอักเสบ เป็นต้น (Havsteen, 2002)



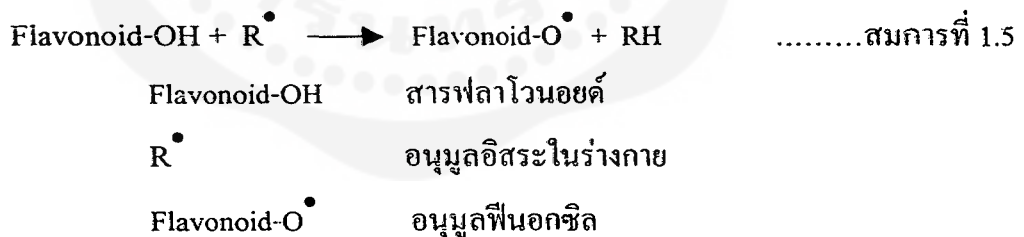
ภาพประกอบที่ 1.8 โครงสร้างของฟลาโวนอยด์

ก. โครงสร้างพื้นฐานฟลาเวอน

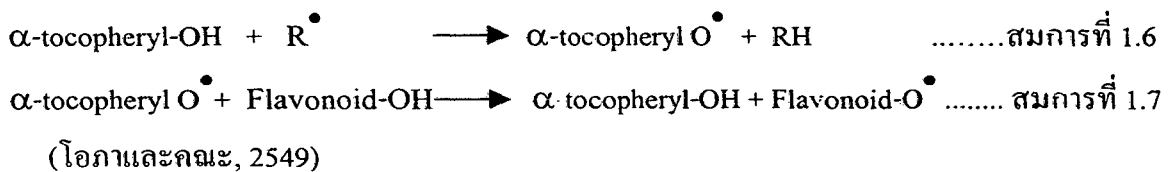
ข. โครงสร้างหลักของฟลาโวนอยด์กลุ่มย่อยต่างๆ

7.2 กลไกการออกฤทธิ์

ฟลาโวนอยด์มีกลไกการออกฤทธิ์เป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain breaking antioxidant) กล่าวคือจะกำจัดอนุมูลอิสระเปอร์ออกซิล (ROO<sup>•</sup>) และอนุมูลอัลคอกซิล (alkoxyl radical) โดยทำหน้าที่เป็นตัวให้ไฮโดรเจนแก่อนุมูลเหล่านั้น(สมการที่ 1.5) หลังจากที่ฟลาโวนอยด์ถูกออกซิไดส์ จะกลายเป็นฟลาโวนอยด์ฟีนอกซิลซึ่งมีความเสถียรกว่า



นอกจากนี้ฟลาโวนอยด์ยังช่วยเสริมการออกฤทธิ์ของวิตามินอี โดยช่วยรีดิวส์อนุมูลของวิตามินอี ในรูป α-tocopheryl กลับไปเป็นวิตามินอีซึ่งทำหน้าที่ต้านอนุมูลอิสระได้ ดังสมการที่ 1.6 และ 1.7



## 8. ใบชา

ชาเป็นเครื่องดื่มสมุนไพรชนิดหนึ่งที่เป็นที่รู้จักกันมานานกว่า 4000 ปี และบริโภคกันอย่างแพร่หลายโดยเฉพาะประเทศทางแถบเอเชีย ประเทศที่ผลิตชาเป็นหลักได้แก่ อินเดีย จีน ญี่ปุ่น ศรีลังกา อินโดนีเซีย และตอนกลางของทวีปแอฟริกา ชา มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Camellia sinensis* แบ่งสายพันธุ์ย่อยออกเป็นสองกลุ่มหลัก คือ *C. sinensis* var. *sinensis* อาจเรียกว่าเป็นสายพันธุ์ “ชาจีน” และ *C. sinensis* var. *assamica* หรือเรียกว่าสายพันธุ์ “ชาอัสสัม”

### ชาสายพันธุ์ *sinensis* (ชาจีน)

ปลูกกันมากในจังหวัดเชียงราย พันธุ์ที่นิยมปลูก คือ ชาพันธุ์อุหลงก้านอ่อน ชาพันธุ์อุหลงเบอร์ 12 ชาพันธุ์ ชิงชิงอุหลง ชาพันธุ์ ถิกวนอิม และ ชาพันธุ์ สี่ฤดู ชาสายพันธุ์จีนเหล่านี้ต้องการการดูแลมาก ต้องมีการจัดการน้ำและการเกษตรอย่างเป็นระบบ ทำให้มีราคาค่อนข้างสูง

### ชาสายพันธุ์ *assamica* (ชาอัสสัม)

มีแหล่งกำเนิดมาจากประเทศอินเดีย เป็นชาพื้นเมืองปลูกมากในจังหวัดเชียงราย ชาอัสสัมมีใบชาที่มีขนาดใหญ่กว่าสายพันธุ์ชาจีน เป็นพันธุ์ชาที่เจริญเติบโตได้ดีตามป่าที่มีร่มไม้ และแสงแดดผ่านได้พอประมาณ ดูแลรักษาง่ายกว่าสายพันธุ์ชาจีน ทำให้ต้นทุนการผลิตชาไม่สูงมากนัก และใบชาที่ใ้สามารถนำไปผลิตเป็น ชาเขียว ชาอุหลง หรือชาดำได้ วางจำหน่ายมากในท้องตลาด และมีราคาจะต่ำกว่าใบชาสายพันธุ์จีน(พนม, [http://www.mfu.ac.th/division/tea/know/article\\_tea.doc](http://www.mfu.ac.th/division/tea/know/article_tea.doc))

### ฟลาโวนอยด์ในใบชา

ฟลาโวนอยด์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่พบมากในใบชา ฟลาโวนอยด์ที่พบเป็นกลุ่มฟลาวานอล (flavan-3-ol) ซึ่งมีปริมาณสูงถึง 60-80% ของฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในใบชา หรือคิดเป็น 18-32% ต่อน้ำหนักใบชาสด อาจเรียกสารกลุ่มนี้ว่า คาเทชิน (catechin) พบได้ในทุกส่วนของต้นชา แต่จะพบมากบริเวณใบยอดที่หนึ่ง สอง และสามของต้นชา หรือเรียกว่า “สองใบกับหนึ่งยอด” จึงนิยมนำส่วนยอดนี้มาผลิตเป็นชาที่มีคุณภาพดี มีปริมาณคาเทชินสูง สารในกลุ่มนี้มี 8 ชนิดด้วยกัน (Yang, 1993; Finger & Engelhardt, 1992; Leibert et al, 1999) (ภาพประกอบที่ 1.9) ได้แก่

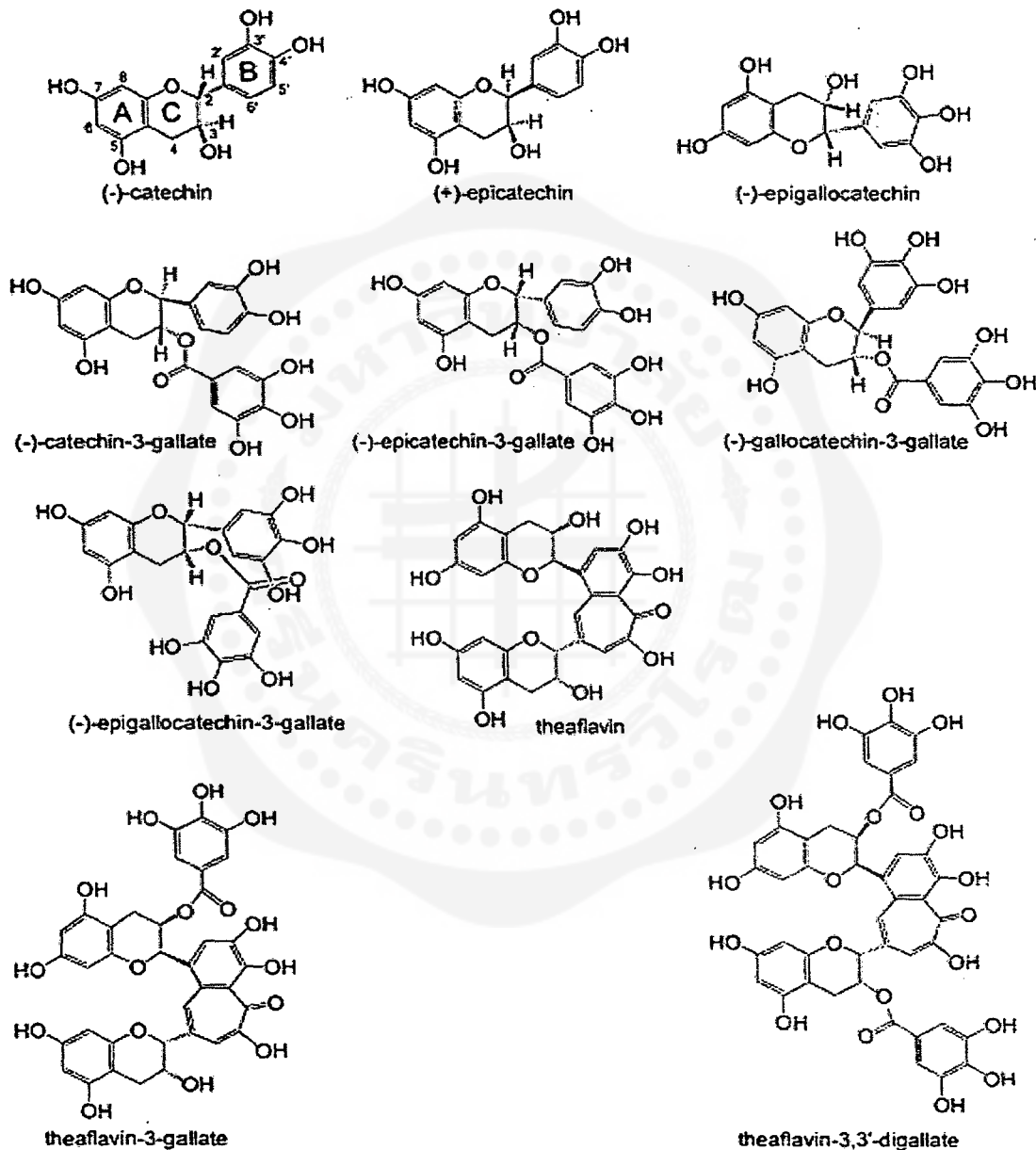
#### Major catechins

- |               |                            |
|---------------|----------------------------|
| 1. (-) – EGCG | Epigallocatechin 3-gallate |
| 2. (-) – EGC  | Epigallocatechin           |
| 3. (-) – ECG  | Epicatechin 3-gallate      |
| 4. (-) – EC   | Epicatechin                |
| 5. (+) – GC   | Gallocatechin              |
| 6. (+) – C    | Catechin                   |

#### Minor catechins

- |              |                       |
|--------------|-----------------------|
| 7. (-) – CG  | Catechin gallate      |
| 8. (-) – GCG | Gallocatechin gallate |

ปริมาณ catechins จะแตกต่างกันไปในใบชาแต่ละสายพันธุ์ โดย EGCG และ ECG จะพบในปริมาณสูงในชา *assamica* ส่วนในชา *sinensis* จะพบ EGC ในปริมาณที่สูงกว่า นอกจากสายพันธุ์ที่แตกต่างกันแล้ว ฤดูกาลเก็บเกี่ยวก็ยังเป็นปัจจัยสำคัญต่อปริมาณพอลิฟีนอล กล่าวคือปริมาณพอลิฟีนอลในใบชาที่เก็บในฤดูร้อนจะสูงกว่าที่เก็บในฤดูใบไม้ผลิ



ภาพประกอบที่ 1.9 โครงสร้างของฟลาโวนอยด์ในใบชา

## 8.1 ประเภทของใบชา

ชาที่จำหน่ายในท้องตลาดแบ่งกว้างๆ เป็น 3 ประเภท ต่างกันที่กระบวนการหมัก และการอบแห้ง (<http://www.orien-tea.com/thai/misc/>) ดังนี้

1. ชาที่มีการหมักอย่างสมบูรณ์ (fermented tea) ตัวอย่าง คือ ชาดำ (black-tea) พันธุ์ชาที่นิยมนำมาผลิต ได้แก่ ชาพันธุ์อัสสัม
2. ชากึ่งหมัก (semi-fermented tea) ตัวอย่าง คือ ชาอูหลง (oolong tea) พันธุ์ชาที่นิยมนำมาผลิตได้แก่ ชาสายพันธุ์จีนทุกชนิด ชาขาว (white tea)
3. ชาที่ไม่มีการหมัก (non-fermented tea) ตัวอย่าง คือ ชาเขียว (green tea) พันธุ์ชาที่นิยมนำมาผลิตได้แก่ชาพันธุ์อัสสัม ชาพันธุ์อูหลงเบอร์ 12 เป็นต้น ชาเหลือง (yellow tea) ชาเขียวเข้ม (dark green tea)

ชาที่คนไทยนิยมบริโภคและมีจำหน่ายกันอย่างแพร่หลายมี 3 ชนิด คือ ชาเขียว ชาอูหลง และชาดำ ซึ่งต่างกันที่กระบวนการหมัก (fermentation) และอบแห้ง กระบวนการหมักที่เกิดขึ้นในระหว่างการผลิตใบชาแห่งนั้น เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ต่างๆ เช่น polyphenol oxidase, catalase, peroxidase และ ascorbic acid oxidase ซึ่งจะเปลี่ยนพอลิฟีนอลในใบชาโดยปฏิกิริยาทางเคมีหลายชนิด เช่น oxidation, hydrolysis, polymerization และ transformation ไปเป็นผลิตภัณฑ์อื่น เช่น theaflavin และ thearubigins เป็นต้น

### ชาเขียว (green tea)

คือชาที่ไม่ผ่านกระบวนการหมักหรือเกิดการหมักน้อยที่สุด ผลิตโดยการนำเอาใบชาสดมาอบด้วยไอน้ำร้อนด้วยความรวดเร็ว ความร้อนจะทำให้เอนไซม์เสียสภาพ ไม่สามารถเปลี่ยนสารกลุ่มพอลิฟีนอล ไปเป็นสารเคมีชนิดอื่น ชาเขียวจึงมีปริมาณคาเทชินคงอยู่สูงเมื่อเทียบกับชาชนิดอื่น การผลิตชาเขียวในจังหวัดเชียงรายนิยมใช้ชาพันธุ์อัสสัม และ ชาพันธุ์อูหลงเบอร์ 12

### ชาอูหลง (oolong tea)

ชาอูหลง มีชื่อที่พ้องกับพันธุ์ชาจีน “ชาอูหลงเบอร์ 12” หรือ “ชาอูหลงก้านอ่อน” แต่ในที่นี้คำว่า “อูหลง” หมายถึงชาที่ผ่านกระบวนการกึ่งหมัก กล่าวคือ ปล่อยให้เกิดการหมักบางส่วน โดยการนำใบชาสดไปผึ่ง (withering) ทั้งแบบกลางแจ้ง (solar withering) และ การผึ่งในร่ม (indoor withering) การผลิตชาอูหลงจะมีวิธีการที่ค่อนข้างปราณีต ละเอียดอ่อน และต้องการผู้เชี่ยวชาญในการดูแลการผลิตอย่างใกล้ชิด รวมทั้งต้องการเทคโนโลยีการผลิตที่ค่อนข้างซับซ้อน เพื่อให้ได้ชาที่มีกลิ่นหอม มีรสชาติดี

### ชาดำ (black tea)

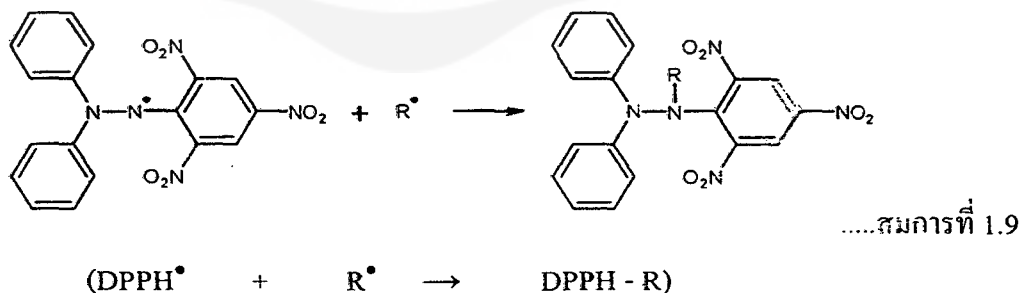
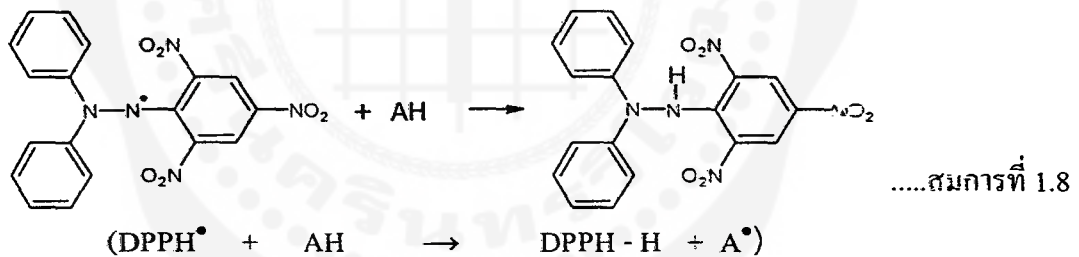
ชาดำ คือชาที่ผ่านกระบวนการหมักอย่างเต็มที่ โดยนำใบชาสดมาผึ่ง นำมานวด และปล่อยให้เกิดการหมักอย่างเต็มที่ ทำให้เกิดปฏิกิริยาเคมีอย่างเต็มที่ ก่อนที่จะมีการอบชาให้แห้งในขั้นตอนสุดท้าย ทำให้สารพอลิฟีนอลในใบชาสดเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์อื่น ได้แก่ theaflavins และ

the arubigins ที่เมื่อขงค้มแล้วจะ ได้ชาที่มีกลิ่นหอม น้ำชาจะมีสีน้ำตาลแดงเข้ม ทำให้เรียกชาดำได้ อีกรอย่างว่า ชาแดง พันธุ์ชาที่ใช้ผลิตชาดำนั้นได้แก่ชาพันธุ์อัสสัมที่ให้รสชาติของชาเข้มข้น และมีกลิ่นหอม ชาดำเป็นชาที่มีผู้บริโภคนสูงสุดในโลกเมื่อเทียบกับชาชนิดอื่น

ในบรรดาใบชาทั้ง 3 ประเภท พบว่าชาดำมีราคาถูกกว่าชาเขียวและชาอูหลง ชาสายพันธุ์จินไม่นิยมนำมาหมักจนเป็นชาดำ เนื่องจากเป็นสายพันธุ์ที่ปลูกและดูแลยากกว่า ทำให้มีราคาแพงกว่า ชาสายพันธุ์อัสสัมเท่านั้นที่นำมาผลิตเป็นใบชาสำหรับเป็นขงเครื่องค้มครบทั้ง 3 ประเภท ค้งกล่าว การวิจัยนี้จึงใช้ตัวอย่างใบชาสายพันธุ์อัสสัม 3 ประเภท คือชาเขียว ชาอูหลง และชาดำ จากผู้ประกอบการรายเดียวกันที่ปลูกในจังหวัดเชียงรายและปลูกในฤดูเดียวกัน เนื่องจากปริมาณคาเทชินจะเปลี่ยนไปตามแหล่งเพาะปลูกและฤดูที่ปลูกและเก็บเกี่ยว

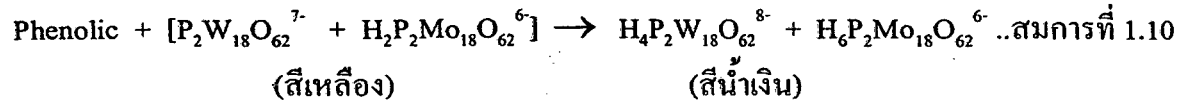
## 9. การวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารค้ตัวอย่าง

การวิเคราะห์มีหลายวิธี แต่ที่นิยมใช้และนำมาใช้ในการวิจัยนี้ คือ การใช้ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH) ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่เสถียรและมีสี โดยนำมาใช้ศึกษาความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารค้ตัวอย่าง DPPH ละลายในเอทานอลได้สารละลายสีม่วง มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 517 nm และเมื่อได้รับอิเล็กตรอนจากสารต้านอนุมูลอิสระ (AH) ค้งสมการที่ 1.8 หรือจากอนุมูลอิสระ (R<sup>•</sup>) ค้งสมการที่ 1.9 จะเปลี่ยนเป็นสารละลายสีเหลือง ที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลง (Blois, 1958)



## 10. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

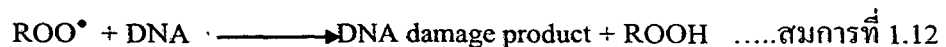
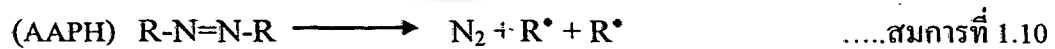
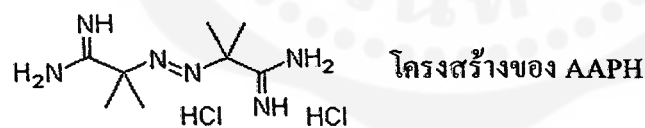
การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ทำโดยใช้ปฏิกิริยาระหว่างสารประกอบฟีนอลิกกับ Folin-Ciocalteu reagent และ  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (Singleton et al., 1999) โดยสารประกอบฟีนอลิกจะทำปฏิกิริยาดังสมการที่ 1.10 และวัดค่าการดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์สีน้ำเงินที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 765 nm เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ gallic acid ที่ใช้เป็นสารประกอบฟีนอลิกมาตรฐาน



## 11. การศึกษาความเสียหายของดีเอ็นเอเนื่องจากการถูกออกซิไดส์

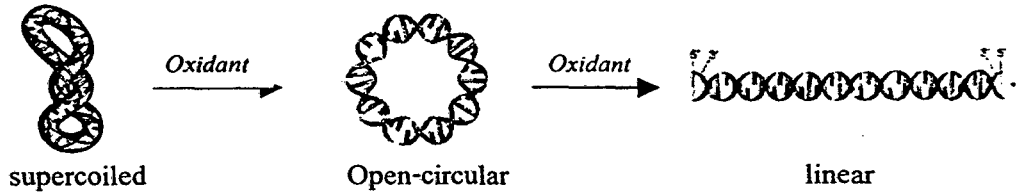
พลาสมิด (plasmid) ถูกนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบเพื่อศึกษาความเสียหายของดีเอ็นเอจากสารอนุมูลอิสระ ตั้งแต่ปี 1987 (Ehrenfeld et al., 1987; Lewis et al., 1988) โดยดัชนีที่วัดความเสียหาย คือการเปลี่ยนรูปร่างของดีเอ็นเอจากเดิมรูป supercoiled ไปเป็นรูป open-circular และรูป linear ตามลำดับ (ภาพประกอบที่ 1.10) (Inouye, 1984 ; Zhang & Omaye, 2001) ผู้วิจัยใช้พลาสมิด pBluescript มีขนาด 2961 basepair เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ เพื่อศึกษาการเสียหายจากสารอนุมูลอิสระ (ภาพประกอบที่ 1.11)

อนุมูลอิสระที่ทำให้เกิดความเสียหายแก่ดีเอ็นเอ คือ 2,2'-azobis (2-amidinopropane hydrochloride, AAPH) มีกลไกการทำงานดังนี้ AAPH เมื่อสลายตัวด้วยความร้อนจะให้ alkyl radicals ( $\text{R}^\bullet$ ) จากนั้น ( $\text{R}^\bullet$ ) จะทำปฏิกิริยากับออกซิเจน ( $\text{O}_2$ ) ให้ alkylperoxyl radicals, ( $\text{ROO}^\bullet$ ) ซึ่งจะเข้าไปออกซิไดส์ดีเอ็นเอ ทำให้ดีเอ็นเอเกิดความเสียหายขึ้น (DNA damage) (Qing-Yi et al, 2006) ดังสมการที่ 1.10-1.12

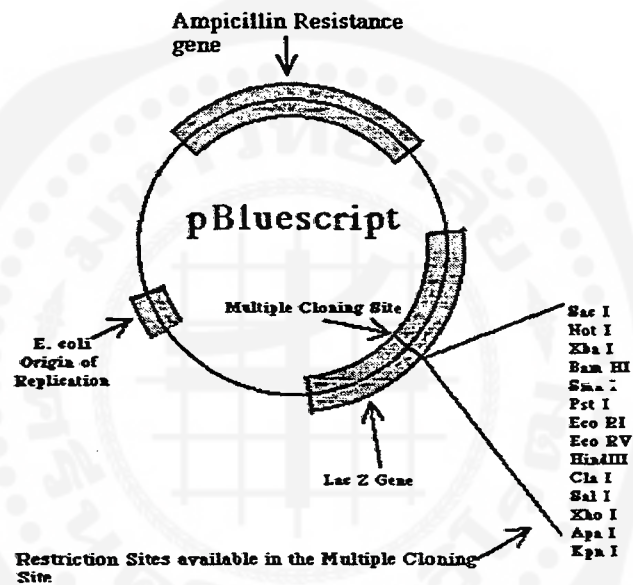


ความเสียหายของดีเอ็นเอ ทำให้ดีเอ็นเอเปลี่ยนรูปจาก supercoiled ไปเป็น open circular และ linear ซึ่งตรวจวัดได้โดยตรวจความเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอทั้ง 3 รูปแบบด้วย Agarose gel electrophoresis โดยดีเอ็นเอรูป supercoiled เคลื่อนที่ไปได้ไกลกว่ารูป linear และ open circular

ตามลำดับ ดังนั้นผู้วิจัยจึงมุ่งศึกษาความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากใบชาทั้ง 3 ประเภทต่อการป้องกันความเสียหายของดีเอ็นเอโดยใช้พลาสมิดเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ



ภาพประกอบที่ 1.10 การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของพลาสมิดเมื่อถูกออกซิไดส์



ภาพประกอบที่ 1.11 โครงสร้างทั่วไปของพลาสมิด pBluescript

ที่มา : [www.bio.davidson.edu/.../Keogh/pBluescript.gif](http://www.bio.davidson.edu/.../Keogh/pBluescript.gif)

## 12. จุดมุ่งหมายของการวิจัย

งานวิจัยนี้ มีจุดประสงค์ที่จะศึกษาความสามารถของสารสกัดจากใบชา 3 ประเภท คือ ชาเขียว ชาอูหลง และชาดำ ในการยับยั้งการป้องกันความเสียหายของดีเอ็นเอที่เกิดจากอนุมูลอิสระ อันจะเป็นการนำไปสู่การเลือกบริโภคน้ำชาที่ก่อให้เกิดประโยชน์ต่อร่างกายสูงสุด

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ชาที่บริโภคกันโดยทั่วไปมี 2 สายพันธุ์ คือ *Camellia sinensis* และ *Camellia assamica* ทั้งในรูป ชาเขียว ชาอูหลง และชาดำ ชาที่ผลิตทั่วโลกคิดเป็น ชาดำ 78% นิยมบริโภคกันในประเทศทางตะวันตก ชาเขียว 20 % นิยมบริโภคในประเทศทางแถบเอเชีย เช่น จีน และญี่ปุ่น และชาอูหลงอีก 2% นิยมบริโภคทางตอนใต้ของจีน ดังนั้นรายงานการวิจัยเกี่ยวกับประโยชน์ของการบริโภคชา โดยเฉพาะอย่างยิ่งชาเขียวจึงมาจากประเทศทางแถบเอเชียเป็นส่วนใหญ่

มุกตาร์และอาห์เมด (Mukhtar & Ahmed, 2000) รายงานว่าการมีสุขภาพดีของมนุษย์ มีส่วนเกี่ยวข้องกับปริมาณและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารพอลิฟีนอลที่ร่างกายได้รับ เออร์บาและคณะ (Erba et al., 2005) ศึกษาการให้กลุ่มตัวอย่างที่มีการควบคุมอาหาร ดื่มน้ำชาวันละ 2 ถ้วย คิดเป็นปริมาณคาเทชินเท่ากับ 250 มิลลิกรัม เป็นเวลา 42 วัน พบว่าพลาสมาของกลุ่มตัวอย่างมีความสามารถต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) (1.98 umol Trolox equivalent/ml) สูงกว่าในกลุ่มควบคุม (1.79 umol Trolox equivalent/ml) และพบว่าระดับเปอร์ออกไซด์ในพลาสมาลดลงอย่างมากจาก 412 Carr U ในกลุ่มควบคุมไปเป็น 218 Carr U ในกลุ่มตัวอย่าง

ลีเนน และคณะ (Leenen et al., 2000) พบว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในพลาสมาของผู้ใหญ่ที่มีสุขภาพดีจะสูงขึ้นอย่างรวดเร็วภายใน 30-60 นาทีภายหลังการดื่มน้ำชา 1 ถ้วย

มีรายงานว่าภายหลังการบริโภคชาทั้งในรูปน้ำชาหรือในรูปยาเม็ดของสารสกัดใบชาเป็นเวลานาน 1-4 สัปดาห์ ช่วยลดสภาวะ oxidative stress ในร่างกายได้ โดยคลอนิกและคณะ (Klaunig et al. 1999) ศึกษากรณีสักขากลุ่มตัวอย่างผู้ชายสูบบุหรี่ 40 คนในประเทศจีน และกลุ่มตัวอย่างชายและหญิงอย่างละ 27 คนทั้งกลุ่มสูบบุหรี่และไม่สูบบุหรี่ ในประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่าภายหลังการดื่มน้ำชาวันละ 6 ถ้วยเป็นเวลา 7 วัน ความเสียหายในด้านต่าง ๆ ของเซลล์ลดลง เช่น ความเสียหายจากลิพิดเปอร์ออกซิเดชันลดลง ความเสียหายของดีเอ็นเอเนื่องจากการออกซิไดส์ (oxidative DNA damage) ลดลง และปริมาณสารอนุมูลอิสระในเซลล์ก็ลดลงด้วย

ฟรีช และคณะ (Freese et al., 1999) ศึกษากรณีสักขากลุ่มตัวอย่างผู้หญิงที่มีสุขภาพดี 20 คน อายุระหว่าง 23-50 ปี บริโภคอาหารที่มีปริมาณกรดไขมันลิโนเลอิกสูง ตามด้วยการได้รับสารสกัดใบชาในรูปยาเม็ด (encapsulated tea extract) (คิดเป็นปริมาณน้ำชาเขียว 10 ถ้วยต่อวัน) พบว่าปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ ซึ่งเป็นดัชนีที่บ่งชี้ความเสียหายของลิพิดเปอร์ออกซิเดชันลดลง

ประโยชน์ของการดื่มน้ำชานอกจากจะทำให้มีสุขภาพดีแล้ว ยังมีรายงานหลายชิ้นในหลายประเทศที่ระบุว่าคนที่ดื่มน้ำชาประจำวันละ 1-6 ถ้วย สามารถป้องกันและลดอัตราเสี่ยงของการเกิดและการพัฒนามะเร็งในทุกชนิด ลูเบิร์ต และแยง (Lambert & Yang, 2003a; 2003b) ได้รายงานถึง

การลดลงของอุบัติการณ์การเกิดมะเร็งชนิดต่าง ๆ ในกลุ่มตัวอย่างที่บริโภคน้ำชา โดยรวบรวมรายงานการศึกษาจากหลายประเทศ เช่น การศึกษาในประเทศจีนและญี่ปุ่นซึ่งนิยมดื่มชากันมากโดยเฉพาะชาเขียว พบว่าอุบัติการณ์ของการเกิดมะเร็งทางเดินอาหาร (gastro-intestinal cancer) ต่ำ จากการศึกษาในเมืองเซี่ยงไฮ้ของประเทศจีน พบว่าอุบัติการณ์ของการเกิดมะเร็งหลอดอาหาร (esophageal cancer) ต่ำเช่นเดียวกัน นอกจากนี้ยังได้รวบรวมรายงานจากหลายประเทศ ที่สนับสนุนว่าการบริโภคชาสามารถป้องกันการเกิดมะเร็งได้ เช่น การศึกษาในประเทศอิตาลีพบว่าการบริโภคชาช่วยป้องกันการเกิดมะเร็งในช่องปาก (oral cancer) มะเร็งลำคอ (pharyngeal cancer) และมะเร็งกล่องเสียง (laryngeal cancer) จากการศึกษาในประเทศญี่ปุ่น สวีเดน และตุรกีต่างก็สนับสนุนว่าการบริโภคชาสามารถป้องกันการเกิดมะเร็งกระเพาะอาหาร (gastric cancer) จากการศึกษาในประเทศญี่ปุ่น พบว่าในผู้หญิงที่บริโภคน้ำชามากกว่า 10 ถ้วยต่อวัน สามารถลดอัตราเสี่ยงของการเกิดมะเร็งเต้านม และจากการศึกษาในรัฐไอโอวาพบว่าผู้หญิงที่บริโภคน้ำชาเป็นประจำ อัตราเสี่ยงของการเกิดมะเร็งทางเดินอาหาร (digestive tract cancer) และมะเร็งทางเดินปัสสาวะ (urinary tract cancer) ลดลงเช่นกัน

ซูโอะกะ และคณะ (Sueoka et al., 2001) รายงานการศึกษากลุ่มตัวอย่างจำนวน 8522 คน ในเมืองโยชิมิ (Yoshimi) เขตไซตามะ (Saitama Prefecture) ที่บริโภคชาเขียวเป็นประจำ โดยแบ่งกลุ่มตัวอย่างออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่บริโภคชาน้อยกว่า 3 ถ้วย กลุ่มที่บริโภคชา 4-9 ถ้วย และกลุ่มที่บริโภชน้ำชามากกว่า 10 ถ้วยต่อวัน แล้วติดตามผลเป็นเวลา 11 ปี ผลก็คือมีคนเป็นมะเร็ง 488 คน (ผู้ชาย 285 คน และผู้หญิง 203 คน) พบว่าในกลุ่มคนที่บริโภคชามากกว่า 10 ถ้วยต่อวัน จะพบคนที่เป็นมะเร็งปอด มะเร็งลำไส้ หรือ มะเร็งตับต่ำกว่าในอีก 2 กลุ่มที่เหลืออย่างเห็นได้ชัด ส่วนมะเร็งกระเพาะอาหารก็ต่ำลงเช่นกันแต่ไม่ชัดเจนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เจียน และคณะ (Jian et al., 2004) ได้ศึกษากลุ่มคนไข้ในเมือง Hangzhou ทางตะวันออกเฉียงใต้ของประเทศจีนใน 2 กลุ่มตัวอย่างที่มีอายุอยู่ในช่วงเดียวกัน คือ กลุ่มคนไข้ที่เป็นมะเร็งต่อมลูกหมากจำนวน 130 คน และกลุ่มคนไข้ที่ไม่เป็นมะเร็งใดๆ จำนวน 274 คน จากการสัมภาษณ์และตอบแบบสอบถามถึงชนิดของชา จำนวนถ้วย ความถี่ และระยะเวลาของชาที่ดื่ม พบว่าอัตราการเสี่ยงของการเกิดมะเร็งต่อมลูกหมากลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตามปริมาณ ความถี่ และระยะเวลา ของการดื่มชาที่เพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่าการดื่มชาช่วยป้องกันการเป็นมะเร็งต่อมลูกหมากได้

ฮู และคณะ (Hou et al., 2004) ได้รวบรวมรายงานการวิจัยหลายชิ้นที่ได้ศึกษาถึงความสามารถของสารสกัดใบชาต่อการป้องกันการเกิดมะเร็งในสิ่งมีชีวิต (in vivo) และได้นำมาอธิบายกลไกต่างๆ ที่อาจเป็นไปได้ของสารพอลิฟีนอลจากสารสกัดใบชาในการตอบสนองของเซลล์ต่ออนุมูลอิสระในระดับ signal transduction จนนำไปสู่การป้องกันการเกิดมะเร็ง กลไกเหล่านี้ อาจเป็น การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีนไคเนส (protein kinase) การขัดขวางการทำงานของตัวดักจับ (receptor-mediated function) ซึ่งอยู่ที่เยื่อเซลล์ หรือ การยับยั้งเอนไซม์โปรตีเอส (protease) ซึ่งกลไกดังกล่าวอาจนำไปสู่การควบคุมวงจรชีวิตของเซลล์ (cell cycle regulation) การยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ ช่วย

ให้เกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis ยับยั้งกระบวนการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ (angiogenesis) และยับยั้งการแพร่กระจายของมะเร็ง (metastasis)

นอกจากคุณสมบัติของสารสกัดใบชาต่อการป้องกันมะเร็งแล้ว ยังมีการศึกษาถึงความสามารถในการยับยั้งการพัฒนาของมะเร็ง โดยนาคาชิ และคณะ (Nakachi, et al., 1998) ได้รายงานถึงความสามารถดังกล่าวในกลุ่มคนไข้มะเร็งเต้านมระยะ 1 2 และ 3 จำนวน 472 ราย ที่ได้รับการรักษาโดยการผ่าตัดเต้านม (massectomy) พบว่าอุบัติการณ์ของการกลับมาเป็นมะเร็งอีก (recurrence) ลดลงอย่างมีความสัมพันธ์กับปริมาณการดื่มชาเขียวของคนไข้ โดยในกลุ่มคนไข้มะเร็งระยะที่ 1 และ 2 ที่ดื่มน้ำชาปริมาณ  $\geq 5$  และ  $\leq 4$  ถ้วย ต่อวัน แล้วติดตามผลเป็นเวลา 7 ปี พบว่าอัตราการกลับมาเป็นมะเร็งอีกเพิ่มขึ้นในกลุ่มที่ดื่มน้ำชาน้อยกว่า คือ 16.7 และ 24.3% ตามลำดับ อย่างไรก็ตามไม่พบความสัมพันธ์นี้ในกลุ่มคนไข้มะเร็งระยะที่ 3

แหล่งสำคัญในธรรมชาติที่มนุษย์ได้รับสารต้านอนุมูล คือจากใบชา ผัก ผลไม้และพืชต่าง ๆ ได้มีการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของใบชา เปรียบเทียบกับพืชและผักชนิดต่าง ๆ ซึ่งมีพอลิฟีนอลเป็นองค์ประกอบสำคัญ โดยเคา และคณะ (Cao et al., 1996) ศึกษาค่าความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของชาเขียว และชาดำ เปรียบเทียบกับพืชและผักชนิดต่างๆ 22 ชนิด พบว่า ชาเขียว และชาดำ มีความสามารถในการต้านอนุมูลเปอร์ออกซิล (ROO<sup>•</sup>) ได้สูงมาก และสูงกว่าพืช และผักต่าง ๆ ทั้งหมดที่ศึกษา เรียงตามลำดับดังนี้ กระเทียม 19.4  $\mu\text{mol Trolox equivalent (TE)}/\text{g}$  กระน้ำ 17.7  $\mu\text{mol TE}/\text{g}$  ผักขม 12.6  $\mu\text{mol TE}/\text{g}$  brussels sprouts, alfalfa sprouts บรอกโคลี บีท red bell pepper หัวหอม ข้าวโพด มะเขือ (9.8-3.9  $\mu\text{mol TE}/\text{g}$ ) กะหล่ำดอก มันฝรั่ง มันฝรั่งหวาน กะหล่ำปลี ผักกาดหอม ถั่วฝักยาว แครอท yellow squash, iceberg lettuce คื่นช่าย และแตงกวา (3.8-0.5  $\mu\text{mol TE}/\text{g}$ ) นอกจากนี้ยังพบความสามารถเป็น prooxidant ในสถานะที่มี  $\text{Cu}^{2+}$  ในชาเขียวและชาดำเท่านั้น ไม่พบในพืชและผักชนิดอื่นๆที่ศึกษา

ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบชา มาจากสารพอลิฟีนอลในใบชา โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารในกลุ่มคาเทชิน มุกตาร์และอาห์เมด (Mukhtar & Ahmed, 1999) พบว่าสารสกัดใบชา (น้ำชา) 1 g ในน้ำร้อน 100°C 100 ml เป็นเวลา 3 นาที มีปริมาณคาเทชินอยู่สูงถึง 30-42 % และมีคาเฟอีน (caffeine) 3-6% เมื่อไม่รวมน้ำ (% dry weight) เคนโด และคณะ (Kendo; et al., 1999) พบว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมาจากโครงสร้างวงบี (ring B) ในโมเลกุลของคาเทชิน

อาโอชิม่า และคณะ (Aoshima et al., 2007) รายงานความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH เป็นร้อยละ (DPPH radical scavenging activity, %) ของชาเขียวเปรียบเทียบกับ พืชสมุนไพร 13 ชนิด พบว่าชาเขียวมีความสามารถเป็นที่สอง (73.1%) รองจากกุหลาบ (82.5%) (เนื่องจากกุหลาบมีแอนโทไซยานินมาก) นอกนั้นพืชสมุนไพรอีก 12 ชนิด ได้แก่ ลาเวนเดอร์ (lavender) chamomile hibiscus ตะไคร้ (lemongrass) sage rosemary echinacea thyme เปเปอร์มินท์

(peppermint) เป๊าะก๊วย (ginkgo) liquorice และ thorn apple มีความสามารถน้อยกว่ามาก คืออยู่ในช่วง 0.9-30.3% อีกทั้งปริมาณพอลิฟีนอลจะน้อยลงตามความสามารถที่ลดลงในการกำจัดอนุมูลอิสระ โดยชาเขียวและกุหลาบมีปริมาณ 4.03 และ 4.43 mM ตามลำดับ ส่วนพืชที่เหลืออื่นๆ มีปริมาณในช่วง 0.47-2.63 mM

ปฏิกิริยาออกซิเดชันของชีวโมเลกุลเป็นปฏิกิริยาสำคัญที่สร้างความเสียหายแก่เซลล์ มีการวิจัยมากมายที่รายงานถึงความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากใบชา ในด้านการยับยั้งออกซิเดชันของชีวโมเลกุล สารพอลิฟีนอลกลุ่มคาเทชินโดยเฉพาะอย่างยิ่ง EGCG ซึ่งพบได้มากในชาเขียวมีความสามารถในการยับยั้งการเกิด oxidative stress ในเซลล์ได้ดี คาติยาร์ และคณะ (Katiyar et al., 2001) ศึกษาถึงความสามารถของ EGCG ในการยับยั้งการเสียหายของผิวหนังมนุษย์ที่ถูกแสงอัลตราไวโอเล็ต พบว่าคนที่ทา EGCG ที่ผิวหนัง (1 mg/cm<sup>2</sup> skin) ก่อนการอาบแสงอัลตราไวโอเล็ตสามารถลดปริมาณ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> และ nitric oxide ที่ผิวหนังในชั้น epidermis และ dermis นอกจากนี้ยังลดการอักเสบของผิวหนัง และลดลิพิดเปอร์ออกซิเดชันในเซลล์ผิวหนังได้

หลิว และคณะ (Liu et al, 2000) ได้ศึกษาความสามารถของสารประกอบพอลิฟีนอลในชาเขียว ได้แก่ EC EGC ECG EGCG และ gallic acid (GA) ในด้านการต้านลิพิดเปอร์ออกซิเดชันใน low density lipoprotein (LDL) ที่ได้รับอนุมูลอิสระ 2,2'-azobis (2-amidinopropane hydrochloride, AAPH) พบว่าพอลิฟีนอลดังกล่าวสามารถต้านปฏิกิริยาลิพิดเปอร์ออกซิเดชันได้ โดยทำหน้าที่ 2 ประการ คือ ดักจับอนุมูลเปอร์ออกซิลในขั้นเริ่มและ/หรือยับยั้งปฏิกิริยาในขั้นเพิ่มทวี เรียงลำดับความสามารถ ดังนี้ EC>EGCG>ECG>EGC>GA และยังพบความสามารถของพอลิฟีนอลเหล่านี้ในด้านการช่วยลดอนุมูล  $\alpha$ -tocopheroxyl โดยเปลี่ยนไปเป็น  $\alpha$ -tocopherol ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ออกฤทธิ์ได้มาก เรียงลำดับความสามารถ คือ ECG>EC>EGCG> EGC>GA

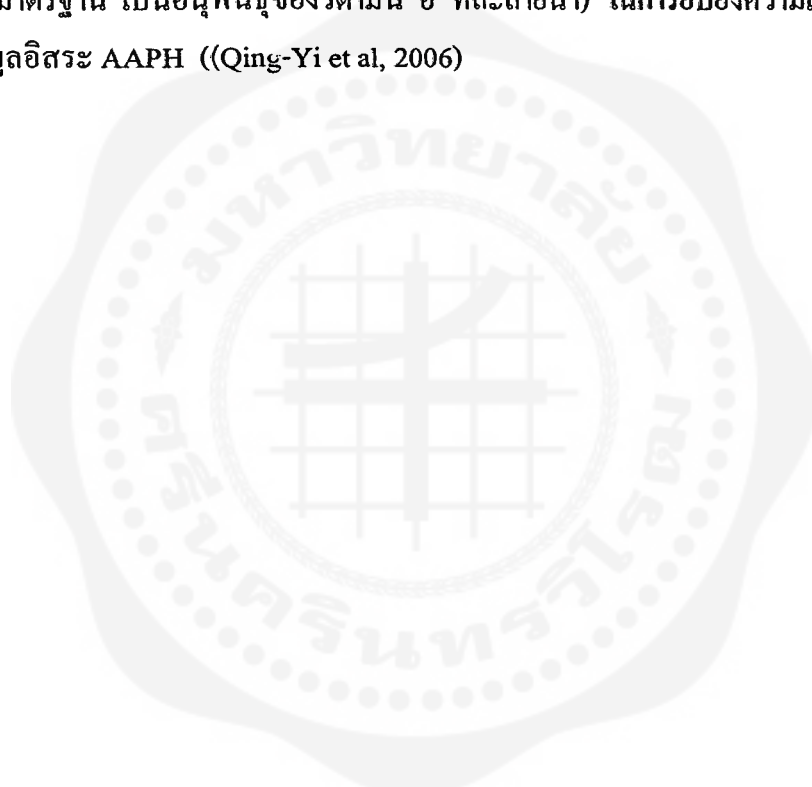
ไค และคณะ (Cai et al., 2002) ได้รายงานถึงความสามารถของ EC EGC ECG EGCG และ GA ต่อการยับยั้ง peroxidation ใน microsomes ของตับหนูที่ได้รับอนุมูลอิสระ AAPH โดยติดตามปริมาณออกซิเจนที่ใช่ และปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ (MDA) ที่เกิดขึ้น พบว่าพอลิฟีนอลดังกล่าว โดยเฉพาะอย่างยิ่ง EC และ EGC แสดงสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดี และยังสามารถเสริมฤทธิ์กับวิตามินอีในการทำหน้าที่ต้านอนุมูลอิสระ

ความเสียหายเนื่องจากการออกซิไดส์ชีวโมเลกุล ที่เป็นสาเหตุสำคัญนำไปสู่การเกิดมะเร็ง คือ ความเสียหายที่เกิดกับดีเอ็นเอ มีรายงานการศึกษาความสามารถของพอลิฟีนอลใน ผัก และพืชสมุนไพรต่างๆ ต่อการป้องกันความเสียหายของดีเอ็นเอที่ถูกออกซิไดส์

มีการวิจัยหลายชิ้นที่ใช้พลาสมิดเป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการศึกษาความเสียหายจากอนุมูลอิสระหรือสารอื่นๆ กุมาร์ และชัตโตพาดิเย (Kumar & Chattopadhyay, 2007) รายงานความสามารถของพอลิฟีนอลในสารสกัดจากพืชพื้นเมืองของอินเดีย คือ pudina (*Mentha spicata*) ต่อการป้องกันความเสียหายของดีเอ็นเอ โดยพบว่าสารสกัด pudina ที่ความเข้มข้น 10  $\mu$ g/ml สามารถป้องกันการ

ตัดสายดีเอ็นเอของพลาสมิด pBluescript I SK (-) ที่ถูกออกซิไดส์ด้วยอนุมูล  $\cdot\text{OH}$  ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัด pudina วัดโดยวิธี DPPH พบว่ามีค่า  $\text{IC}_{50}$  เท่ากับ  $7.47 \mu\text{g/ml}$  และมีปริมาณพอลิฟีนอลทั้งหมดคิดเป็นปริมาณ gallic acid (Gallic acid equivalent, GAE) เท่ากับ  $500 \mu\text{g GAE/1 mg}$  ซึ่งแสดงว่ามีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด pudina มาจากสารประกอบพอลิฟีนอล

แซง และ โอมาเย (Zang & Omaye, 2001) ศึกษาความเสียหายของดีเอ็นเอพลาสมิด pBR322 2,2'-azobis (2-amidinopropane hydrochloride, AAPH) ที่ได้รับแสง ultraviolet และ  $\text{H}_2\text{O}_2$  และพบว่า  $\beta$ -carotene  $\alpha$ -tocopherol และ ascorbic acid สามารถยับยั้งการแตกของสายดีเอ็นเอที่ถูกออกซิไดส์ด้วยออกซิเจน นอกจากนี้ polyphenol ในชาเขียวสามารถเสริมฤทธิ์กับ trolox (สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน เป็นอนุพันธ์ของวิตามิน อี ที่ละลายน้ำ) ในการยับยั้งความเสียหายของดีเอ็นเอ จากจากอนุมูลอิสระ AAPH ((Qing-Yi et al, 2006)



## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

การดำเนินการวิจัยประกอบด้วย 4 ขั้นตอน ดังนี้

1. วิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบชา โดยวิธี DPPH
2. วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดใบชา
3. วิเคราะห์ปริมาณ flavonoids กลุ่ม catechin ในสารสกัดใบชาโดยวิธี HPLC
4. ศึกษาความสามารถของสารสกัดใบชาต่อการป้องกันการทำลาย DNA จากสารอนุมูลอิสระ

### อุปกรณ์และสารเคมี

#### สารเคมีและวัสดุ

ใบชา 3 ประเภท คือ ชาเขียว ชาอูหลง และชาดำ สายพันธุ์อัสสัม (*Camillia sinensis* var. *assamica*)

#### วิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบชาโดยวิธี DPPH

1. DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazine) (Sigma Chemical Co.)
2. BHT (2,6-ditertiary-butyl-4-methyl phenol)
3. Absolute ethanol

#### วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดใบชา

1. Folin-Ciocalteu reagent (Sigma Chemical Co.)
2. Gallic acid (Sigma Chemical Co.)
3. Sodium carbonate

#### วิเคราะห์ปริมาณ flavonoids กลุ่ม catechin ในสารสกัดใบชาโดยวิธี HPLC

1. (-)-Epigallocatechin (EGC) (Sigma)
2. (+)-Catechin (C) (Sigma)
3. (-)-Epicatechin gallate (ECG) (Sigma)
4. (-)-Epicatechin (EC) (Sigma)
5. (-)-Gallocatechin gallate (GCG) (Sigma)
6. (-)-Epigallocatechin gallate (EGCG) (Sigma)
7. Caffeine (Sigma)

8. Methanol (HPLC grade) (Sigma)
9. Acetonitrile (HPLC grade) (Sigma)
10. Acetonitrile (HPLC grade) (Sigma)
11. Trifluoroacetic acid (Acros organic)

**ศึกษาความสามารถของสารสกัดใบชาต่อการป้องกันการทำลาย DNA จากอนุมูลอิสระ**

1. Plasmid pBluescript (จากห้องปฏิบัติการ ผศ.ดร.ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มศว)
2. AAPH (2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride) (Aldrich)
3. Trolox (Acros Organic)
4. Agarose gel (Amresco)
5. Phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4
6. NaCl, KCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
7. Tris base (Sigma)
8. Sodium acetate
9. EDTA
10. Bromophenol blue
11. Sucrose
12. Ethidium bromide

**อุปกรณ์และเครื่องมือ**

1. UV-VIS spectrophotometer (Shimadzu UV-2401PC)
2. เครื่อง HPLC (High performance Liquid Chromatograph) ระบบ low pressure Gradient, 2 mobile phase (Shimadzu รุ่น LC-20AD)
3. HPLC Column ชนิด C<sub>18</sub> reverse phase ขนาด 4.6 X 250 mm (Inertsil -ODS-3)
4. software : LC solution
5. Gel documentation system (Syngene รุ่น G-Box)
6. Software : GeneSnap
7. Software : GeneTools
8. Quartz cuvette ขนาด 1.5 mL

## วิธีวิจัย

### 1. เตรียมสกัดสารจากใบชาด้วยน้ำร้อน

ชั่งใบชา 2 กรัม ใส่ในน้ำเดือด 140 cm<sup>3</sup> คนด้วย magnetic stirrer นาน 10 นาที จะได้ สารสกัดใบชา (tea infusion)

### 2. วิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบชา เป็น IC<sub>50</sub> โดยวิธี DPPH

2.1 ให้ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ซึ่งมีสีม่วง (มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 517 nm) ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดใบชาปริมาณต่างๆ กัน ได้ผลิตภัณฑ์เป็น DPPH ซึ่งมีสีเหลือง ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลง ยิ่งปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดมาก ค่าการดูดกลืนแสงก็ยิ่งลดลงเหมือนกัน (ภาพประกอบที่ 3.1)

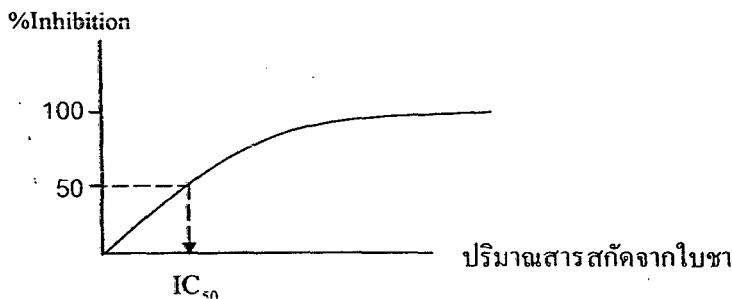


ภาพประกอบที่ 3.1 ค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH ลดลงเมื่อปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น

2.2 จากรูปกราฟ นำค่าการดูดกลืนแสง (OD<sub>517</sub>) ไปคำนวณหาค่า % การยับยั้ง (% inhibition) จากสูตร

$$\% \text{ inhibition} = \frac{\text{OD}_{\text{control}} - \text{OD}_{\text{sample}}}{\text{OD}_{\text{control}}} \times 100$$

2.3 plot กราฟระหว่าง % inhibition และปริมาณสารสกัด จากกราฟอ่านค่าการยับยั้งที่ 50% จะได้ปริมาณสารสกัดใบชาที่ทำให้เกิดการยับยั้งอนุมูลอิสระ 50 % เรียกว่าค่า IC<sub>50</sub> (ภาพประกอบที่ 3.2)



ภาพประกอบที่ 3.2 การหาค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบชาเป็น IC<sub>50</sub>

3. วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดใบชา (ดัดแปลงจากวิธีของซิแคมบาราและคณะ: 2002)

3.1 ปริมาณ flavonoids ในสารสกัดจากใบชา จะวิเคราะห์เป็นปริมาณ Total phenolic compounds โดยใช้สาร Folin-Ciocalteu phenol reagent และ  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ทำปฏิกิริยากับ phenolic compound ในสารสกัดจากใบชา

3.2 วัดค่าการดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 765 nm เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ gallic acid ซึ่งเป็นสารประกอบฟีนอลิกมาตรฐาน

3.3 คำนวณปริมาณ Total phenolic compounds เป็น gallic acid equivalent (GAE)

4. วิเคราะห์ปริมาณ flavonoids กลุ่ม catechin ในสารสกัดใบชาโดยวิธี HPLC (จากวิธีของคาลูเกและคณะ: 1997)

4.1 ใช้คอลัมน์ deactivated monomeric  $\text{C}_{18}$  และ mobile phase เป็น gradient elution solvent systems ประกอบด้วย buffer A และ buffer B ส่วนประกอบดังนี้

buffer A ประกอบด้วย water + 0.05%TFA (trifluoroacetic acid)

buffer B ประกอบด้วย 60:40 MeOH-ACN+0.05%TFA

จัดระบบเครื่องให้มีการชะคอลัมน์เป็นแบบ linear gradient ดังแสดงในตารางที่ 3.1

4.2 สร้าง calibration curve ของ flavonoid มาตรฐาน 6 ชนิด ประกอบด้วย Catechin (C) Epicatechin (EC) Epigallocatechin (EGC) gallocatechin gallate (GCG) Epigallocatechin gallate (EGCG) และ Epicatechingallate (ECG) โดยผสมสารละลายมาตรฐานทั้ง 7 ชนิด แล้วฉีดเข้าเครื่อง HPLC

4.3 นำสารสกัดใบชาตัวอย่าง ซึ่งเจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม ฉีดเข้าเครื่อง HPLC

4.4 ผลจากแยกด้วยเครื่องและใช้ software ของเครื่อง (Shimadzu LC solution) จะได้โครมาโทแกรม พร้อมตารางที่ระบุ retention time พื้นที่ และความสูงของแต่ละ peak และความเข้มข้นของสารใน peak นั้นๆ

4.5 จากตารางที่ได้จะทราบชนิด และปริมาณของ flavonoid ทั้งหมดในสารสกัดใบชา

ตารางที่ 3.1 ระบบตัวทำละลายและอัตราเร็วของการชะคอลัมน์แบบ linear gradient ที่ใช้ในการแยกคาเทชิน โดยวิธี HPLC

Buffer A	Buffer B	Gradient		
		เวลา (นาที)	%A	%B
		0	90	10
น้ำ + 0.05% TFA	60 : 40 MeOH/ACN + 0.05% TFA	5	85	15
		50	60	40

5. ศึกษาความสามารถของสารสกัดใบชาต่อการป้องกันการทำลายดีเอ็นเอจากอนุมูลอิสระ  
การเตรียมสารละลาย

- 1.) TAE (Tris sodium acetate EDTA) บัฟเฟอร์ pH 8.5
- 2.) 1% agarose gel ละลายใน TAE บัฟเฟอร์
- 3.) gel loading buffer
- 4.) plasmid pBluescript เจือจางด้วยบัฟเฟอร์ PBS ให้มีความเข้มข้น 25 ug/ul
- 5.) เตรียม AAPH ที่ความเข้มข้น 2.5mM, 5mM, 10mM, 20mM, 40mM และ  
และ 80mM
- 6.) เตรียม Trolox ที่ความเข้มข้น 2.5mM, 5mM, 10mM, 20mM และ 40mM

5.1 ศึกษาความเข้มข้นของ AAPH ที่มีผลต่อการทำลาย pBluescript

- 1.) ปิเปตต์ pBluescript PBS บัฟเฟอร์ pH 7.4 และ AAPH ที่ความเข้มข้น 2.5 5  
10 20 และ 40 mM ลงในหลอดทดลอง ปริมาตรตามตารางที่ 3.2
- 2.) นำไป incubate ที่ 37 °C เป็นเวลา 90 นาที แยกด้วย agarose gel electrophoresis  
สนามไฟฟ้า 45V/20mA นาน 1 ชม. ย้อมสีด้วย Ethidium bromide และล้างน้ำ

ตารางที่ 3.2 ศึกษาความเข้มข้นของ AAPH ที่มีผลต่อการทำลาย pBluescript

	หลอดที่						
สารที่เติม (ul)	1	2	3	4	5	6	7
pBluescript 25 ng/ul	5	5	5	5	5	5	5
PBS	20	10	10	10	10	10	10
AAPH 2.5 mM	-	10	-	-	-	-	-
AAPH 5 mM	-	-	10	-	-	-	-
AAPH 10 mM	-	-	-	10	-	-	-
AAPH 20 mM	-	-	-	-	10	-	-
AAPH 40 mM	-	-	-	-	-	10	-
	Incubate 37 °C, 90 นาที						
gel loading buffer	5	5	5	5	5	5	5
Run agarose gel electrophoresis	หยอด 20 uL ลงบน 1 % agarose gel Run gel 45V/20mA นาน 1 ชม.						
ย้อม Ethidium bromide	ย้อม gel 30 นาที						
ล้างน้ำ	30 นาที						

3.) นำ agarose gel ที่แยกได้ไปทำ gel documentation ด้วยเครื่อง Gene Syngene รุ่น G-Box ประกอบด้วยการถ่ายภาพด้วย software Genesnap และวิเคราะห์ข้อมูลด้วย software Genetool จากข้อมูลจะทราบปริมาณในแต่ละแถบเป็น Raw volume

4.) นำข้อมูล raw volume ไปคำนวณหาปริมาณเป็นร้อยละของโครงสร้างพลาสมิด 3 โครงสร้าง คือ โครงสร้าง supercoil โครงสร้าง circular และ โครงสร้าง linear ดังตัวอย่างข้อมูลที่ได้จาก software Genetool แสดงในตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 ตัวอย่างข้อมูลปริมาณ โครงสร้างต่างๆ ของพลาสมิดเป็น raw volume จาก software Genetool และปริมาณโครงสร้างที่คำนวณได้เป็น %

Track	AAPH	Form	Raw volume	%
1	ควบคุม	circular	90985.7	6.7
		linear	33209.5	2.4
		supercoil	1244539.3	90.9
		รวม 3 รูปร่าง	1368734.4	100.0

ตัวอย่างการคำนวณร้อยละของพลาสมิดโครงสร้าง supercoil

$$\% \text{ Supercoil form} = \frac{\text{Raw volume}_{\text{Supercoil form}}}{\text{Raw volume}_{\text{Total}}} \times 100$$

$$\text{Raw volume}_{\text{Total}} = \text{Raw volume}_{\text{supercoil}} + \text{Raw volume}_{\text{circular}} + \text{Raw volume}_{\text{linear}}$$

5.) นำปริมาณร้อยละของพลาสมิดโครงสร้าง circular รวมกับ โครงสร้าง linear จะได้ปริมาณเป็นร้อยละของโครงสร้างพลาสมิดที่ถูกทำลายสภาพธรรมชาติ ส่วนโครงสร้างที่ไม่ถูกทำลายคือ โครงสร้าง supercoil

6.) พล็อตกราฟระหว่างปริมาณ AAPH กับร้อยละของโครงสร้างพลาสมิดที่ถูกทำลาย และไม่ถูกทำลายสภาพธรรมชาติ

## 5.2 ศึกษาความสามารถของ Trolox ต่อการป้องกันการทำลาย pBluescript จาก AAPH

- 1.) ปิเปตต์ pBluescript บัฟเฟอร์ PBS pH 7.4 และ Trolox ที่ความเข้มข้น 2.5 5 10 20 40 และ 80 mM ลงในหลอดทดลอง ปริมาตรตามตารางที่ 3.4
- 2.) นำไป incubate ที่ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที
- 3.) ปิเปตต์ 10 mM AAPH ลงในทุกหลอด หลอดละ 10 µl
- 4.) นำไป incubate ที่ 37 °C นาน 90 นาที แยกด้วย agarose gel electrophoresis ในสนามไฟฟ้า 45V/20 mA นาน 1 ชม. ตามด้วยการย้อมสีด้วย Ethidium bromide และล้างน้ำ

- 5.) จากนั้นปฏิบัติเช่นเดียวกับข้อ 5.1 ข้อย่อย 3.) - 5.)
- 6.) พล็อตกราฟระหว่างปริมาณ trolox กับร้อยละของพลาสมิด โครงรูปที่ไม่ถูกทำลาย และ โครงรูปที่ไม่ถูกทำลาย
- 7.) จากรูปกราฟหาค่า  $IC_{50}$  ของการป้องกันการทำลายพลาสมิด โดยหาค่าความเข้มข้นของ trolox (mM) ที่ทำให้พลาสมิดอยู่ในโครงรูปที่ถูกทำลายสภาพธรรมชาติ 50%

ตารางที่ 3.4 การศึกษาความสามารถของ Trolox ต่อการป้องกันการทำลาย pBluescript จาก AAPH

	หลอดที่							
สารที่เติม (μl)	1	2	3	4	5	6	7	8
DNA 25 ng/μl	5	5	5	5	5	5	5	5
PBS	20	10	-	-	-	-	-	-
Trolox 2.5 mM	-	-	10	-	-	-	-	-
Trolox 5 mM	-	-	-	10	-	-	-	-
Trolox 10 mM	-	-	-	-	10	-	-	-
Trolox 20 mM	-	-	-	-	-	10	-	-
Trolox 40 mM	-	-	-	-	-	-	10	-
Trolox 80 mM								10
	Incubate 37 °C 30 นาที							
AAPH 10.0 mM	-	10	10	10	10	10	10	10
	Incubate 37 °C 90 นาที							
gel loading buffer	5	5	5	5	5	5	5	5
agarose gel	หยอด 20 uL ลงบน 1 % agarose gel							
electrophoresis	Run gel 45V/20 mA นาน 1 ชม.							
ย้อม Ethidium bromide	ย้อม gel 30 นาที							
ล้างน้ำ	30 นาที							

### 5.3 ศึกษาความสามารถของสารสกัดใบชา 3 ชนิด ชาเขียว ชาอูหลง และชาดำต่อการป้องกันการทำลาย pBluescript จาก AAPH

#### 5.3.1 ศึกษาผลของสารสกัดชาเขียวต่อการป้องกันการทำลาย pBluescript จาก AAPH

1.) เตรียมสารสกัดใบชาเขียว โดยชั่งชาเขียว 0.2 กรัม ละลายน้ำเดือดปริมาตร 200 ml. คนด้วย magnetic stirrer เบาๆ นาน 10 นาที จะได้สารสกัดชาเขียวเข้มข้น 1,000 ng/μl จากนั้นเจือจางสารสกัดชาเขียวแบบ serial dilution ในอัตราส่วน 1: 2 จำนวน 7 ครั้ง นำสารสกัดชาเขียวที่มีความเข้มข้น 250 125 62.5 31.2 15.6 และ 7.8 ng/μl มาศึกษา

- 2.) ปิเปตต์ pBluescript PBS บัฟเฟอร์ pH 7.4 และสารสกัดขาเขียวเข้มข้น 7.8 15.6 31.2 62.5 125 และ 250 ng/μl ลงในหลอดทดลอง ปริมาตรตามตารางที่ 3.5
- 3.) ปฏิบัติเช่นเดียวกับข้อ 5.1 ข้อย่อย 3.) - 5.)
- 4.) พล็อตกราฟระหว่างปริมาณสารสกัดขาเขียวกับร้อยละของพลาสมิดโคจรรูปที่ถูกทำลาย และโคจรรูปที่ไม่ถูกทำลายสภาพธรรมชาติ
- 5.) จากรูปกราฟหาค่า  $IC_{50}$  ของการป้องกันการทำลายพลาสมิด โดยหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดขาเขียว (ng/μl) ที่ทำให้พลาสมิดอยู่ในโคจรรูปที่ถูกทำลายสภาพธรรมชาติ 50%
- 6.) นำค่า  $IC_{50}$  ของสารสกัด (ng/μl) ไปคำนวณเป็น  $IC_{50}$  ของใบชา (ng/ใบชา)

ตารางที่ 3.5 การศึกษาผลของสารสกัดขาเขียวต่อการป้องกันการทำลาย pBluescript จาก AAPH

	หลอดที่							
สารที่เติม (μl)	1	2	3	4	5	6	7	8
DNA 25 ng/μl	5	5	5	5	5	5	5	5
PBS	20	10	-	-	-	-	-	-
สารสกัดขาเขียว 7.8 ng/μl	-	-	10	-	-	-	-	-
สารสกัดขาเขียว 15.6 ng/μl	-	-	-	10	-	-	-	-
สารสกัดขาเขียว 31.2 ng/μl	-	-	-	-	10	-	-	-
สารสกัดขาเขียว 62.5 ng/μl	-	-	-	-	-	10	-	-
สารสกัดขาเขียว 125 ng/μl	-	-	-	-	-	-	10	-
สารสกัดขาเขียว 250 ng/μl								10
	Incubate 37 °C 30 นาที							
AAPH 10.0 mM	-	10	10	10	10	10	10	
	Incubate 37 °C 90 นาที							
gel loading buffer	5	5	5	5	5	5	5	
agarose gel	หยอด 20 uL ลงบน 1 % agarose gel							
electrophoresis	Run gel 45V/20 mA นาน 1 ชม.							
ย้อม Ethidium bromide	ย้อม gel 30 นาที							
ล้างน้ำ	30 นาที							

### 5.3.2 ศึกษาผลของสารสกัดชาอูหลงต่อการป้องกันการทำลาย pBluescript จาก AAPH

- 1.) เตรียมสารสกัดใบชาอูหลง เช่นเดียวกับการเตรียมสารสกัดชาเขียว
- 2.) ปิเปตต์ pBluescript PBS บัฟเฟอร์ pH 7.4 และสารสกัดชาอูหลงที่มีความเข้มข้น 7.8 15.6 31.2 62.5 125 และ 250 ng/μl ลงในหลอดทดลอง ปริมาตรตามตารางที่ 3.6
- 3.) ปฏิบัติเช่นเดียวกับข้อ 5.3.1 ข้อย่อยที่ 3.) – 6.)

ตารางที่ 3.6 การศึกษาผลของสารสกัดชาอูหลงต่อการป้องกันการทำลาย pBluescript จาก AAPH

สารที่เติม (μl)	หลอดที่							
	1	2	3	4	5	6	7	8
pBluescript 25 ng/μl	5	5	5	5	5	5	5	5
PBS buffer pH 7.4	20	10	-	-	-	-	-	-
สารสกัดชาอูหลง 7.8 ng/μl	-	-	10	-	-	-	-	-
สารสกัดชาอูหลง 15.6 ng/μl	-	-	-	10	-	-	-	-
สารสกัดชาอูหลง 31.2 ng/μl	-	-	-	-	10	-	-	-
สารสกัดชาอูหลง 62.5 ng/μl	-	-	-	-	-	10	-	-
สารสกัดชาอูหลง 125 ng/μl	-	-	-	-	-	-	10	-
สารสกัดชาอูหลง 250 ng/μl								10
Incubate 37 °C 30 นาที								
AAPH 10.0 mM	-	10	10	10	10	10	10	
Incubate 37 °C 90 นาที								
gel loading buffer	5	5	5	5	5	5	5	
agarose gel electrophoresis	หยอด 20 μL ลงบน 1 % agarose gel							
	Run gel 45V/20 mA นาน 1 ชม.							
ย้อม Ethidium bromide	ย้อม gel 30 นาที							
ล้างน้ำ	30 นาที							

### 5.3.3 ศึกษาผลของสารสกัดชาดำต่อการป้องกันการทำลาย pBluescript จาก AAPH

- 1.) เตรียมสารสกัดชาดำ : ชั่งใบชา ชาดำ 1.0 กรัม ละลายน้ำเดือดปริมาตร 100 cm<sup>3</sup> คนด้วย magnetic stirrer เบาๆ นาน 10 นาที จะได้สารสกัดชาดำที่มีความเข้มข้น 10,000 ng/μl จากนั้นเจือจางสารสกัดชาดำแบบ serial dilution ในอัตราส่วน 1: 2 จำนวน 7 ครั้ง นำสารสกัดชาดำที่มีความเข้มข้น 2,500, 1,250, 625, 312.5 156.2 และ 78.1 ng/μl มาศึกษา
- 2.) ปิเปตต์ pBluescript PBS บัฟเฟอร์ pH 7.4 และสารสกัดชาอูหลงที่มีความเข้มข้น 7.8, 15.6, 31.2, 62.5, 125 และ 250 ng/μl ลงในหลอดทดลอง ปริมาตรตามตารางที่ 3.5
- 3.) ปฏิบัติเช่นเดียวกับข้อ 5.3. ข้อย่อยที่ 3.) – 6.)

ตารางที่ 3.7 การศึกษาผลของสารสกัดชาดำต่อการป้องกันการทำลาย pBluescript จาก AAPH

สารที่เติม (μl)	หลอดที่							
	1	2	3	4	5	6	7	8
pBluescript 25 ng/μl	5	5	5	5	5	5	5	5
PBS buffer pH 7.4	20	10	-	-	-	-	-	-
สารสกัดชาดำ 78.1 ng/μl	-	-	10	-	-	-	-	-
สารสกัดชาดำ 156.2 ng/μl	-	-	-	10	-	-	-	-
สารสกัดชาดำ 312.5 ng/μl	-	-	-	-	10	-	-	-
สารสกัดชาดำ 625 ng/μl	-	-	-	-	-	10	-	-
สารสกัดชาดำ 1250 ng/μl	-	-	-	-	-	-	10	-
สารสกัดชาดำ 2500 ng/μl								10
	Incubate 37 °C 30 นาที							
AAPH 10.0 mM	-	10	10	10	10	10	10	
	Incubate 37 °C 90 นาที							
gel loading buffer	5	5	5	5	5	5	5	
agarose gel electrophoresis	หยอด 20 μL ลงบน 1 % agarose gel							
	Run gel 45V/20 mA นาน 1 ชม.							
ย้อม Ethidium bromide	ย้อม gel 30 นาที							
ล้างน้ำ	30 นาที							

## บทที่ 4

### ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

#### 1. การวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดชาเขียว ชาอูหลง และชาดำ โดยการหาค่า $IC_{50}$ ของการยับยั้ง DPPH radical

จากการนำสารสกัดใบชา 3 ชนิด คือ ชาเขียว ชาอูหลง และชาดำ สายพันธุ์อัสสัม (*Camillia sinensis* var. *assamica*) มาวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้ง DPPH radical โดยเจือจางสารตัวอย่างแต่ละชนิด ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงหลังการทำปฏิกิริยากับ DPPH อยู่ในช่วงไม่เกิน 0.8 หน่วย เพื่อให้ได้ค่าการทดลองที่ถูกต้อง และหาค่า  $IC_{50}$  จากกราฟ พบว่าสารสกัดใบชาทั้ง 3 ชนิด มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระแตกต่างกัน โดยชาเขียวมีความสามารถยับยั้งสูงสุด รองลงมาคือ ชาอูหลง โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $10.83 \pm 0.15$   $\mu\text{g}$  ใบชา และ  $14.03 \pm 1.27$   $\mu\text{g}$  ใบชา ( $p < 0.01$ ) ตามลำดับ และน้อยที่สุดในชาดำ คือ  $87.94 \pm 2.98$   $\mu\text{g}$  ใบชา (ตารางที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 ค่า  $IC_{50}$  ของสารสกัดชาเขียว ชาอูหลง และชาดำในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH

สารสกัดชา	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g}$ ใบชา)			
	ตัวอย่างที่ 1	ตัวอย่างที่ 2	ตัวอย่างที่ 3	$\bar{X} \pm SD$
ชาเขียว	10.66	10.85	10.97	$10.83 \pm 0.15$
ชาอูหลง	15.28	12.74	14.09	$14.03 \pm 1.27$
ชาดำ	88.81	90.40	84.63	$87.94 \pm 2.98$

#### 2. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดชาเขียว ชาอูหลง และชาดำ

จากการนำสารสกัดใบชา 3 ชนิด มาทำปฏิกิริยากับ Folin-Ciocalteu reagent เพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเป็น mgGAE โดยคำนวณจากสมการ  $y = 0.0111x + 0.0096$  ได้จากกราฟมาตรฐานของ gallic acid ซึ่งพลอตระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและปริมาณ gallic acid ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) ( $R^2 = 0.9955$ ) (ภาพประกอบที่ 3 ในภาคผนวก) พบว่าสารสกัดชาเขียว มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงสุด รองลงมาคือสารสกัดชาอูหลง โดยมีค่าเท่ากับ  $115.86 \pm 2.8$  และ  $108.64 \pm 7.57$  mgGAE/g ตามลำดับ ส่วนสารสกัดชาดำมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกน้อยที่สุดคือ  $28.97 \pm 0.61$  mgGAE/g (ตารางที่ 4.2)

#### ตารางที่ 4.2 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในชาเขียว ชาอูหลง และชาดำ

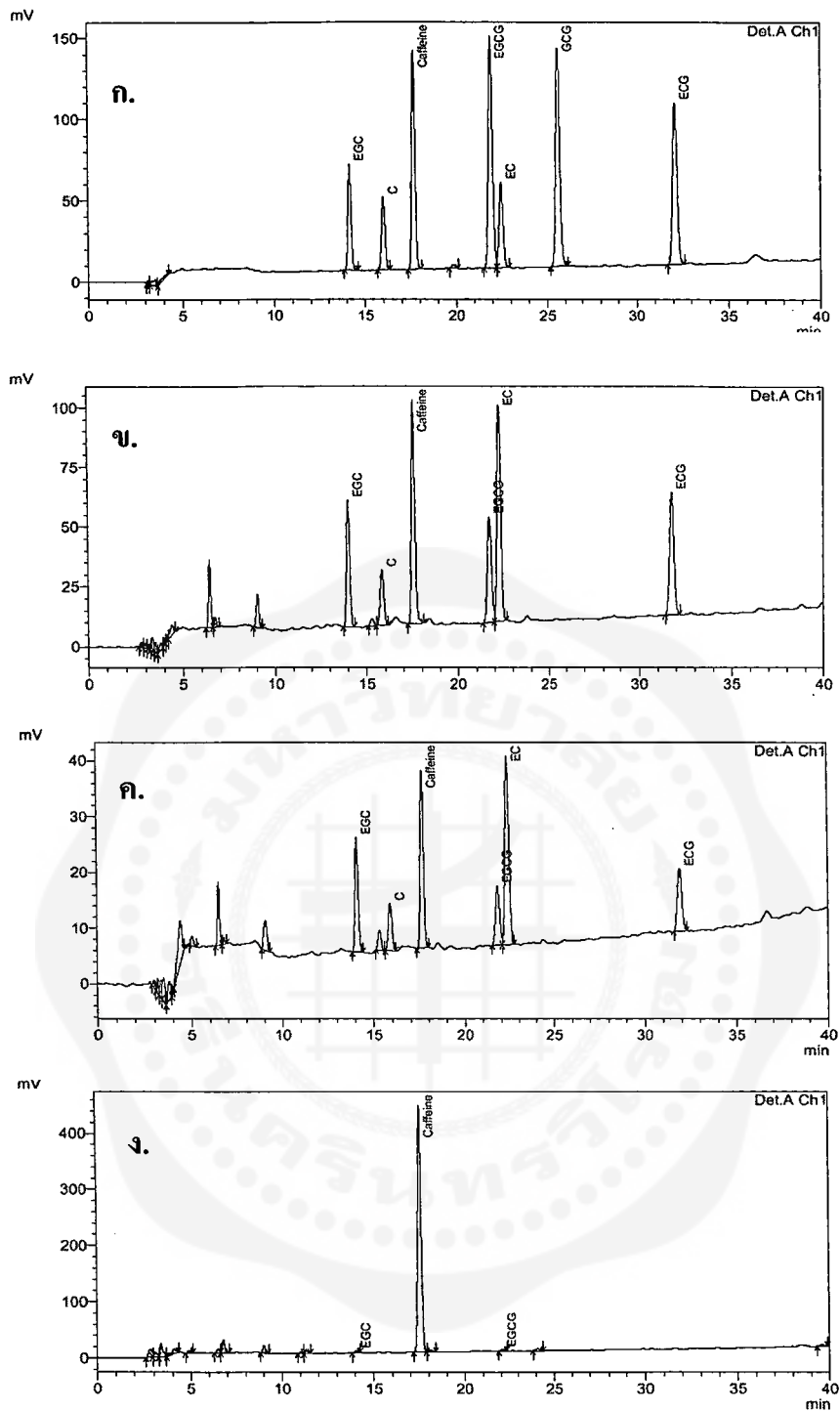
สารสกัดชา	สารประกอบฟีนอลิก (mgGAE/g)			
	ตัวอย่างที่ 1	ตัวอย่างที่ 2	ตัวอย่างที่ 3	$\bar{X} \pm SD$
ชาเขียว	116.73	112.69	118.15	115.86±2.83
ชาอูหลง	106.40	103.06	108.10	108.64±7.57
ชาดำ	29.07	29.85	28.35	28.97±0.61

### 3. การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์กลุ่มคาเทชินในสารสกัดใบชาโดย HPLC

จากการนำสารละลายมาตรฐานผสมที่ 3 ระดับความเข้มข้นของคาเฟอีนและฟลาโวนอยด์มาตรฐาน 6 ชนิด คือ catechin (C) epicatechin (EC) epigallocatechin (EGC) gallocatechin gallate (GCG) epigallocatechin gallate (EGCG) และ epicatechingallate (ECG) มาแยกโดย HPLC (Shimadzu รุ่น LC 20) แบบ reversed phase ด้วยคอลัมน์ deactivated monomeric  $C_{18}$  และชะคอลัมน์แบบ linear gradient ด้วย mobile phase 2 ชนิดคือ buffer A ประกอบด้วย น้ำ และ TFA 0.05% และ buffer B ประกอบด้วย เมทานอล : แอซีโตไนไทรล์ (60 : 40) และ TFA 0.05% แล้วนำมาสร้างกราฟมาตรฐานและโครมาโทแกรม พบว่าผลโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานจะเห็นคาเฟอีนและฟลาโวนอยด์มาตรฐาน 6 ชนิดแยกออกจากกันชัดเจน โดยมีลำดับของ peak เรียงตามลำดับก่อน-หลังในโครมาโทแกรมดังนี้ ECG C Caffeine EGCG EC GCG และ ECG ตามลำดับ (ภาพประกอบที่ 4.1 ก.)

และจากการนำสารสกัดใบชา 3 ชนิด คือ ชาเขียว ชาอูหลง และชาดำ มาแยกและวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์กลุ่มคาเทชินโดย HPLC แบบเดียวกับการแยกสารมาตรฐาน พบว่าผลของโครมาโทแกรมของสารสกัดชาเขียวและชาอูหลงจะคล้ายกัน คือพบ peak ของสารกลุ่มคาเทชินทุกชนิด ยกเว้น GCG (ภาพประกอบที่ 4.1 ข. และ 4.1 ค.) ส่วนในสารสกัดชาดำพบสารกลุ่มคาเทชินเพียง 2 ชนิดเท่านั้น คือ EGC และ EGCG (ภาพประกอบที่ 4.1 ง.)

จากการหาปริมาณคาเทชินในแต่ละ peak ของโครมาโทแกรมของสารสกัดชาเขียว ชาอูหลง และชาดำ แล้ววิเคราะห์ด้วย software ของเครื่อง (Shimadzu LC solution) ผลปรากฏว่าไม่พบ GCG ในสารสกัดชาทั้ง 3 ชนิด ส่วนปริมาณคาเทชิน 4 ชนิด คือ EGC C EGCG และ EC ในชาเขียวและชาอูหลงไม่แตกต่างกัน โดยในชาเขียวมีปริมาณเป็น  $12.48 \pm 0.40$   $5.20 \pm 0.21$   $11.55 \pm 0.73$  และ  $24.03 \pm 0.35$  mg/g ใบชา ตามลำดับ ส่วนชาอูหลงมีปริมาณเป็น  $13.80 \pm 0.21$   $5.23 \pm 0.32$   $8.79 \pm 1.60$  และ  $21.68 \pm 3.58$  mg/g ใบชา ตามลำดับ ยกเว้นปริมาณ ECG พบว่าสารสกัดชาเขียวมีปริมาณสูงกว่าชาอูหลง ( $p < 0.01$ ) คือมีค่าเท่ากับ  $13.49 \pm 0.57$   $7.25 \pm 0.56$  mg/g ใบชา ตามลำดับ เมื่อรวมปริมาณคาเทชินทั้งหมด (total catechin) ในชาเขียวและชาอูหลงพบว่าไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 4.3 และตารางที่ 4.4) ส่วนในชาดำพบสารกลุ่มคาเทชินเพียง 2 ชนิดเท่านั้นคือ EGC และ EGCG และพบในปริมาณน้อยมาก คือ  $0.33 \pm 0.01$  และ  $0.37 \pm 0.01$  mg/g ใบชา ตามลำดับ (ตารางที่ 4.5)



ภาพประกอบที่ 4.1 เปรียบเทียบ โครมาโทแกรมของการแยกสารกลุ่ม catechin โดยวิธี reversed phase HPLC ด้วยคอลัมน์ deactivated monomeric  $C_{18}$  ะคอลัมน์แบบ linear gradient

- ก. caffeine และ flavonoid มาตรฐาน 6 ชนิด
- ข. สารสกัดชาเขียว 7.14 mg/ml
- ค. สารสกัดชาอูหลง 1.43 mg/ml
- ง. สารสกัดชาดำ 30 mg/ml

ตารางที่ 4.3 ปริมาณคาเฟอีนและคาเทชินต่างๆ ในสารสกัดชาเขียว

	Catechin (mg/g ใบชา)			
	ตัวอย่างที่ 1	ตัวอย่างที่ 2	ตัวอย่างที่ 3	$\bar{X} \pm SD$
Caffeine	19.95	19.53	21.42	20.3±0.39
EGC	12.04	11.69	13.72	12.48±0.40
C	4.97	5.39	5.25	5.20±0.21
EGCG	10.15	10.5	14.00	11.55±0.73
EC	24.43	23.73	23.94	24.03±0.35
GCG	ND	ND	ND	ND
ECG	12.39	12.67	15.4	13.49±0.57
Catechin รวม	63.98	63.98	72.31	66.76±4.81

ND = not detected

ตารางที่ 4.4 ปริมาณคาเฟอีนและคาเทชินต่างๆ ในสารสกัดชาอูหลง

	Catechin (mg/g ใบชา)			
	ตัวอย่างที่ 1	ตัวอย่างที่ 2	ตัวอย่างที่ 3	$\bar{X} \pm SD$
Caffeine	17.15	19.08	18.38	18.20±0.97
EGC	14.00	13.58	13.83	13.80±0.21
C	4.90	5.53	5.25	5.23±0.32
EGCG	9.28	10.08	7.00	8.79±1.60
EC	22.75	23.55	18.73	21.68±3.58
GCG	ND	ND	ND	ND
ECG	7.53	7.62	6.61	7.25±0.56
Catechin รวม	58.46	60.36	51.42	56.75±4.71

ND = not detected

ตารางที่ 4.5 ปริมาณคาเฟอีนและคาเทชินต่างๆ ในสารสกัดชาดำ

	Catechin (mg/g ใบชา)			
	ตัวอย่างที่ 1	ตัวอย่างที่ 2	ตัวอย่างที่ 3	$\bar{X} \pm SD$
Caffeine	15.72	15.12	15.55	15.46±0.31
EGC	0.34	0.33	0.33	0.33±0.01
C	ND	ND	ND	ND
EGCG	0.37	0.35	0.37	0.37±0.01
EC	ND	ND	ND	ND
GCG	ND	ND	ND	ND
ECG	ND	ND	ND	ND
Catechin รวม	0.71	0.68	0.70	0.70±0.02

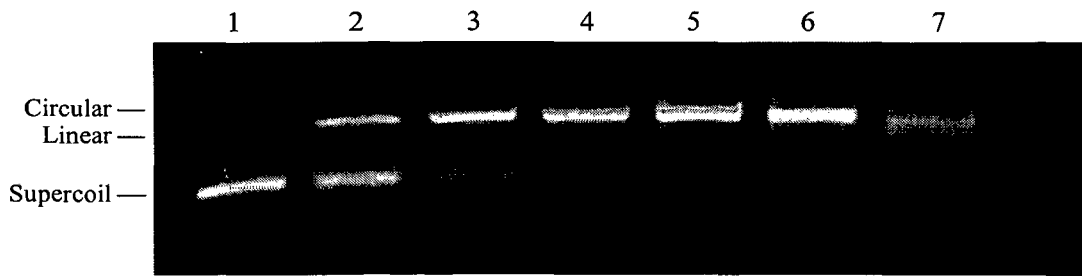
ND = not detected

#### 4. ศึกษาความสามารถของสารสกัดใบชาต่อการป้องกันการทำลายดีเอ็นเอจากอนุมูลอิสระ

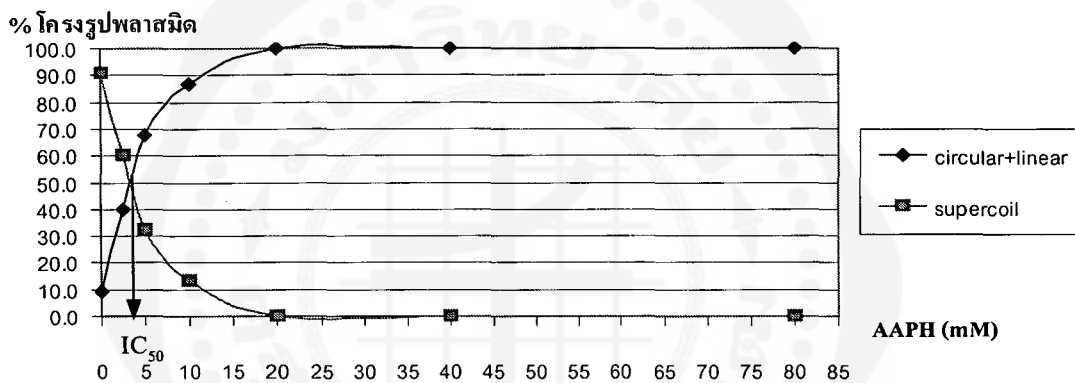
##### 4.1 ศึกษาความเข้มข้นของ AAPH ที่มีผลต่อการทำลาย pBluescript

จากการใช้อนุมูลอิสระ AAPH ที่ความเข้มข้น 2.5 5 10 20 40 และ 80 mM มาชักนำให้เกิดการทำลายพลาสมิด pBluescript ทำให้เปลี่ยนโครงรูปจาก supercoil ไปเป็นโครงรูป circular และ linear ตามลำดับ ซึ่งแยกออกจากกันได้ในสนามไฟฟ้าของ agarose gel electrophoresis โดยพลาสมิดโครงรูป supercoil จะเคลื่อนที่ไปได้ไกลกว่าโครงรูป linear และ circular ตามลำดับ เมื่อนำ agarose gel ที่แยกได้ไปทำ gel documentation ด้วยเครื่อง Syngene รุ่น G-Box ประกอบด้วยการถ่ายภาพเจลด้วย software Genesnap (ภาพประกอบที่ 4.2) และวิเคราะห์ข้อมูลด้วย software Genetool ซึ่งจะให้ข้อมูลของแต่ละแถบเป็นปริมาณในรูปแบบ raw volume แล้วนำข้อมูลไปคำนวณหาปริมาณเป็นร้อยละของพลาสมิด 3 โครงรูป คือ โครงรูป supercoil circular และ linear จากนั้นนำไปคำนวณหาปริมาณ โครงรูปพลาสมิดที่ถูกทำลายสภาพธรรมชาติคือ โครงรูป linear รวมกับ โครงรูป circular ส่วนโครงรูปที่ไม่ถูกทำลายสภาพธรรมชาติ คือ โครงรูป supercoil แล้วพลอตกราฟระหว่างปริมาณ AAPH กับร้อยละของโครงรูปพลาสมิดที่ถูกทำลายและ โครงรูปที่ไม่ถูกทำลายสภาพธรรมชาติ (ภาพประกอบที่ 4.3)

ผลการวิจัยพบว่าความเสียหายของพลาสมิดมีลักษณะแปรตามปริมาณของ AAPH ที่ใช้ หรือเรียกว่า dose dependent



ภาพประกอบที่ 4.2 รูปแบบ agarose gel electrophoresis ของพลาสมิด pBluescript (25 ng/ $\mu$ l) ปริมาตร 10  $\mu$ l ทำปฏิกิริยากับ AAPH ที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 10  $\mu$ l ใน PBS pH 7.4 ปริมาตร 10  $\mu$ l ที่ 37 °C เป็นเวลา 90 นาที Lane 1 : ควบคุม; Lane 2 : 2.5 mM AAPH; Lane 3 : 5 mM AAPH; Lane 4 : 10 mM AAPH; Lane 5 : 20 mM AAPH; Lane 6 : 40 mM AAPH ; Lane 7 : 80 mM AAPH



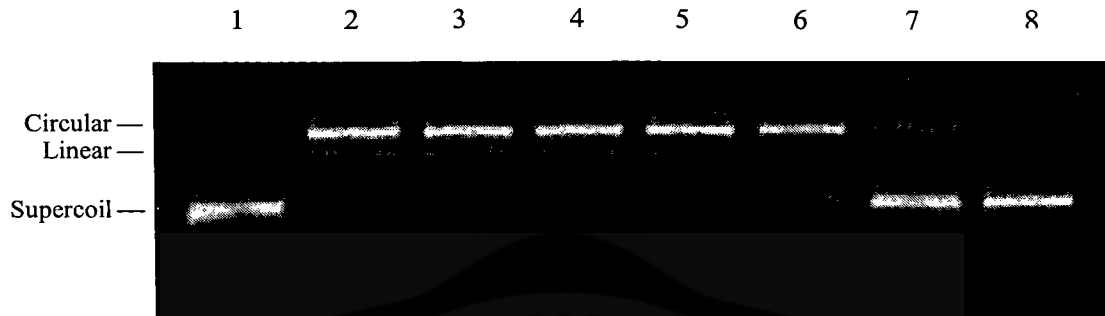
ภาพประกอบที่ 4.3 ปริมาณร้อยละของโครงสร้างพลาสมิด pBluescript ที่ถูกทำลายสภาพธรรมชาติ (circular + linear) แปรตามปริมาณของ AAPH ที่เพิ่มขึ้น

#### 4.2 ศึกษาความสามารถของ Trolox ต่อการป้องกันการทำลาย pBluescript จาก AAPH

จากการใช้ trolox ที่ความเข้มข้น 2.5 5 10 20 40 และ 80 mM ปริมาตร 10  $\mu$ l เติมลงในพลาสมิด pBluescript (25 ng/ $\mu$ l) ปริมาตร 10  $\mu$ l ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นระยะ 30 นาที ก่อนการชักนำให้เกิดการทำลายดีเอ็นเอของพลาสมิดด้วย 10 mM AAPH ปริมาตร 10  $\mu$ l ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 90 นาที แล้วนำไปแยกด้วย agarose gel electrophoresis นำแผ่นเจลที่ได้ไปถ่ายรูปและวิเคราะห์แถบที่แยกได้ด้วย gel documentation (ภาพประกอบที่ 4.4)

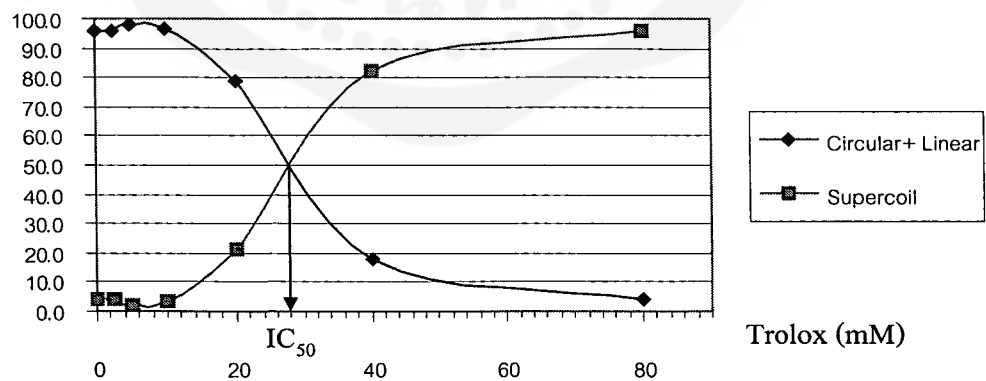
จากนั้นนำข้อมูลไปคำนวณหาร้อยละของพลาสมิด โครงรูปที่ถูกทำลายสภาพธรรมชาติ แล้วพลอตกราฟระหว่างปริมาณ trolox กับร้อยละของโครงสร้างพลาสมิดที่ถูกทำลายและโครงสร้างที่ไม่ถูกทำลายสภาพธรรมชาติ (ภาพประกอบที่ 4.5)

ผลการวิจัยพบว่า trolox สามารถป้องกันการเสียหายของพลาสมิด pBluescript จากอนุมูลอิสระ AAPH ได้ โดยมีลักษณะแปรตามปริมาณ trolox ที่ใช้ จากกราฟพบว่า trolox ที่ความเข้มข้น 28 mM สามารถยับยั้งความเสียหายของพลาสมิดได้ 50 % ซึ่งคำนวณเป็นค่า  $IC_{50}$  ของ trolox เท่ากับ 9.33 mM



ภาพประกอบที่ 4.4 ผลของ trolox ที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 10  $\mu$ l ต่อการป้องกันการทำลายพลาสมิด pBluescript (25 ng/ $\mu$ l) ปริมาตร 5  $\mu$ l ที่ถูกชักนำด้วย 10 mM AAPH ปริมาตร 10  $\mu$ l ใน PBS pH 7.4 ปริมาตร 10  $\mu$ l ที่ 37  $^{\circ}$ C เป็นเวลา 90 นาที Lane 1 : ควบคุม; Lane 2 : 0 mM Trolox; Lane 3 : 2.5 mM Trolox; Lane 4 : 5 mM Trolox; Lane 5 : 10 mM Trolox; Lane 6 : 20 mM Trolox ; Lane 7 : 40 mM Trolox; Lane 8 : 80 mM Trolox

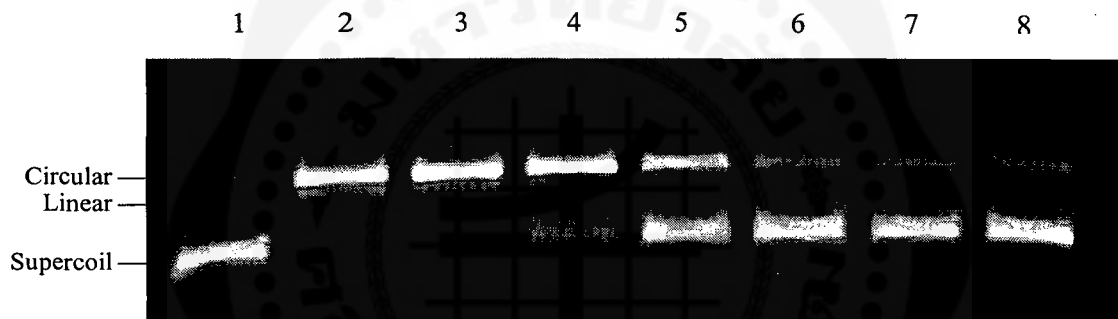
% โครงรูปของพลาสมิด



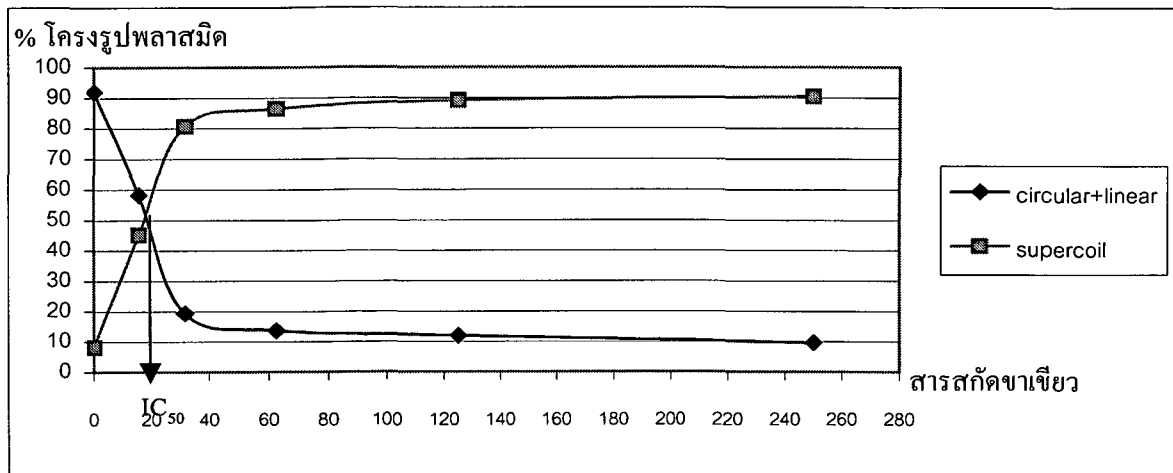
ภาพประกอบที่ 4.5 ผลของ Trolox ที่ความเข้มข้น 0 2.5 5 10 20 40 และ 80 mM ต่อร้อยละของโครงสร้างพลาสมิด pBluescript ที่ถูกชักนำให้เกิดการทำลายสภาพธรรมชาติด้วย 10 mM AAPH ปริมาตร 10  $\mu$ l

### 4.3 ศึกษาผลของสารสกัดชาเขียวต่อการป้องกันการทำลาย pBluescript จาก AAPH

จากการใช้สารสกัดชาเขียวเข้มข้น 7.8, 15.6, 31.2, 62.5, 125 และ 250 ng/μl ปริมาตร 10 μl ผสมกับ pBluescript (25 ng/μl) ปริมาตร 5 μl ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที แล้วชักนำให้เกิดการทำลาย pBluescript ด้วย 10 mM AAPH ปริมาตร 10 μl ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 90 นาที นำไปแยกด้วย agarose gel electrophoresis นำแผ่นเจลที่ได้ไปถ่ายรูปและวิเคราะห์แถบที่แยกได้ด้วย gel documentation (ภาพประกอบที่ 4.6) นำข้อมูลไปคำนวณหาร้อยละของโครงสร้างพลาสมิดที่ถูกทำลายและที่ไม่ถูกทำลายสภาพธรรมชาติ แล้วพลอตกราฟระหว่างปริมาณสารสกัดชาเขียวกับร้อยละของโครงสร้างพลาสมิดที่ถูกทำลายและโครงสร้างที่ไม่ถูกทำลายสภาพธรรมชาติ (ภาพประกอบที่ 4.7) พบว่าสารสกัดชาเขียว แสดงความสามารถในการป้องกันการเสียหายของพลาสมิด pBluescript จากอนุมูลอิสระ AAPH ในลักษณะแปรตามปริมาณสารสกัดใบชาที่ใช้ โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $18.2 \pm 1.7$  ng ใบชา



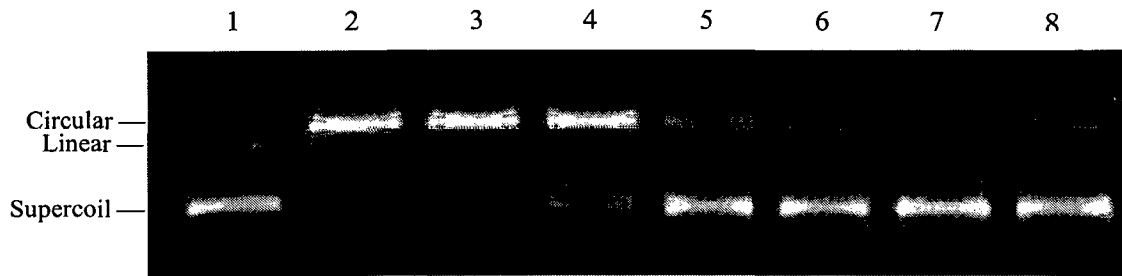
**ภาพประกอบที่ 4.6** ผลของสารสกัดชาเขียวที่ความเข้มข้น 0-250 ng/μl ปริมาตร 10 μl ต่อพลาสมิด pBluescript เข้มข้น 25ng/μl ปริมาตร 5 μl ที่ถูกชักนำด้วย 10 mM AAPH ปริมาตร 10 μl ในบัฟเฟอร์ PBS pH 7.4 ที่ 37 °C เป็นเวลา 90 นาที  
 Lane 1 : ควบคุม; Lane 2 : สารสกัดชาเขียว 0 ng/μl;  
 Lane 3 : สารสกัดชาเขียว 7.8 ng/μl; Lane 4 : สารสกัดชาเขียว 15.6 ng/μl;  
 Lane 5 : สารสกัดชาเขียว 31.3ng/μl ; Lane 6 : สารสกัดชาเขียว 62.5 ng/μl;  
 Lane 7 : สารสกัดชาเขียว 125 ng/μl; Lane 8 : สารสกัดชาเขียว 250 ng/μl



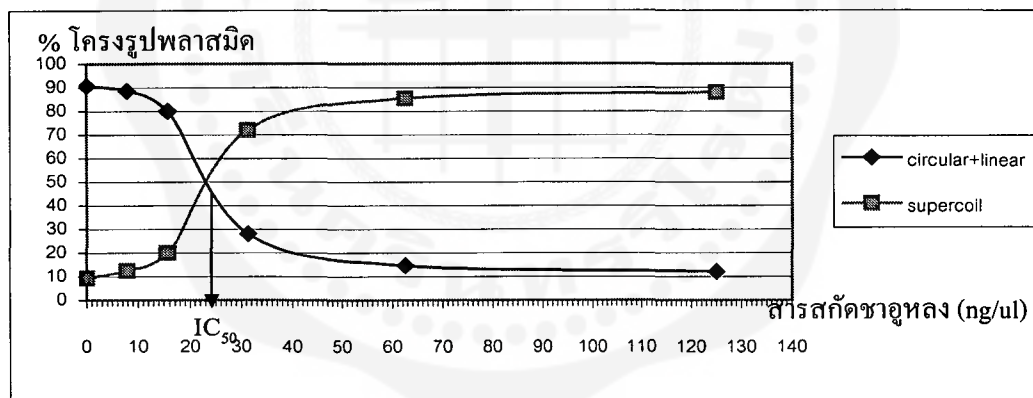
ภาพประกอบที่ 4.7 ผลของสารสกัดชาเขียวที่ความเข้มข้น 0- 250 ng/μl ต่อร้อยละของโครงสร้างของพลาสมิด pBluescript ที่ถูกชักนำให้เกิดการทำลายสภาพธรรมชาติด้วย AAPH

#### 4.4 ศึกษาผลของสารสกัดชาอูหลงต่อการป้องกันการทำลาย pBluescript จาก AAPH

จากการใช้สารสกัดชาอูหลงเข้มข้น 7.8 15.6 31.2 62.5 125 และ 250 ng/μl ปริมาตร 10 μl ผสมกับ pBluescript (25ng/μl) ปริมาตร 5 μl ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที แล้วชักนำให้เกิดการทำลาย pBluescript ด้วย 10 mM AAPH ปริมาตร 10 μl ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 90 นาที นำไปแยกด้วย agrose gel electrophoresis นำแผ่นเจลที่ได้ไปถ่ายภาพและวิเคราะห์แถบที่แยกได้ด้วย gel documentation (ภาพประกอบที่ 4.8) นำข้อมูลไปคำนวณหาร้อยละของโครงสร้างพลาสมิดที่ถูกทำลายและที่ไม่ถูกทำลายสภาพธรรมชาติ แล้วพลอตกราฟระหว่างปริมาณ AAPH กับร้อยละของโครงสร้างพลาสมิดที่ถูกทำลาย และโครงสร้างที่ไม่ถูกทำลายสภาพธรรมชาติ (ภาพประกอบที่ 4.9) พบว่าสารสกัดชาอูหลง แสดงความสามารถในการป้องกันการเสียหายของพลาสมิด pBluescript จากอนุมูลอิสระ AAPH ในลักษณะแปรตามปริมาณสารสกัดใบชาที่ใช้ โดยมีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 21.8±1.0 ng ใบชา



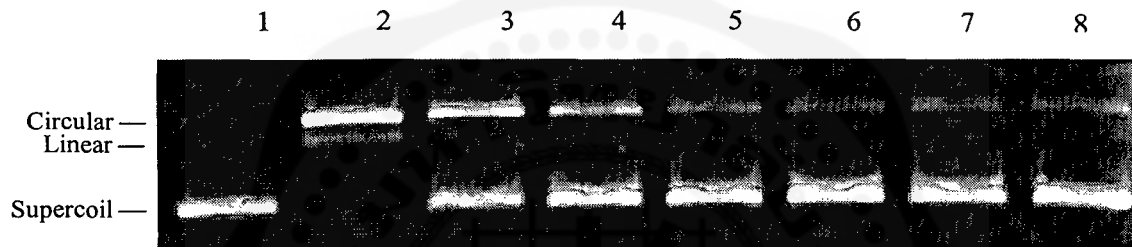
**ภาพประกอบที่ 4.8** ผลของสารสกัดชาอูหลงที่ความเข้มข้น 0-250 ng/μl ปริมาตร 10 μl ต่อพลาสมิด pBluescript เข้มข้น 25ng/μl ปริมาตร 5 μl ที่ถูกชักนำด้วย 10 mM AAPH ปริมาตร 10 μl ในบัฟเฟอร์ PBS pH 7.4 ที่ 37 °C เป็นเวลา 90 นาที  
 Lane 1 : ควบคุม; Lane 2 : สารสกัดชาเขียว 0 ng/μl;  
 Lane 3 : สารสกัดชาอูหลง 7.8 ng/μl; Lane 4 : สารสกัดอูหลง 15.6 ng/μl;  
 Lane 5 : สารสกัดชาอูหลง 31.3 ng/μl ; Lane 6 : สารสกัดชาอูหลง 62.5 ng/μl;  
 Lane 7 : สารสกัดชาอูหลง 125 ng/μl; Lane 8 : สารสกัดชาอูหลง 250 ng/μl



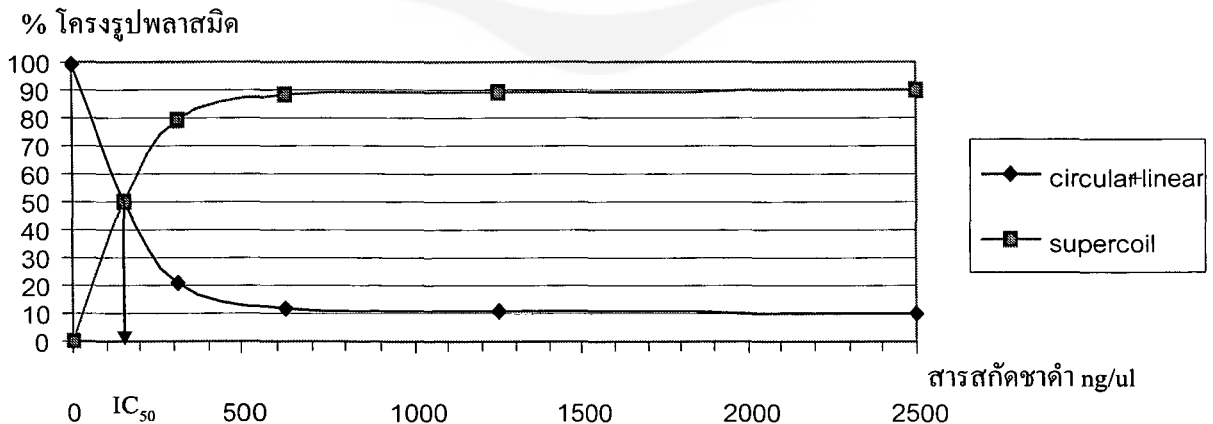
**ภาพประกอบที่ 4.9** ผลของสารสกัดชาเขียวที่ความเข้มข้น 0- 250 ng/μl ต่อร้อยละของ โครงรูปของพลาสมิด pBluescript ที่ถูกชักนำให้เกิดการทำลายสภาพธรรมชาติด้วย AAPH

#### 4.5 ศึกษาผลของสารสกัดชาดำต่อการป้องกันการทำลาย pBluescript จาก AAPH

จากการใช้สารสกัดชาดำเข้มข้น 78 156 312 625 1,250 และ 2,500 ng/ $\mu$ l ปริมาตร 10  $\mu$ l ผสมกับ pBluescript (5ng/ $\mu$ l) ปริมาตร 5  $\mu$ l ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที แล้วชักนำให้เกิดการทำลาย pBluescript ด้วย 10 mM AAPH ปริมาตร 5  $\mu$ l ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 90 นาที นำไปแยกด้วย agarose gel electrophoresis นำแผ่นเจลที่ได้ไปถ่ายรูปและวิเคราะห์แถบที่แยกได้ด้วย gel documentation (ภาพประกอบที่ 4.10) นำข้อมูลไปคำนวณหาร้อยละของโครงสร้างพลาสมิดที่ถูกทำลาย และที่ไม่ถูกทำลายสภาพธรรมชาติ แล้วพลอตกราฟระหว่างปริมาณ AAPH กับร้อยละของโครงสร้างพลาสมิดที่ถูกทำลายและโครงสร้างที่ไม่ถูกทำลายสภาพธรรมชาติ (ภาพประกอบที่ 4.11) ผลการวิจัยพบว่าสารสกัดชาดำแสดงความสามารถในการป้องกันการเสียหายของพลาสมิด pBluescript จากอนุมูลอิสระ AAPH ในลักษณะแปรตามปริมาณสารสกัดใบชาที่ใช้ โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $148.7 \pm 11.8$  ng ใบชา



ภาพประกอบที่ 4.10 ผลของสารสกัดชาดำที่ความเข้มข้น 0-5,000 ng/ $\mu$ l ปริมาตร 10  $\mu$ l ต่อพลาสมิด pBluescript เข้มข้น 5ng/ $\mu$ l ปริมาตร 5  $\mu$ l ที่ถูกชักนำด้วย 10 mM AAPH ปริมาตร 10  $\mu$ l ในบัฟเฟอร์ PBS pH 7.4 ที่ 37°C เป็นเวลา 90 นาที  
Lane 1 : ควบคุม; Lane 2 : สารสกัดชาดำ 0 ng/ $\mu$ l;  
Lane 3 : สารสกัดชาดำ 156 ng/ $\mu$ l; Lane 4 : สารสกัดชาดำ 313 ng/ $\mu$ l;  
Lane 5 : สารสกัดชาดำ 625 ng/ $\mu$ l; Lane 6 : สารสกัดชาดำ 1,250 ng/ $\mu$ l;  
Lane 7 : สารสกัดชาดำ 2,500 ng/ $\mu$ l; Lane 8 : สารสกัดชาดำ 5,000 ng/ $\mu$ l



ภาพประกอบที่ 4.11 ผลของสารสกัดชาดำที่ความเข้มข้น 0- 5,000 ng/ $\mu$ l ต่อร้อยละของโครงสร้างของพลาสมิด pBluescript ที่ถูกชักนำให้เกิดการทำลายสภาพธรรมชาติด้วย AAPH

## บทที่ 5

### สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

จากผลการวิจัยที่รายงานว่าอนุมูลอิสระเป็นตัวการสำคัญที่ก่อให้เกิดความเสียหายแก่ดีเอ็นเอ อันเป็นสาเหตุของการเกิดโรคมะเร็งหลายชนิด จึงจำเป็นที่ร่างกายต้องได้รับสารต้านอนุมูลอิสระ อย่างเพียงพอเพื่อป้องกันการทำลายดีเอ็นเอ และเป็นที่ยอมรับกันว่าใบชาเป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญ โดยใบชาที่จำหน่ายในท้องตลาดมี 3 ชนิดแตกต่างกันที่กระบวนการหมัก คือ ชาเขียว ชาอูหลง และชาดำ พบว่ากระบวนการหมักทำให้สารต้านอนุมูลอิสระส่วนหนึ่งเสียไป อันจะทำให้ความสามารถในการปกป้องดีเอ็นเอจากอนุมูลอิสระเสียไปด้วย ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาความสามารถของสารสกัดใบชา 3 ชนิดที่แตกต่างกันในกระบวนการหมักในด้านการปกป้องดีเอ็นเอจากอนุมูลอิสระ

ใบชามี 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ชาจีน และสายพันธุ์อัสสัม ประเทศไทยมีการปลูกทั้ง 2 สายพันธุ์ แหล่งปลูกใบชาที่สำคัญของประเทศอยู่ที่จังหวัดเชียงราย สายพันธุ์ชาจีนต้องการการดูแลมาก ต้องมีการจัดการน้ำและการเกษตรอย่างเป็นระบบ ทำให้มีราคาค่อนข้างสูง นิยมผลิตเป็นชาเขียวและชาอูหลง ไม่ผลิตเป็นชาดำ ส่วนสายพันธุ์อัสสัมดูแลรักษาง่ายกว่า ทำให้ต้นทุนการผลิตไม่สูงมากนัก และสามารถนำไปผลิตเป็น ชาเขียว ชาอูหลง และชาดำ ชาสายพันธุ์อัสสัมจึงมีครบทั้ง 3 ชนิด และวางจำหน่ายในท้องตลาดมากกว่าสายพันธุ์ชาจีน

สารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญในใบชา คือสารประกอบพอลิฟีนอลกลุ่มคาเทชิน แต่ละสายพันธุ์จะมีปริมาณคาเทชินแตกต่างกันไป นอกจากนี้ฤดูกาลเพาะปลูกก็ยังเป็นปัจจัยสำคัญต่อปริมาณคาเทชิน โดยชาที่เก็บเกี่ยวในฤดูร้อนจะมีปริมาณพอลิฟีนอลต่อน้ำหนักชาแห้งสูงกว่าที่เก็บในฤดูใบไม้ผลิ (Yamamoto, et al., 1997) การวิจัยนี้ผู้วิจัยจึงใช้ตัวอย่างใบชาสายพันธุ์อัสสัมซึ่งมีการผลิตใบชาครบทั้ง 3 ชนิด และเป็นตัวอย่างที่ผลิตจากผู้ประกอบการรายเดียวกันที่ปลูกในจังหวัดเชียงราย และปลูกในฤดูเดียวกัน

ขั้นแรกของการวิจัย คือการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของใบชาทั้ง 3 ชนิด และวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบพีนอลิกในรูปของ mgGAE/g ใบชา ตามด้วยการวิเคราะห์ปริมาณสารแต่ละชนิดในกลุ่มคาเทชินโดยวิธี HPLC แบบ reversed phase chromatography ขั้นต่อมาจึงทดสอบความสามารถของสารสกัดใบชาในการป้องกันการเสียหายของดีเอ็นเอ โดยใช้พลาสมิด pBluescript เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ

การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ได้ใช้ DPPH radical เป็นอนุมูลอิสระ ผสมกับสารสกัดใบชา ซึ่งเตรียมได้แบบเดียวกับน้ำชาที่บริโภคทั่วไป สารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจะ

ทำปฏิกิริยากับ DPPH radical ทำให้ปริมาณ DPPH radical ลดลง (ภาพประกอบที่ 1 ในภาคผนวก) แล้วนำไปคำนวณหาค่าการยับยั้งในรูปร้อยละของการยับยั้ง (% inhibition) เลือกใช้ค่าการยับยั้ง DPPH radical ที่ร้อยละ 50 ( $IC_{50}$ ) (ภาพประกอบที่ 2 ในภาคผนวก) เพื่อนำไปเปรียบเทียบว่าสารสกัดใบชาทั้ง 3 ชนิดชนิดใดมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่ากัน โดยสารสกัดใดมีค่า  $IC_{50}$  น้อยกว่าแสดงว่ามีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมากกว่า

จากสารสกัดใบชาทั้ง 3 ชนิดพบว่าสารสกัดชาเขียวมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด รองลงมาคือชาอูหลง โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $10.83 \pm 0.15$  และ  $14.03 \pm 1.27$   $\mu\text{g}$  ใบชา ( $p < 0.01$ ) ตามลำดับ ส่วนในชาดำพบว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระลดลงอย่างมาก โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $87.94 \pm 2.98$   $\mu\text{g}$  ใบชา และผลจากการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกพบว่า เป็นไปในทำนองเดียวกัน คือชาเขียวมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงกว่าชาอูหลง โดยมีค่าเท่ากับ  $115.86 \pm 2.83$  และ  $108.64 \pm 7.57$   $\text{mgGAE/g}$  ใบชา ( $p < 0.01$ ) ตามลำดับ และปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ลดลงอย่างมากในชาดำ โดยมีค่าเท่ากับ  $28.97 \pm 0.61$   $\text{mgGAE/g}$  ใบชา ซึ่งแสดงว่าสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดใบชาทั้ง 3 ชนิด น่าจะเป็นสารประกอบฟีนอลิก โดยสารสกัดใบชาที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดี จะมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ ชันและคณะ (Chan et al., 2007) ที่ว่า ใบชาชนิดต่างๆ แสดงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระไม่เท่ากัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปริมาณพอลิฟีนอลในใบชา

ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบพอลิฟีนอลกลุ่มคาเทชินแต่ละชนิดด้วยเครื่อง HPLC (ตารางที่ 5.1) ปรากฏว่าไม่พบ GCG ในสารสกัดชาทั้ง 3 ชนิด ส่วนคาเทชินอีก 4 ชนิดคือ EGC C EGCG และ EC พบได้ในสารสกัดชาเขียวและชาอูหลง โดยมีปริมาณ ไม่แตกต่างกัน เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธีการทางสถิติ (t-test) โดยมีค่าเป็น  $12.48 \pm 0.40$   $5.20 \pm 0.21$   $11.55 \pm 0.73$  และ  $24.03 \pm 0.35$   $\text{mg/g}$  ใบชา ตามลำดับ ในสารสกัดชาเขียว และมีค่าเป็น  $13.80 \pm 0.21$   $5.23 \pm 0.32$   $8.79 \pm 1.60$  และ  $21.68 \pm 3.58$   $\text{mg/g}$  ใบชา ตามลำดับ ในสารสกัดชาอูหลง ยกเว้น ECG ในชาเขียวมีปริมาณมากกว่า ( $13.49 \pm 0.57$   $\text{mg/g}$  ใบชา) ในชาอูหลง ( $7.25 \pm 0.56$   $\text{mg/g}$  ใบชา) ( $p < 0.01$ ) อย่างไรก็ตามเมื่อรวมปริมาณคาเทชินทั้งหมดในสารสกัดชา พบว่าปริมาณคาเทชินรวมในสารสกัดชาเขียวและชาอูหลงไม่แตกต่างกันเมื่อวิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธีการทางสถิติ (t-test) โดยมีค่าเป็น  $66.76 \pm 4.81$   $\text{mg/g}$  ใบชา ในสารสกัดชาเขียว และ  $56.75 \pm 4.71$   $\text{mg/g}$  ใบชา ในสารสกัดชาอูหลง ส่วนในสารสกัดชาดำพบว่าคาเทชินต่างๆ หายไปเกือบหมด กล่าวคือเหลือปริมาณคาเทชินรวมเท่ากับ  $0.70 \pm 0.02$   $\text{mg/g}$  ใบชา เท่านั้น

แสดงว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของชาเขียว ( $IC_{50} = 10.83 \pm 0.15$   $\mu\text{g}$  ใบชา) ซึ่งมากกว่าชาอูหลง ( $IC_{50} = 14.03 \pm 1.27$   $\mu\text{g}$  ใบชา) นั้น อาจไม่ได้มาจากสารกลุ่มคาเทชินในใบชาเพียงอย่างเดียว อาจเป็นสารประกอบพอลิฟีนอลกลุ่มอื่นหรือสารประกอบอื่นในใบชา สอดคล้องกับ ลาวร์เดสและคณะ (Lourdes, et al., (1998) ได้รายงานถึงการพบเคอร์ซีติน ซึ่งเป็นพอลิฟีนอลกลุ่มฟลาโวนอล (คาเทชินเป็นกลุ่มฟลาโวนอล) ในชาเขียว เมื่อผ่านกระบวนการหมัก สารกลุ่ม

ดังกล่าวในชาอูหลงอาจถูกสลายไปหรือเปลี่ยนไปเป็นสารอื่นได้ง่ายกว่าพอลิฟีนอลกลุ่มคาเทชิน จึงทำให้ไม่เห็นความแตกต่างของปริมาณคาเทชินในสารสกัดใบชาทั้ง 2 ชนิด ส่วนในสารสกัดชาค่านั้นมีการลดลงอย่างมากทั้งความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ( $IC_{50}=87.94\pm 2.98$   $\mu\text{g}$ ใบชา) และปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ( $28.97\pm 0.61$   $\text{mgGAE/g}$ ใบชา) แสดงว่าสารประกอบพอลิฟีนอลสูญเสียไปในระหว่างกระบวนการหมัก โดยชาเขียว ชาอูหลง และชาดำผ่านกระบวนการหมักที่แตกต่างกัน จึงมีผลต่อปริมาณพอลิฟีนอลในใบชา โดยชาเขียวซึ่งผ่านกระบวนการหมักน้อยที่สุดมีปริมาณพอลิฟีนอลสูงสุด ชาอูหลงผ่านกระบวนการหมักระยะหนึ่งปริมาณพอลิฟีนอลจึงลดลง และชาดำผ่านกระบวนการหมักจนสมบูรณ์ ปริมาณพอลิฟีนอลจึงลดลงอย่างมาก ซึ่งสอดคล้องกับผลงานวิจัยของ ลัดดาและคณะ (ลัดดาและคณะ 2006)

### ตารางที่ 5.1 ปริมาณคาเฟอีนและคาเทชินรวมในสารสกัดชาเขียว ชาอูหลง และชาดำ

สารสกัด ใบชา	Catechin (mg/gใบชา)							Total Catechin
	caffeine	EGC	C	EGCG	EC	GCG	ECG	
ชาเขียว	20.30±0.39	12.48±0.40	5.20±0.21	11.55±0.73	24.03±0.35	ND	13.49±0.57	66.76±4.81
ชาอูหลง	18.20±0.97	13.80±0.21	5.23±0.32	8.79±1.60	21.68±2.58	ND	7.25±0.56	56.75±4.71
ชาดำ	15.46±0.31	0.33±0.01	ND	0.37±0.01	ND	ND	ND	0.70±0.02

ขั้นตอนมาของการวิจัยคือ การศึกษาการป้องกันความเสียหายของดีเอ็นเอของสารสกัดใบชาจากอนุมูลอิสระ ซึ่งในการวิจัย ผู้วิจัยได้ใช้พลาสมิด pBluescript เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ใช้ AAPH เป็นอนุมูลอิสระ และใช้ tollox เป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน

พลาสมิดปกติมีโครงสร้างเป็น supercoil เมื่อทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ AAPH จะทำให้สายดีเอ็นเอ 1 สายของพลาสมิดเกิดรอยแหวน (nick) ขึ้นจึงกลายเป็นวงออกเป็นโครงสร้าง open circular และต่อมาเมื่อทำปฏิกิริยาต่อไปจนเกิดรอยแหวนขึ้นบนอีกสายหนึ่งรวมเป็น 2 สายจะทำให้มีโครงสร้างเป็น linear ตามลำดับ (Kaur et al, 2008) ซึ่งตรวจวัดได้โดยตรวจการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอทั้ง 3 โครงสร้างด้วย agarose gel electrophoresis โดยดีเอ็นเอโครงสร้าง supercoil เคลื่อนที่ได้ไกลกว่าโครงสร้าง linear และโครงสร้าง open circular ตามลำดับ ดังนั้นจึงพิจารณาความเสียหายของดีเอ็นเอจากโครงสร้างที่ถูกทำลายสภาพธรรมชาติ ซึ่งก็คือผลรวมของโครงสร้าง open circular และโครงสร้าง linear การรายงานความเสียหายจะรายงานในรูปร้อยละของโครงสร้างที่ถูกทำลายสภาพธรรมชาติ ผู้วิจัยได้เลือกใช้ความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้เกิดการยับยั้งการเสียหายของดีเอ็นเอ ณ จุดที่มีโครงสร้างที่ถูกทำลายสภาพธรรมชาติไปร้อยละ 50 ( $IC_{50}$ ) เพื่อใช้เปรียบเทียบความสามารถของสารสกัดใบชา 3 ชนิดต่อการป้องกันการเสียหายของดีเอ็นเอ

มีรายงานการใช้พลาสมิด pBluescript เป็นดีเอ็นเอต้นแบบเพื่อศึกษาการเสียหายจากอนุมูลอิสระ โดย कुमारและชัคโตพาดดิเย (Kumar & Chattopadhyay, 2005) ใช้ pBluescript เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ใช้  $\cdot\text{OH}$  เป็นอนุมูลอิสระ และใช้สารสกัด pudina extract จากพืชพื้นเมือง (*Mentha spicata* Linn.) ของอินเดียเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ สามารถตรวจพบการเสียหายของพลาสมิดเกิดขึ้นใน 2 โครงรูปคือ โครงรูป open circular และ โครงรูป linear และที่ไม่เสียหายเป็น โครงรูป supercoil เดิม ซึ่งทั้ง 3 โครงรูปแยกออกจากกันชัดเจนเมื่อทำ agarose gel electrophoresis โดยเห็นเป็น 3 แถบในแผ่นเจล เรียงตามลำดับการเคลื่อนที่ดังนี้ โครงรูป supercoil > โครงรูป linear > โครงรูป open circular

การวิจัยจึงใช้ pBluescript เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ จากการให้ pBluescript ทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ AAPH พบว่าความเสียหายของพลาสมิดมีลักษณะแปรตามปริมาณ AAPH ที่ใช้ ผู้วิจัยได้เลือกใช้ AAPH ที่ความเข้มข้น 10 mM ปริมาตร 10  $\mu\text{l}$  เป็นปริมาณอนุมูลอิสระที่ใช้ตลอดการวิจัย

จากการศึกษาความสามารถของสารสกัดใบชา 3 ชนิดในการป้องกันการเสียหายของพลาสมิด โดยผสม pBluescript กับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน trolox หรือสารสกัดใบชา เป็นระยะเวลาหนึ่งเพื่อให้เกิดการป้องกันพลาสมิด แล้วใส่อนุมูลอิสระ AAPH ลงไปเพื่อให้เกิดการทำลายพลาสมิด จากนั้นตรวจวัดความเสียหาย พบว่าสารต้านอนุมูลอิสระทุกชนิดทั้ง trolox สารสกัดชาเขียว ชาอูหลง และชาดำ แสดงความสามารถในการป้องกันการเสียหายของพลาสมิดได้ในลักษณะแปรตามปริมาณสารที่ใช้ โดยสารสกัดชาเขียวมีความสามารถสูงที่สุด โดยสูงกว่าสารสกัดชาอูหลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) คือมีค่า  $\text{IC}_{50}$  เท่ากับ  $182 \pm 15$  และ  $218 \pm 10$  ng/ใบชา ตามลำดับ และสูงกว่าสารสกัดชาดำมาก คือมีค่า  $1,520 \pm 61$  ng/ใบชา เมื่อเปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน trolox พบว่า trolox มีค่า  $\text{IC}_{50}$  เท่ากับ 9.33 mM

จากการนำสารสกัดชาเขียว ชาอูหลง และชาดำสายพันธุ์อัสสัมมาวิเคราะห์ความสามารถต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ปริมาณคาเทชินรวม (ตารางที่ 5.2) พบว่าสารสกัดชาเขียวมีความสามารถต้านอนุมูลอิสระประมาณ 1.3 เท่าของชาอูหลง และประมาณ 8 เท่าของชาดำ และเมื่อพิจารณาถึงความสามารถในการป้องกันการเสียหายของพลาสมิดของสารสกัดใบชาทั้ง 3 ชนิด พบว่าสอดคล้องกัน คือชาเขียวมีความสามารถในการป้องกันประมาณ 1.2 เท่าของชาอูหลง และประมาณ 8 เท่าของชาดำ

และพบว่าสารสกัดใบชาที่มีความสามารถต้านอนุมูลอิสระสูง จะมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูง และปริมาณคาเทชินรวมสูงด้วยเช่นกัน แต่ไม่ได้เป็นจำนวนเท่าที่สอดคล้องกันเหมือนกรณีแรก เนื่องจากสารต้านอนุมูลอิสระอาจไม่ได้มีเฉพาะสารประกอบฟีนอลิกเพียงอย่างเดียว อาจมีสารอื่นที่มีสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระด้วย ซึ่งสอดคล้องกับการวิจัยของธารารัตน์ และ รัตนา (รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์, 2007) คือ พบวิตามินซีในสารสกัดชาเขียว ชาอูหลง และชาดำในปริมาณ  $9.2 \pm 0.5$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  ใบชา  $9.3 \pm 1.0$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  ใบชา และ  $3.9 \pm 0.5$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  ใบชา ตามลำดับ

ตารางที่ 5.2 ความสามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH (IC<sub>50</sub>) ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ปริมาณคาเทชินรวม และความสามารถในการป้องกันการเสียหายของพลาสมิด (IC<sub>50</sub>) ของสารสกัดชาเขียว ชาอูหลง และชาดำ และของสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน trolox

สารสกัด	IC <sub>50</sub> ต่อการยับยั้ง DPPH ( $\mu\text{g}$ ใบชา)	สารประกอบฟีนอลิก (mgGAE/g)	คาเทชินรวม (mg/g ใบชา)	IC <sub>50</sub> ต่อการป้องกันการ เสียหายของพลาสมิด (ng ใบชา)*(mM)
ชาเขียว	10.83 $\pm$ 0.15	115.86 $\pm$ 2.83	66.76 $\pm$ 4.81	182 $\pm$ 15
ชาอูหลง	14.03 $\pm$ 1.27	108.64 $\pm$ 7.57	56.75 $\pm$ 4.71	218 $\pm$ 10
ชาดำ	87.94 $\pm$ 2.98	28.97 $\pm$ 0.61	0.70 $\pm$ 0.02	1,520 $\pm$ 61
สารมาตรฐาน				
Trolox				9.33*

จากผลการวิจัยสรุปได้ว่า สารสกัดใบชาแสดงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ โดยแสดงออกให้เห็นในรูปของการป้องกันการเสียหายของดีเอ็นเอของพลาสมิดได้ โดยชาเขียวจะมีประสิทธิภาพดีกว่าชาอูหลงประมาณ 1.2 เท่า และดีกว่าชาดำประมาณ 8 เท่า

การวิจัยนี้ จึงเป็นประโยชน์ในด้านการให้ข้อมูลแก่ผู้บริโภค ที่จะเลือกบริโภคเครื่องดื่มชาที่ให้ประโยชน์ต่อร่างกายสูงสุด ในด้านผู้ประกอบการ และด้านรัฐ จะเป็นข้อมูลที่ส่งเสริมให้มีการปลูกชาและผลิตชาในประเทศที่มีประโยชน์ต่อผู้บริโภค

## บรรณานุกรม

- Aoshima et al., (2007). Antioxidative and anti-hydrogen peroxide activities of various herbal teas. *Food Chemistry*, 103 : 617-622.
- Bakdash, N. & Williams, M.S., (2008). Spatially distinct production of reactive oxygen species regulates platelet activation. *Free Radical Biology and Medicine*, 45: 158-166.
- Blois, M.S. (1958). Antioxidant determinations by the use of stable free radical. *Nature*. 26: 1199-1200.
- Borek, C. (1997). Antioxidant and cancer. *Science and Medicine*, 52-60.
- Rinalducci, et al., (2008). Generation of reactive oxygen species upon strong visible light irradiation of isolated phycobilisomes from *Synechocystis* PCC 6803. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1777: 417-424.
- Bulteau, A.L. et al., (2006). Mitochondrial protein oxidation and degradation in response to oxidative stress and aging. *Experimental Gerontology*, 41: 653-657.
- Cai et al., (2002) Antioxidant effects of green tea polyphenols on free radical initiated peroxidation of rat liver microsomes. *Chemistry and Physics of Lipids* 120: 109-117.
- Cao, et al., (1996). Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44: 3426-3431.
- Chidambara et al., (2002). Antioxidant activity of grape (*Vitis vinifera*) pomace extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50: 5909-5914.
- Cocke, M. S. et al., (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J*. 1195-1214
- Daliuge et al., (1998). Selection of column and gradient elution system for the separation of catechins in green tea using high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 793 : 265-274.
- Ehrenfeld, et al., (1987). Copper-dependent cleavage of DNA by bleomycin. *Biochemistry*, 26 : 931-942.
- Erbaz et al. (2005). Effectiveness of moderate green tea consumption on antioxidative status and plasma lipid profile in humans. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 16 : 144-149.
- Esterbauer, H. et al., (1991). Chemistry and Biochemistry of 4-hydroxynonenal, malondialdehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med*, 1991: 81-123

- Evans, et al., (1997). Reactive oxygen species and their cytotoxic mechanisms. In *Mechanisms of Cell Toxicity* (Chipman, J. K., ed) 20 : 25–73, JAI Press Inc., London.
- Franco, R., et al., (2008). Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis. *Cancer Letters*, 266: 6-11.
- Freese et al., (1999). Green tea extract decreases plasma malondialdehyde concentration but does not affect other indicators of oxidative stress, nitric oxide production, or hemostatic factors during a high-linoleic acid diet in healthy females. *European Journal of Nutrition*, 38 : 149–157.
- Halliwell, B, & Gutteridge JMC, Cross CE. (1992). Free radicals antioxidants and human diseases. Where are we now? *J. Lab. Clin. Med.* 6 : 598-620.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J.M.C. (Eds.) (1997). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford: Oxford University Press.
- Halliwell, B., & Gutteridge, JMC. (1999). Free radicals, other reactive species and disease. In : *Halliwell B, Gutteridge JMC, editors, Free radicals in biology and medicine*. Oxford, UK: Clarendon Press; New York: Oxford University Press, 617-783.
- Halliwell, B., (2002) Effect of diet on cancer development: is oxidative DNA damage a biomarker? *Free Radical Biology and Medicine*, 32 : 968-974.
- Harborne, J. B., (1993) *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986*. Chapman and Hall: London.
- Havsteen, B.H., (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, 96: 67-202.
- Hou et al., (2004). Effect of tea polyphenols on transduction pathways related to cancer chemoprevention. *Mutation Research*, 555 : 3-19.
- Inouye, S. (1984). Site-specific cleavage of double-strand DNA by hydroperoxide of linoleic acid. *FEBS Letters*, 172 : 231–234.
- Jayaprakasha, et al., (2001). Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. *Food Chemistry*, 73: 285-290.
- Jian et al., (2004). Protective effect of green tea against prostate cancer: a case-control study in southeast China. *International Journal of Cancer*, 108 : 130–135.
- Katiyar et al., (2001). Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate treatment of human skin inhibits ultraviolet radiation-induced oxidative stress. *Carcinogenesis*, ;22:287-94

- Kaur, et al., (2008). Antioxidant activity of the phenol rich fractions of leaves of *Chukrasia tabularis* A. Juss. *Bioresource Technology*, 99 :7692-7698
- Klaunic et al. (1999). The effect of tea consumption on oxidative stress in smokers and nonsmokers. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 220 : 249–254.
- Kondo; et al. (1999). Scavenging mechanisms of (-)-epigallocatechin gallate and (-)-epicatechin gallate on peroxy radicals and formation of superoxide during the inhibitory action. *Free Radical Biology and Medicine* 27 : 855–863.
- Kow, Y.W., (2002). Repair of deaminated bases in DNA. *Free Radic Biol Med*, 33:886-893.
- Patra, S.K., (2008). Ras regulation of DNA-methylation and cancer. *Experimental Cell Research*, 314: 1193-1201.
- Kumar & Chattopadhyay, (2007). DNA damage protecting activity and antioxidant potential of pudina extract. *Food Chemistry*, 100 : 1377-1384.
- Lambert & Yang, (2003a). Cancer chemopreventive activity and bioavailability of tea and tea polyphenols. *Mutation Research*, 523–524, 201–208.
- Lambert & Yang, (2003b). Mechanisms of cancer prevention by tea constituents. *Journal of Nutrition*, 133 : 3262S–3267S.
- Leenen et al., (2000). A single dose of tea with or without milk increases plasma antioxidant activity in humans. *European Journal of Clinical Nutrition*, 54 : 87–92.
- Lewis, et al., (1988). Role of oxygen radicals in induction of DNA damage by metabolite of benzene. *Cancer Research*, 48 : 4762–4765.
- Liu et al, (2000). Synergistic effect of green tea polyphenols with trolox on free radical-induced oxidative DNA damage. *Food Chemistry*, 96 : 90-95.
- Lourdes, et al., (1998). Determination of anti-carcinogenic polyphenols present in green tea using capillary electrophoresis coupled to a flow injection system. *Journal of Chromatography A*, 827 : 113-120.
- Michiels, C., et al., (1994). Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for Cell survival against oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 17: 235-248.
- Moller, et al., (2008). Air pollution, oxidative damage to DNA, and carcinogenesis. *Cancer Letters*, 266: 84-97.

- Mukhtar, & Ahmed. (2000). Tea polyphenols: prevention of cancer and optimizing health. *American Journal of Clinical Nutrition*, 71 : 1698S–1702S.
- Nakachi, et al., (1998). Influence of drinking green tea on breast cancer malignancy among Japanese patients. *Japanese Journal of Cancer Research*, 89 : 254–261.
- Niki, E., et al., (2005). Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 338: 668-676.
- Patra, S.K., (2008). Ras regulation of DNA-methylation and cancer. *Experimental Cell Research*, 314: 1193-1201.
- Qing-Yi, et al., (2006). Synergistic effect of green tea polyphenols with trolox on free radical-induced oxidative DNA damage. *Food Chemistry*, 96 : 90-95.
- Raha, S., & Robinson, B.H., (2000). Mitochondria, oxygen free radicals, disease and aging. *TIBS*. 25: 502-508.
- Rinalducci, et al., (2008). Generation of reactive oxygen species upon strong visible light irradiation of isolated phycobilisomes from *Synechocystis* PCC 6803. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1777: 417-424.
- Roessner, et al., (2008). Oxidative stress in ulcerative colitis-associated carcinogenesis. *Pathology - Research and Practice*, 204: 511-524.
- Sawada, et al., (2008). Differential effect of sulfonylureas on production of reactive oxygen species and apoptosis in cultured pancreatic  $\beta$ -cell line, MIN6. *Metabolism*, 57: 1038-1045.
- Singleton, et al., (1999). Analysis of total phenolics by means of Folin-Ciocalteu reagent. In *Methods in Enzymology, Oxidants and Antioxidants, Part A*. Packer, Lester. pp. 152-178. San Diego: Academic press.
- Stadtman, E.R., (1992). Protein oxidation and aging. *Science*, 257:1220–1224.
- Stahl, W., & Sies, H. (2005). Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1740: 101-107.
- Sueoka et al., (2001). A new function of green tea: prevention of lifestyle-related diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 928 : 274–280.
- Sundaramahalingam et al., (2006) Effects of chronic noise stress on spatial memory of rats in relation to neuronal dendritic alteration and free radical-imbalance in hippocampus and medial prefrontal cortex. *Neuroscience Letters*, 399 :17-22.

Wang, X, & Quinn, P (1999). "Vitamin E and its function in membranes". *Prog Lipid Res* 38 (4): 309 – 36.

Zang & Omaye, (2001). DNA strand breaking and oxygen tension: effects of  $\beta$ -carotene,  $\alpha$ -tocopherol and ascorbic acid. *Food and Chemical Toxicology*, 39 : 239–246.

ธรรารัตน์ และรัตนา (2007) การหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในเครื่องดื่มชนิดพร้อมชงและเครื่องดื่มสำเร็จรูป รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ลัดดา กาญจนเสริม โภคิน และคณะ (2006) การหาปริมาณพอลิฟีนอลทั้งหมดในผลิตภัณฑ์ชาใบของเชียงรายชนิดด้วยวิธีสเปกโทรโฟโตเมตรี 32th Congress on Science and Technology of Thailand.

โอภา วัชรกุลต์ และคณะ (2549) สารต้านอนุมูลอิสระ Radical Scavenging Agents. กรุงเทพฯ ฯ : พี.เอส.พรีนซ์

พนม วิญญาของ [http://www.mfu.ac.th/division/tea/know/article\\_tea.doc](http://www.mfu.ac.th/division/tea/know/article_tea.doc)

[www.bio.davidson.edu/.../Keogh/pBluescript.gif](http://www.bio.davidson.edu/.../Keogh/pBluescript.gif)

## ภาคผนวก

## 1. สถิติที่ใช้ในการวิจัย

1. ค่าเฉลี่ย (Mean ;  $\bar{X}$ ) คำนวณได้จากสูตร

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^N X_i}{N}$$

เมื่อ  $X_i$  คือ ค่าที่ได้จากการทดลองในแต่ละครั้ง

$N$  คือ จำนวนครั้งที่ทำการทดลอง

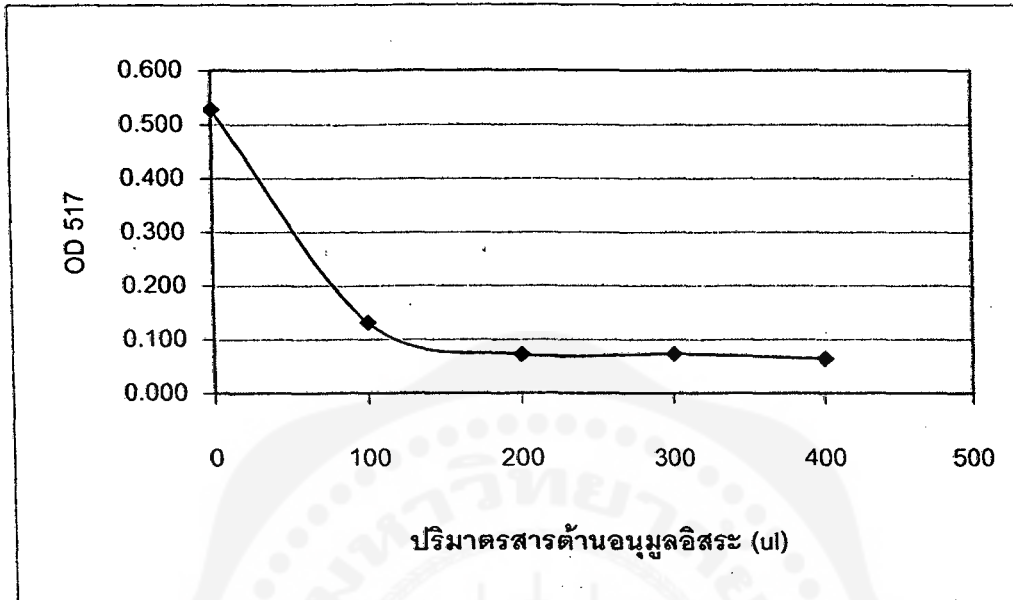
2. ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation ; SD) คำนวณได้จากสูตร

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{N - 1}}$$

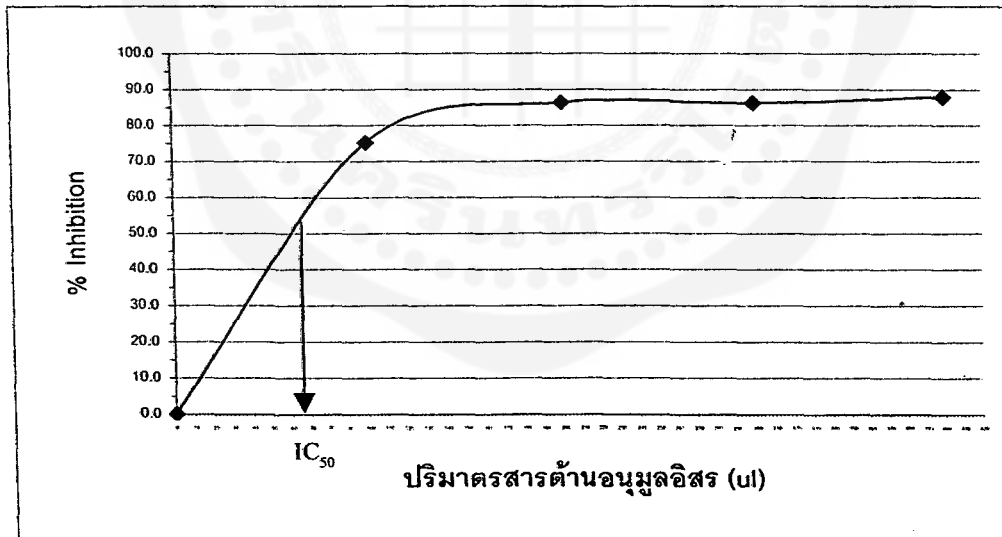
3. ใช้ Independent t-test ในการเปรียบเทียบความแตกต่างของชุดข้อมูล

## 2. ภาพประกอบการวิเคราะห์หาค่า $IC_{50}$ ในสารสกัดใบชา

ภาพประกอบที่ 1. กราฟแสดงการลดลงของ DPPH radical โดยสารต้านอนุมูลอิสระทั่วไป

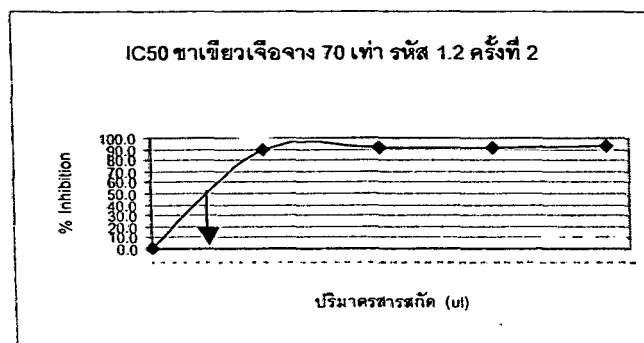
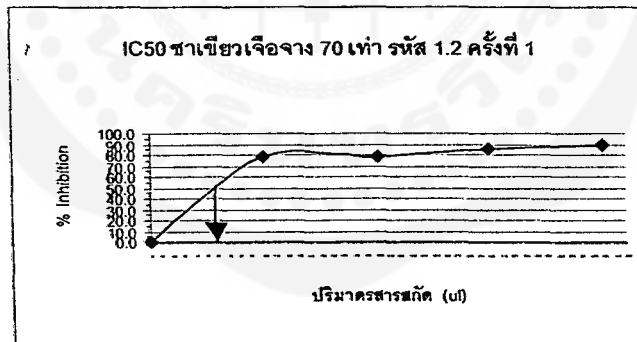
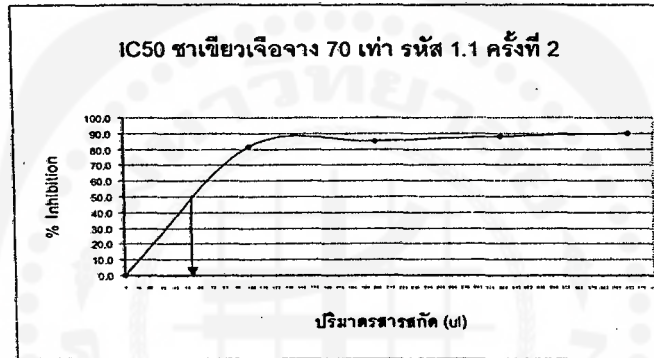
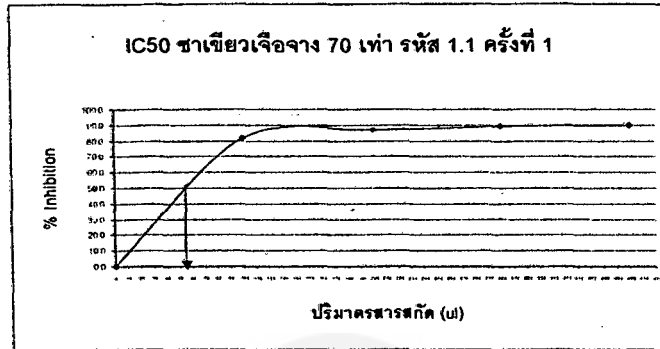


ภาพประกอบที่ 2. กราฟแสดงการหาค่า  $IC_{50}$  ของสารต้านอนุมูลอิสระทั่วไป

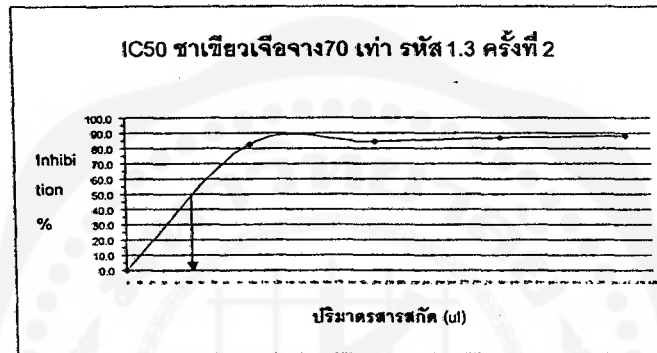
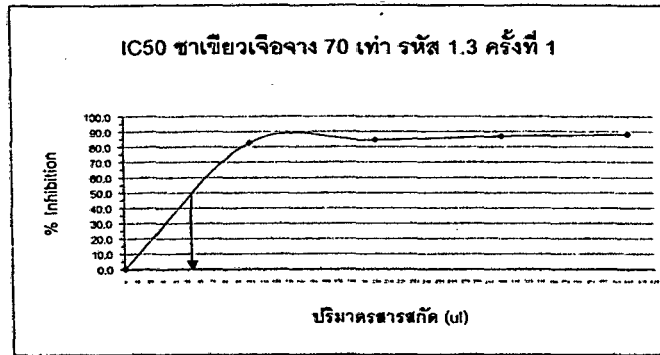
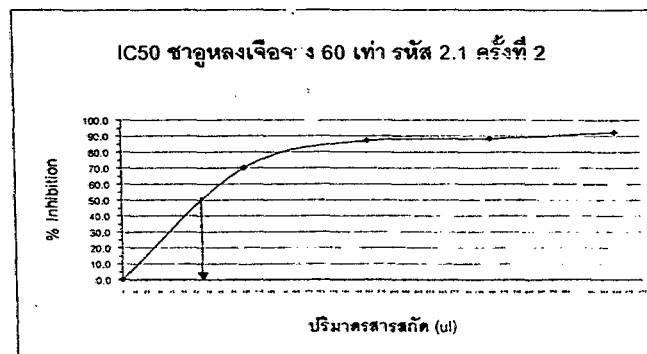
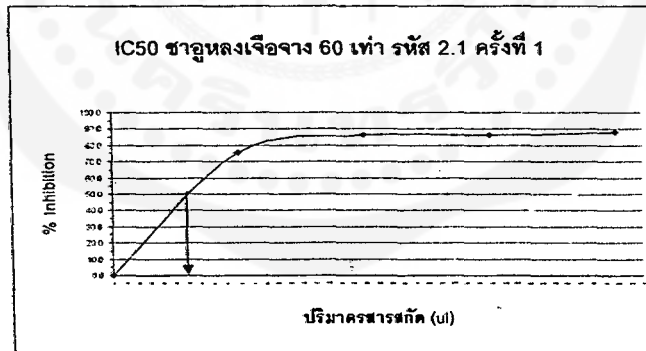


3. การวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบชา โดยการหาค่า  $IC_{50}$  ของการยับยั้ง DPPH radical

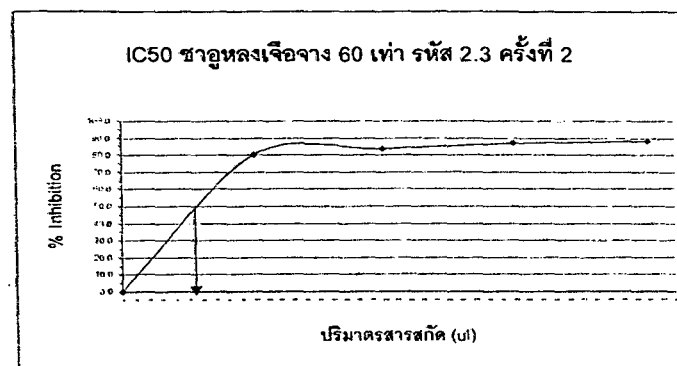
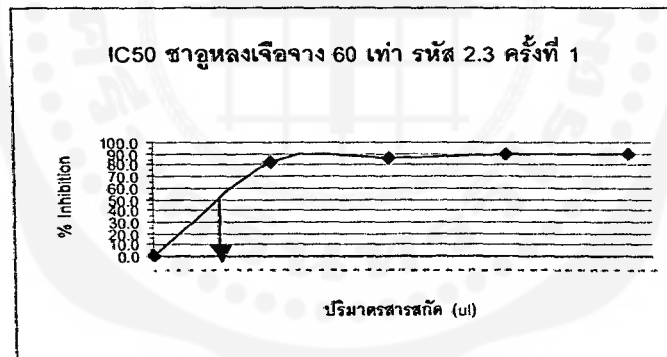
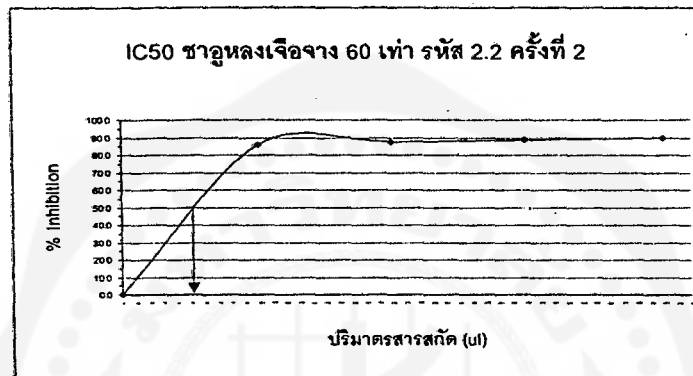
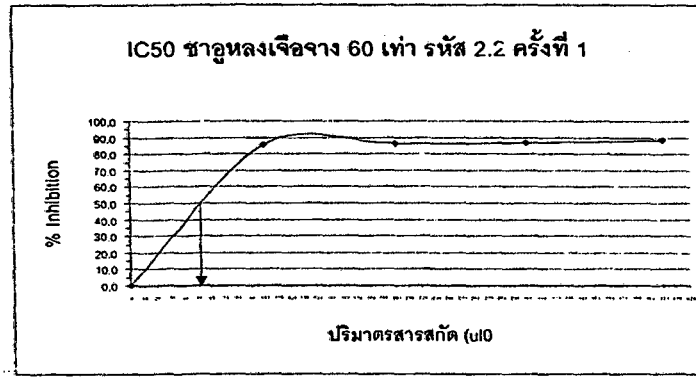
ภาพประกอบที่ 3 ก. การหาค่า  $IC_{50}$  ของสารสกัดชาเขียว



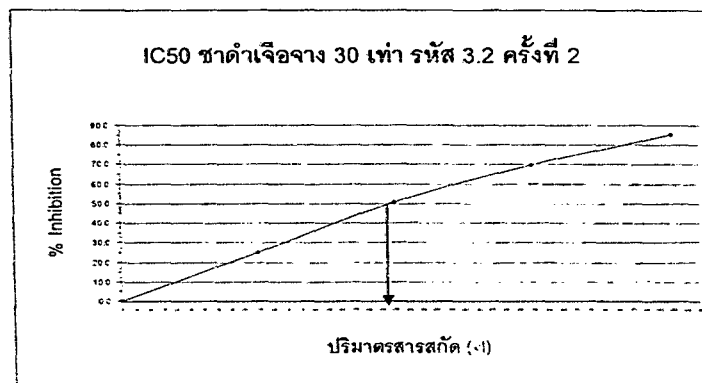
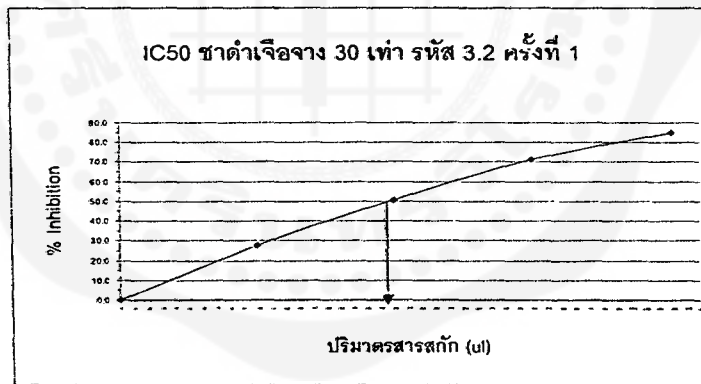
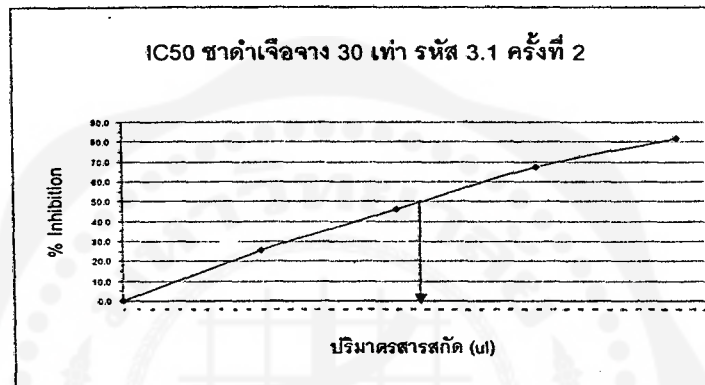
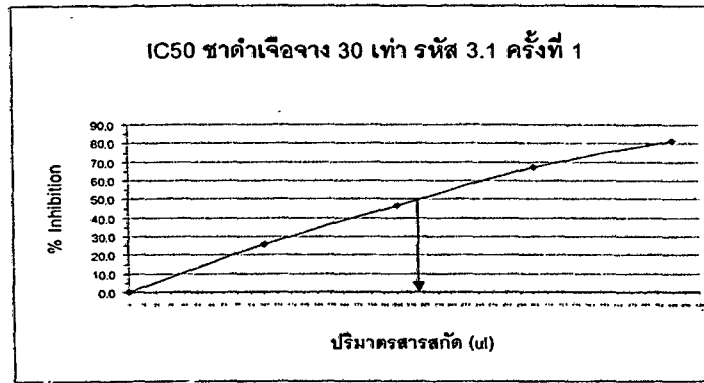
## ภาพประกอบที่ 3 ก. (ต่อ)

ภาพประกอบที่ 3 ข. การหาค่า IC<sub>50</sub> ของสารสกัดชาอูหลง

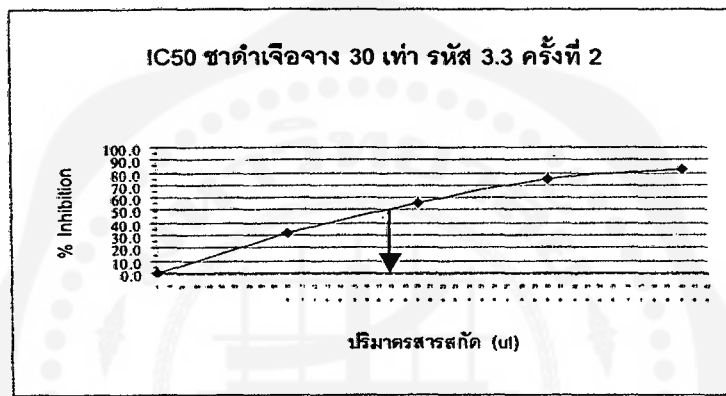
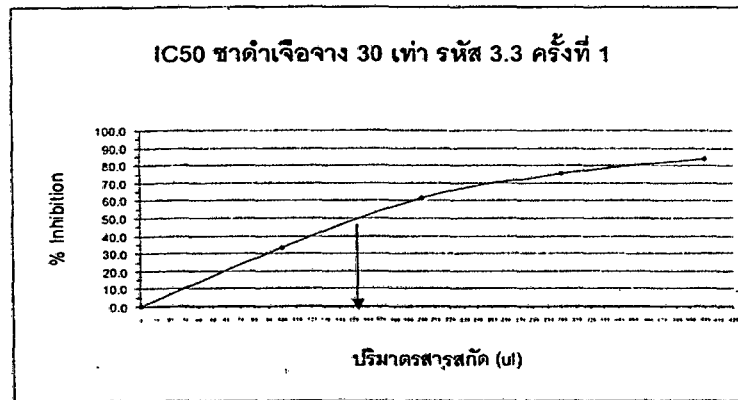
## ภาพประกอบที่ 3



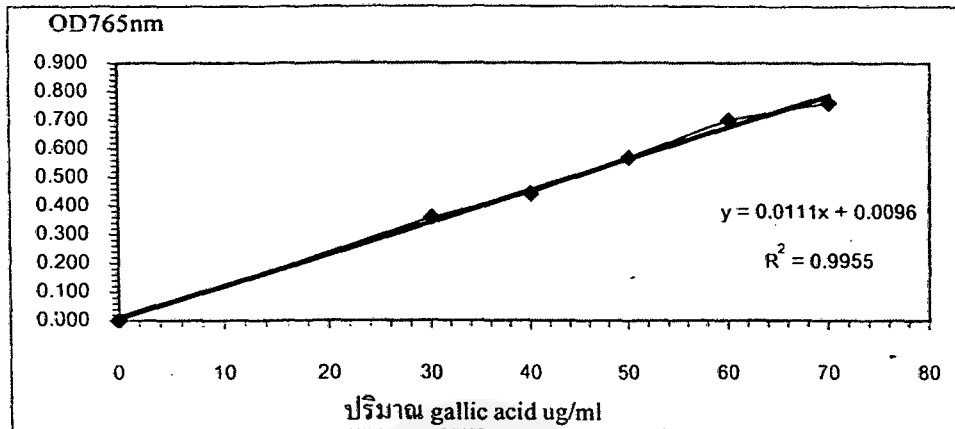
ภาพประกอบที่ 3 8. การหาค่า  $IC_{50}$  ของสารสกัดชาดำ



ภาพประกอบที่ 3 ค. (ต่อ)

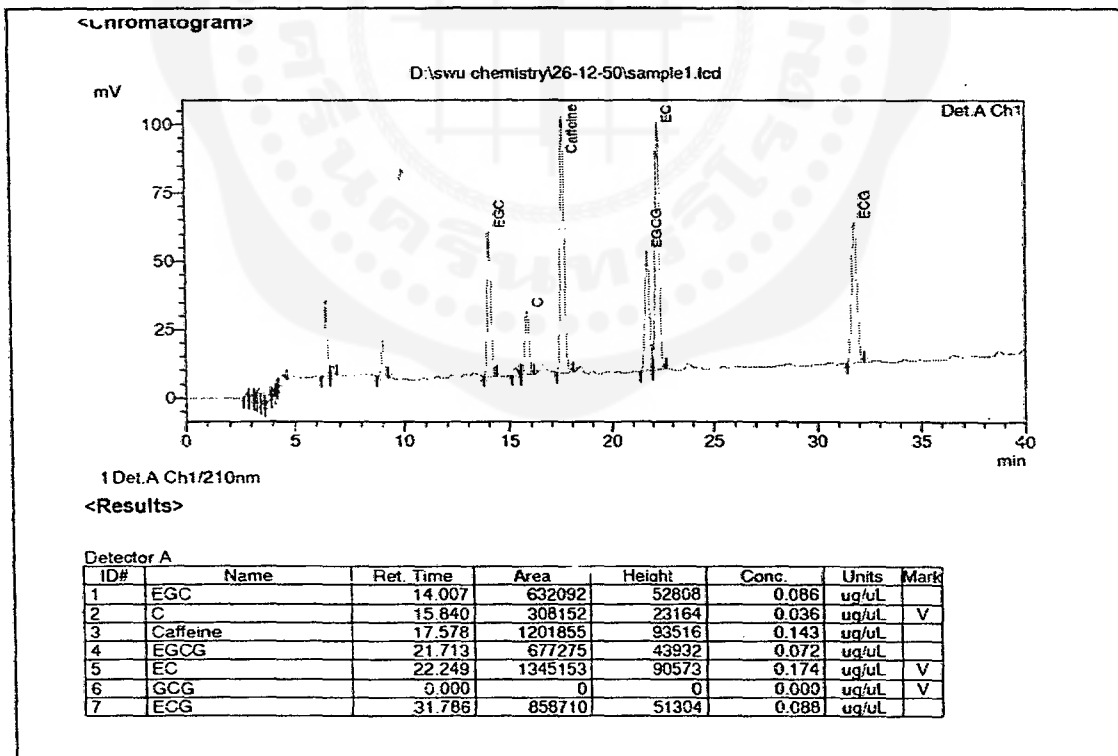


ภาพประกอบการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเป็น mgGAE ในสารสกัดใบชา  
ภาพประกอบที่ 4 กราฟมาตรฐานของ gallic acid

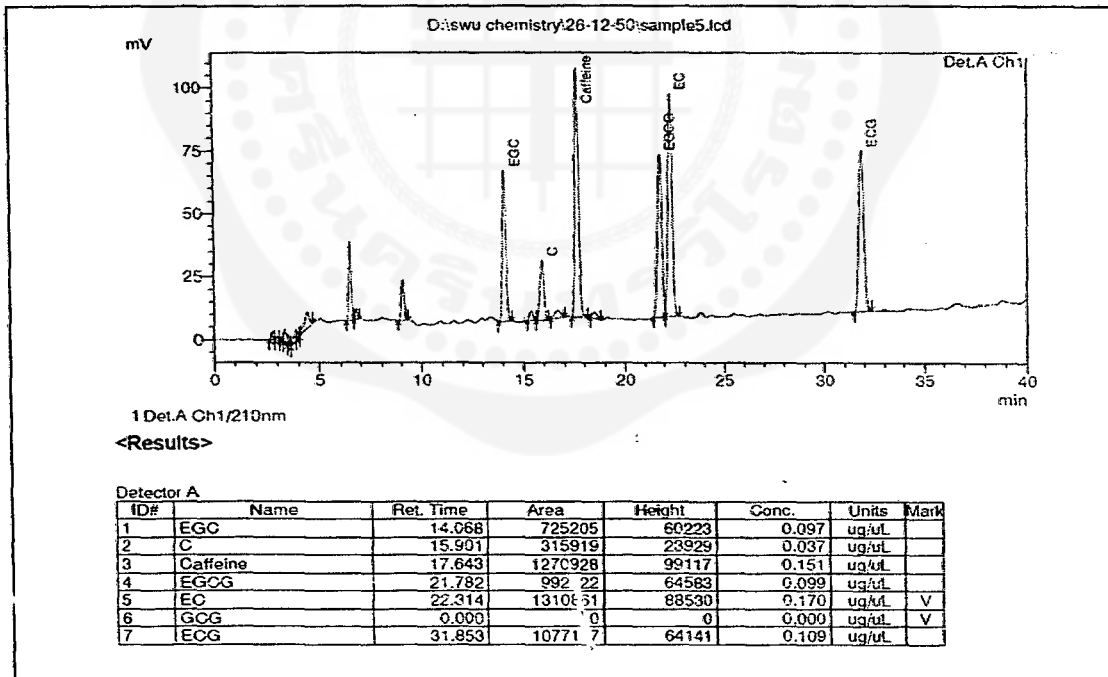
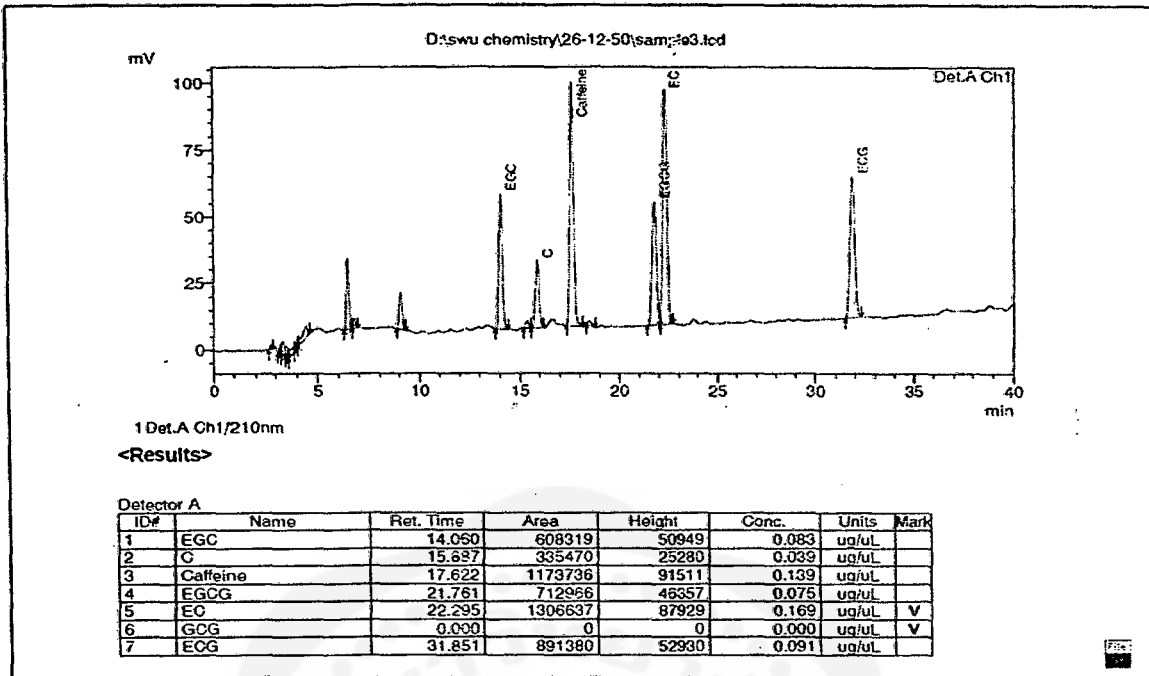


การวิเคราะห์ปริมาณคาเทชินในสารสกัดใบชาโดยวิธี HPLC

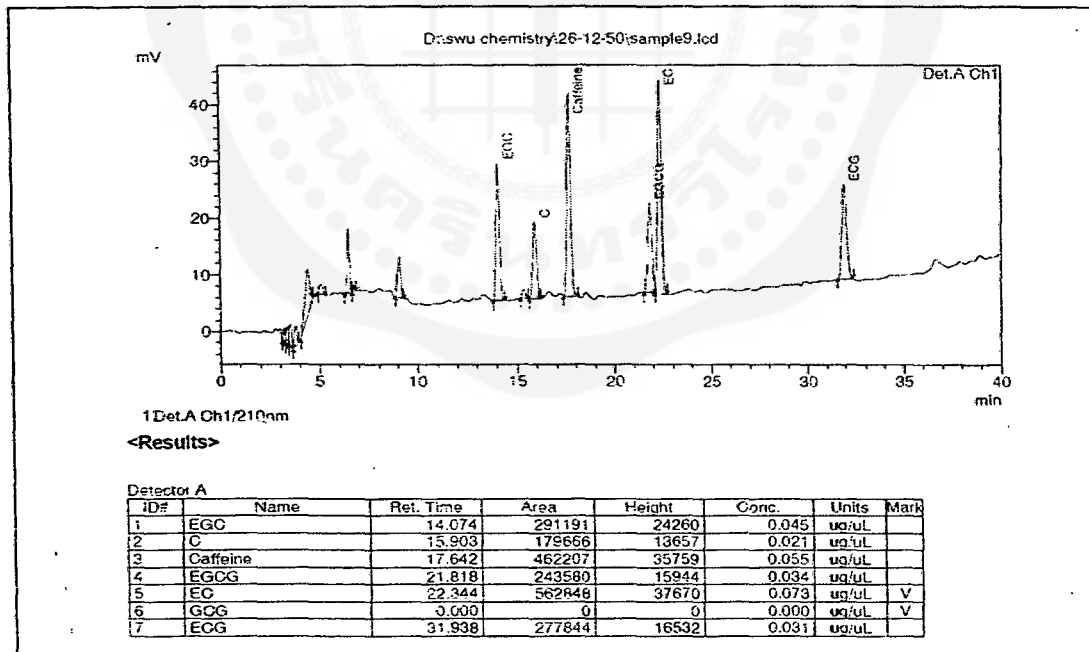
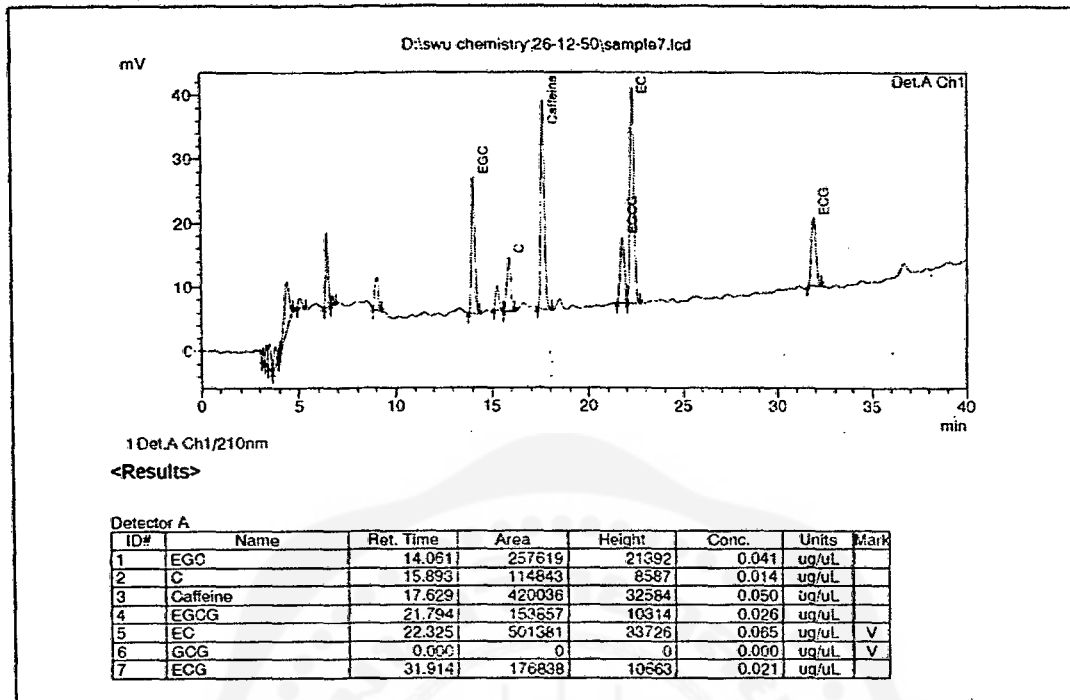
ภาพประกอบที่ 5 ก. การวิเคราะห์ปริมาณคาเทชินในสารสกัดชาเขียว



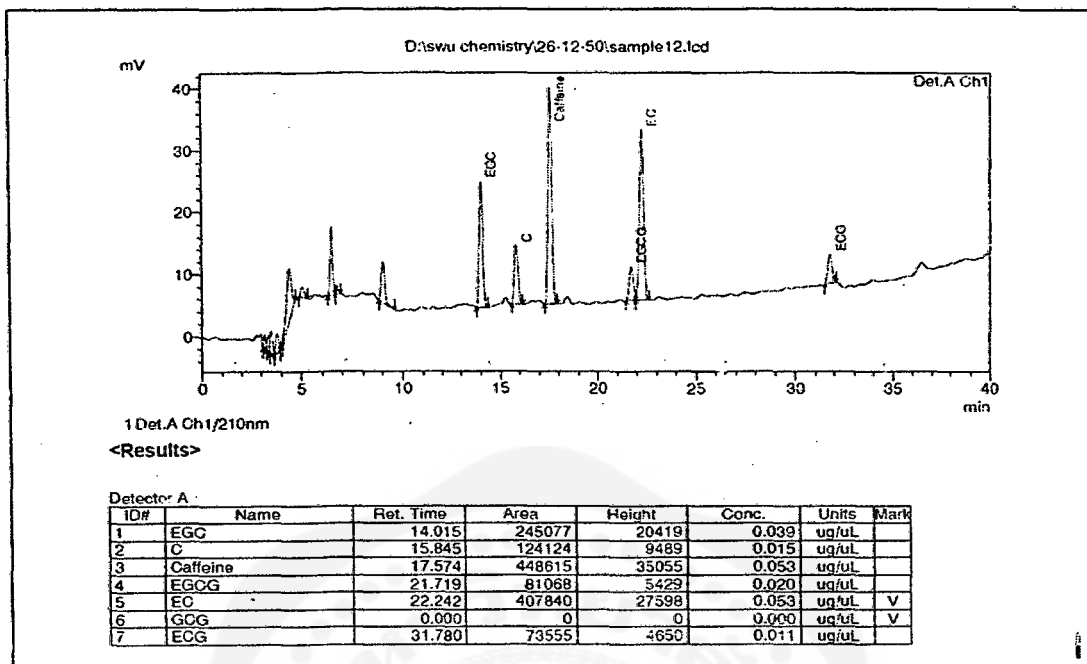
## ภาพประกอบที่ 5 ก. (ต่อ)



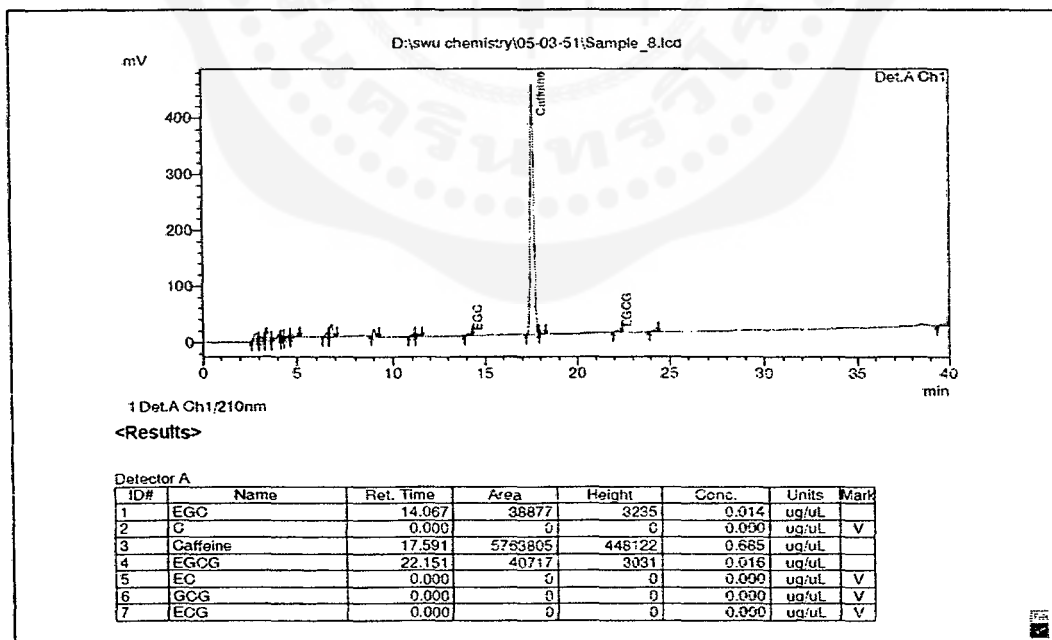
ภาพประกอบที่ 5 ข. การวิเคราะห์ปริมาณคาเฟอีนในสารสกัดชาอูหลง



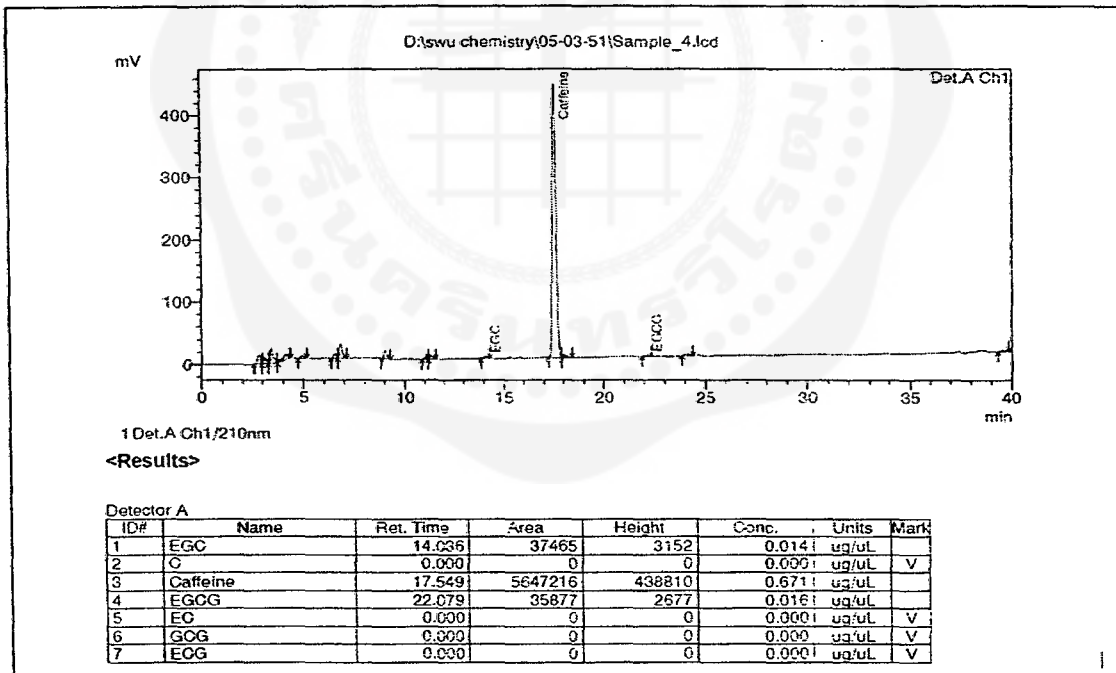
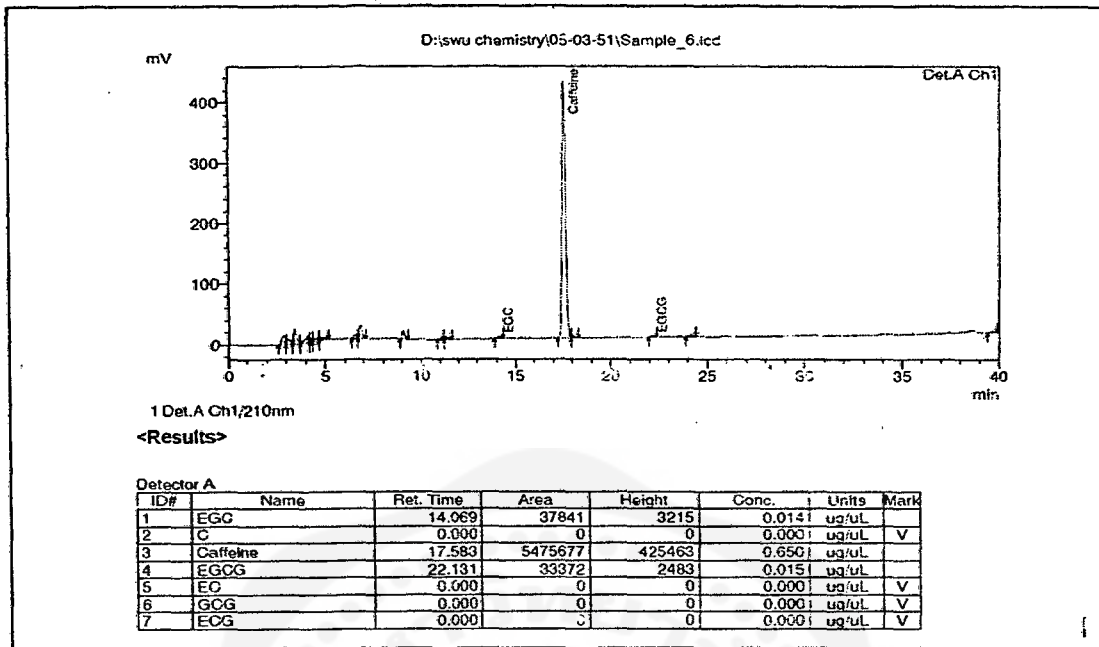
## ภาพประกอบที่ 5 ข. (ต่อ)



## ภาพประกอบที่ 5 ค. การวิเคราะห์ปริมาณคาเฟอีนในสารสกัดชาดำ

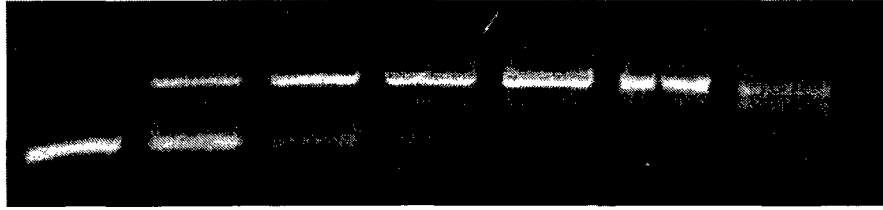


## ภาพประกอบที่ 5 ค. (ต่อ)



ภาพประกอบ รูปแบบ agarose gel electrophoresis ของ pBluescript ในกรณีต่างๆ

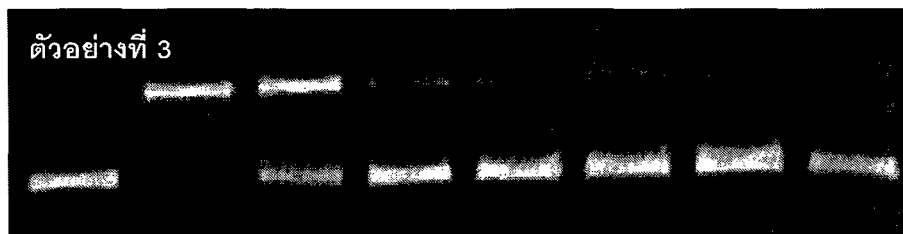
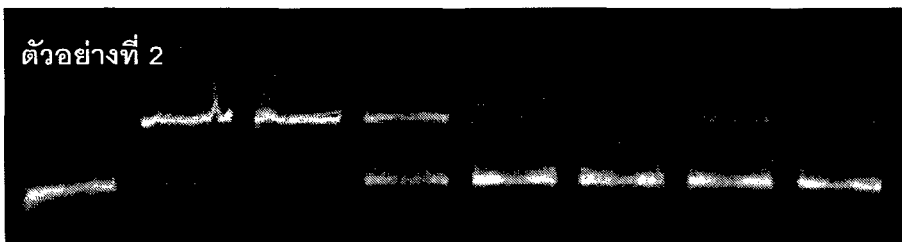
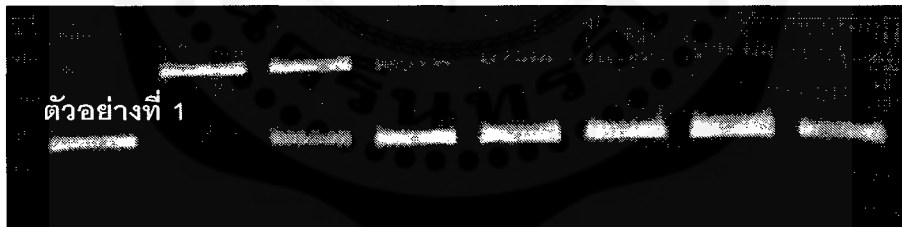
ภาพประกอบที่ 6 ก. รูปแบบ electrophoresis เมื่อ pBluescript ทำปฏิกิริยากับ AAPH



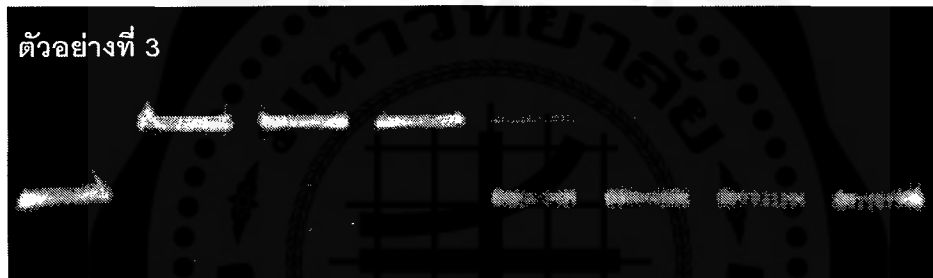
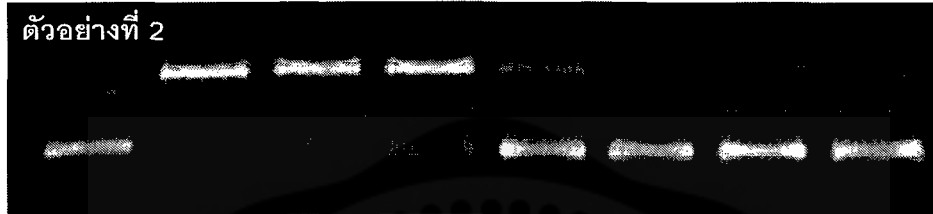
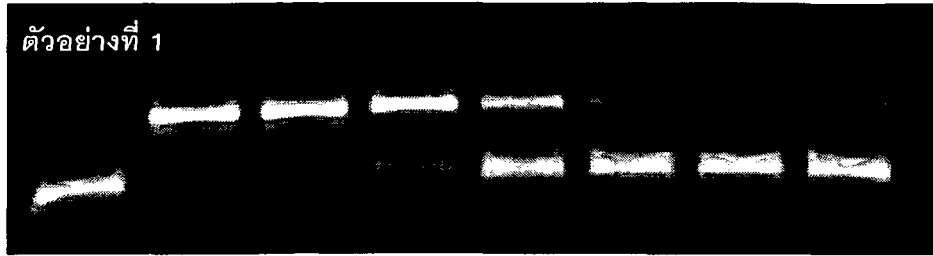
ภาพประกอบที่ 6 ข. รูปแบบ electrophoresis เมื่อ pBluescript ผสมกับ trolox และทำปฏิกิริยากับ AAPH



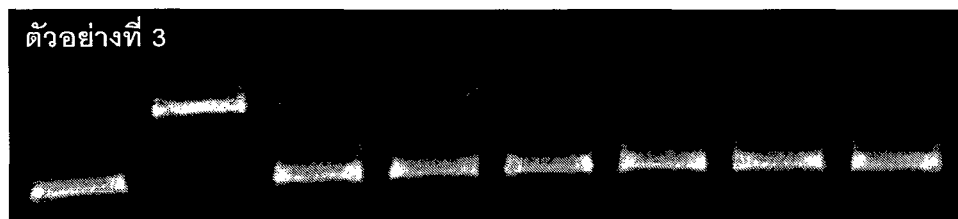
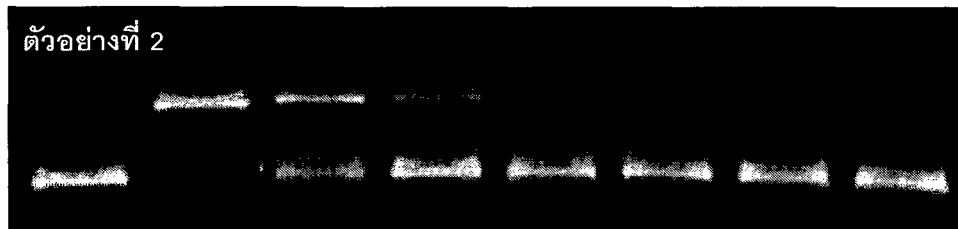
ภาพประกอบที่ 6 ค. รูปแบบ electrophoresis เมื่อ pBluescript ผสมกับสารสกัดชาเขียว และทำปฏิกิริยากับ AAPH



ภาพประกอบที่ 6 ง. รูปแบบ electrophoresis เมื่อ pBluescript ผสมกับสารสกัดชาอูหลงและ  
ทำปฏิกิริยากับ AAPH

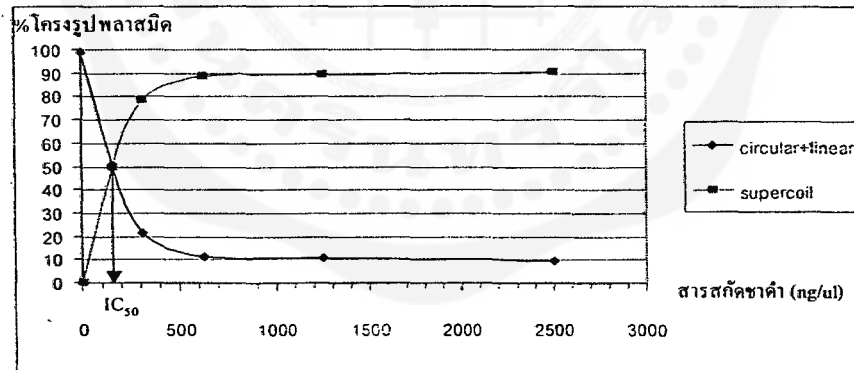
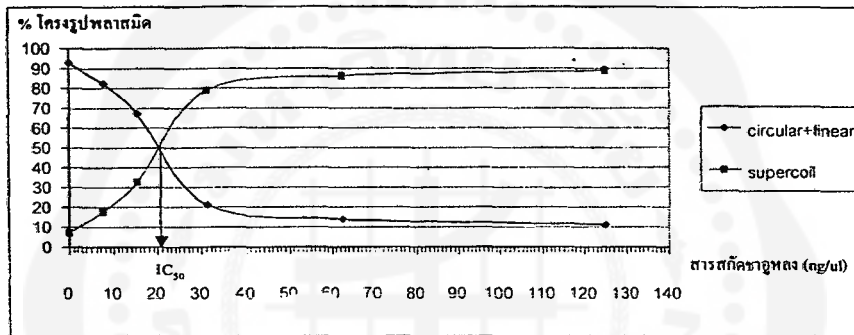
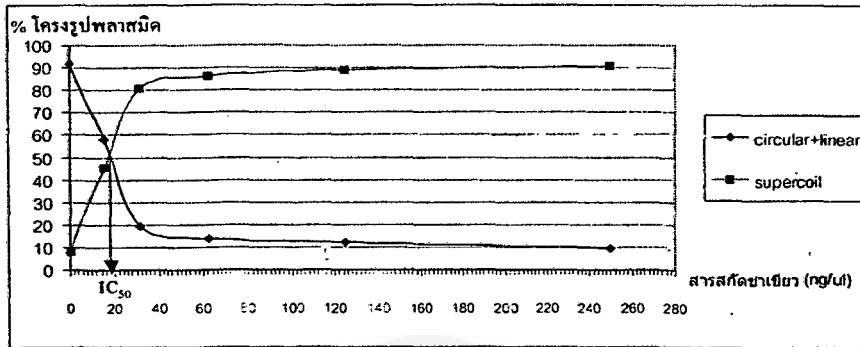


ภาพประกอบที่ 6 จ. รูปแบบ electrophoresis เมื่อ pBluescript ผสมกับสารสกัดชาดำและ  
ทำปฏิกิริยากับ AAPH



การหาค่า  $IC_{50}$  ของสารสกัดใบชาต่อการป้องกันการเสียหายของ pBluescript จาก AAPH

ภาพประกอบที่ 7 การหาค่า  $IC_{50}$  ของสารสกัดชาเขียว ชาอูหลง และ ชาดำ



ข้อมูลปริมาณโครงสร้างต่างๆ ของพลาสมิดเป็น raw volume วิเคราะห์จาก software Genetool  
 ตารางที่ 1 ก. เมื่อ pBluescript ทำปฏิกิริยากับ AAPH

Track	AAPH	Form	Raw volume	%
1	0 (ควบคุม)	circular	90985.7	6.7
		linear	33209.5	2.4
		supercoil	1244539.3	90.9
		รวม 3 รูปร่าง	1368734.4	100.0
2	2.5mM	circular	690715.9	35.6
		linear	85426.3	4.4
		supercoil	1163814.1	60.0
		รวม 3 รูปร่าง	1939956.4	100.0
3	5 mM	circular	1137413.1	62.2
		linear	94057.1	5.1
		supercoil	596781.4	32.6
		รวม 3 รูปร่าง	1828251.6	100.0
4	10 mM	circular	1682186.6	80.3
		linear	139506.5	6.7
		supercoil	273645.4	13.1
		รวม 3 รูปร่าง	2095338.5	100.0
5	20 mM	circular	2332630.5	98.4
		linear	36799.6	1.6
		รวม 3 รูปร่าง	2369430.1	100.0
6	40 mM	circular	1739313.4	98.6
		linear	25275.5	1.4
		รวม 3 รูปร่าง	1764588.8	100.0
7	80 mM	รวม circular และ linear	1618791	100

ตารางที่ 1 ข. เมื่อ pBluescript ผสมกับ trolox แล้วทำปฏิกิริยากับ AAPH

Track	Trolox	Form	Raw volume	%
1	ควบคุม	circular	187124.4063	4.8
		linear	108828.2656	2.8
		supercoil	3623415	92.4
		รวม	3919367.672	100.0
2	0 mM	circular	4086721.5	82.3
		linear	688450.0625	13.9
		supercoil	190838.4375	3.8
		รวม	4966010	100.0
3	2.5 mM	circular	4194841	82.4
		linear	702052.375	13.8
		supercoil	195545.8594	3.8
		รวม	5092439.234	100.0
4	5 mM	circular	3293978.75	83.5
		linear	563928.3125	14.3
		supercoil	86894.96094	2.2
		รวม	3944802.023	100.0
5	10 mM	circular	4078744.75	87.3
		linear	428345.625	9.2
		supercoil	164107.1719	3.5
		รวม	4671197.547	100.0
6	20 mM	circular	2296240.5	72.2
		linear	210332.125	6.6
		supercoil	675392.125	21.2
		รวม	3181964.75	100.0
7	40 mM	circular	623009.8125	14.2
		linear	142949.1563	3.3
		supercoil	3607213	82.5
		รวม	4373171.969	100.0
8	80 mM	circular	1648224.6304	3.7
		linear	9456.5621	0.2
		supercoil	3864651	96.1
		รวม	4022332.193	100

ตารางที่ 1 ค. เมื่อ pBluescript ผสมกับสารสกัดขาเขี้ยว แล้วทำปฏิกิริยากับ AAPH

Track	สารสกัดขาเขี้ยว	โครงสร้าง	Raw volume	%
1	ควบคุม	circular	77986.83	4.1
		linear	33595.87	1.8
		supercoil	1778941	94.1
		รวม	1890524	100.0
2	0	circular	2261507	84.3
		linear	202955.9	7.6
		supercoil	218721	8.2
		รวม	2261507	84.3
3	7.8 ng/μl	circular	2040343	54.9
		linear	123779.9	3.3
		supercoil	1553870	41.8
		รวม	3717993	100.0
4	15.6 ng/μl	circular	472919.3	16.9
		linear	67727.8	2.4
		supercoil	2261445	80.7
		รวม	2802092	100.0
5	31.2 ng/μl	circular	375019.5	12.3
		linear	39391.9	1.3
		supercoil	2629731	86.4
		รวม	375019.5	12.3
6	62.5 ng/μl	circular	386731.5	10.8
		linear	68509.16	1.1
		supercoil	2504158	89.1
		รวม	2959399	100.0
7	125 ng/μl	circular	259049.5	8.6
		linear	31915.96	1.1
		supercoil	2724310	90.4
		รวม	3015275	100.0
8	250 ng/μl	circular	134597.8	7.0
		linear	26904.46	1.4
		supercoil	1766854	91.6
		รวม	1928356	100.0

ตารางที่ 1 ง. เมื่อ pBluescript ผสมกับสารสกัดชาอูหลง แล้วทำปฏิกิริยากับ AAPH

Track	สารสกัดชาอูหลง	โครงสร้าง	Raw volume	%
1	ควบคุม	circular	53883.66	3.8
		linear	58832.95	4.1
		supercoil	1307224	92.1
		รวม	53883.66	3.8
2	0	circular	2182114	92.7
		supercoil	170685.3	7.3
		รวม	2352799	100.0
3	7.8 ng/μl	circular	2276490	82.0
		supercoil	498719	18.0
		รวม	2775209	100.0
4	15.6 ng/μl	circular	1798216	67.4
		supercoil	870203.8	32.6
		รวม	2668419	100.0
5	31.2 ng/μl	circular	482985.7	21.2
		supercoil	1796623	78.8
		รวม	2279609	100.0
6	62.5 ng/μl	circular	242852	12.3
		linear	31052.69	1.6
		supercoil	1704824	86.2
		รวม	1978728	100.0
7	125 ng/μl	circular	215032.7	9.6
		linear	39690.25	1.8
		supercoil	1992546	88.7
		รวม	2247269	100.0
8	250 ng/μl	circular	210827.4	9.8
		linear	29174.2	1.4
		supercoil	1920314	88.9
		รวม	2160316	100.0

ตารางที่ 1 จ. เมื่อ pBluescript ผสมกับสารสกัดชาดำแล้วทำปฏิกิริยากับ AAPH

Track	สารสกัดชาดำ	โครงสร้าง	Raw volume	%
1	ควบคุม	circular	87768.13	3.5
		linear	48777.25	1.9
		supercoil	2377798	94.6
		รวม	2514343	100.0
2	0	circular	2023720	91.8
		linear	180165.8	8.2
		รวม	2203886	100.0
3	78 ng/μl	circular	937452	39.2
		linear	49944.23	2.1
		supercoil	1405427	58.7
		รวม	2392823	100.0
4	156 ng/μl	circular	443413.7	15.8
		supercoil	2368185	84.2
		รวม	2811599	100.0
5	312 ng/μl	circular	199089.7	9.3
		supercoil	1950942	90.7
		รวม	2150031	100.0
6	625 ng/μl	circular	193622	8.9
		linear	36603.1	1.7
		supercoil	1949704	89.4
		รวม	2179929	100.0
7	1,250 ng/μl	circular	229794.8	9.8
		linear	37479.64	1.6
		supercoil	2077048	88.6
		รวม	2344322	100.0
8	2,500 ng/μl	circular	190283.6	7.8
		linear	43281.86	1.8
		supercoil	2194811	90.4
		รวม	2428376	100.0

การคำนวณเป็นร้อยละของโครงสร้างพลาสมิดที่ถูกทำลาย (circular + linear) และไม่ถูกทำลายสภาพธรรมชาติ (supercoil)

ตารางที่ 2 ก. เมื่อ pBluescript ทำปฏิกิริยากับ AAPH

	Control		AAPH (mM)				
	0	2.5	5	10	20	40	80
circular+ linear	9.1	40.0	67.4	86.9	100.0	100.0	100.0
supercoil	90.9	60.0	32.6	13.1	0.0	0.0	0.0

ตารางที่ 2 ข. เมื่อ pBluescript ผสมกับ trolox แล้วทำปฏิกิริยากับ AAPH

	Control	Trolox (mM)						
		0	2.5	5	10	20	40	80
circular+ linear	9.1	3.8	63.8	97.8	96.5	78.8	17.5	3.9
supercoil	90.9	96.2	96.2	2.2	3.5	21.2	82.5	96.1

ตารางที่ 2 ค. เมื่อ pBluescript ผสมกับสารสกัดชาเขียว แล้วทำปฏิกิริยากับ AAPH

	Control	สารสกัดชาเขียว (ng/ul)						
		0	7.8	15.6	31.2	62.5	125	250
circular+ linear	9.1	91.8	58.2	19.3	13.6	11.9	9.6	8.4
supercoil	90.9	8.2	45.1	80.7	86.4	89.1	90.4	91.6

ตารางที่ 2 ง. เมื่อ pBluescript ผสมกับสารสกัดชาอูหลง แล้วทำปฏิกิริยากับ AAPH

	Control	สารสกัดชาอูหลง (ng/ul)						
		0	7.8	15.6	31.2	62.5	125	250
circular+ linear	7.9	92.7	82.0	67.4	21.2	13.9	11.4	11.2
supercoil	92.1	7.3	18.0	32.6	78.8	86.2	88.7	88.9

ตารางที่ 2 จ. เมื่อ pBluescript ผสมกับสารสกัดชาดำ แล้วทำปฏิกิริยากับ AAPH

	Control	สารสกัดชาดำ (ng/ul)						
		0	78	156	312	625	1,250	2,500
circular+ linear	5.4	91.8	41.3	15.8	9.3	10.6	10.4	9.6
supercoil	94.6	8.2	58.7	84.2	90.7	89.4	88.6	90.4

## อภิธานศัพท์

สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) หมายถึง สารต้านอนุมูลอิสระ หรือสารที่สามารถเข้าจับกับอนุมูลอิสระ แล้วยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลเป้าหมาย ได้แก่ โปรตีน ไขมัน และ DNA

$IC_{50}$  ของการยับยั้งอนุมูลอิสระ หมายถึงปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ร้อยละ 50

$IC_{50}$  ของการป้องกันการเสียหายของดีเอ็นเอ หมายถึงปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถป้องกันการเสียหายของดีเอ็นเอจากอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50



## ประวัติย่อผู้วิจัย

### 1. หัวหน้าโครงการวิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นางรัตนา สัมพันธ์ชิต  
ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mrs. Ratana Sampantachit
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน -
3. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์
4. หน่วยงานที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail  
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

โทรศัพท์ ที่ทำงาน 02-664-1000 ต่อ 8211

ที่บ้าน 02-910-0476

มือถือ 089-679-6941

โทรสาร 02-259-2097

e-mail : [ratanasu@swu.ac.th](mailto:ratanasu@swu.ac.th)

### 3. ประวัติการศึกษา

1. ปริญญาตรี : วท.บ. (ชีวเคมี) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2516
2. ปริญญาโท : วท.ม. (ชีวเคมี) มหาวิทยาลัยมหิดล ปีการศึกษา 2520
4. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
5. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดย  
ระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย  
หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย
  - 7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ชื่อแผนงานวิจัย
  - 7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย
  - 7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุน (อาจ  
มากกว่า 1 เรื่อง)

1. Sengpracha P., Supasiri T., Tundulawessa Y. and Sampantachit R. (2004) Study of the antioxidant property of Malabar spinach. Program and abstract of 17<sup>th</sup> FAOBMB Symposium/2<sup>nd</sup> IUBMB Special Meeting/7<sup>th</sup> A-IMBN Conference, 180

2. Sampantachit R. and Supasiri T. (2006) Study of the anti-oxidant property of four Thai plants. Abstract of 32<sup>th</sup> Congress on Science and Technology of Thailand. p. 133