

## การศึกษาคุณสมบัติในการยับยั้งเอนไซม์ไซโคลออกซีจีเนส-2 ของสารสำคัญโพลีฟีนอลในสารสกัดชาเขียวตามแต่ละพื้นที่ในประเทศไทย

กานต์สิริ โตโพธิ์ไทย\* น.บ., จามพักตร์ ทายะนา\*\* จก.บ., จก.ม.,  
 สายสุรีย์ ประทีปทองคำ\*\*\* จก.บ., จก.ม., Dr. rer. nat., นงนภัส ดวงดี\*\* จก.บ., จก.ม., Dr. rer. nat.,  
 เอกธระ ประทีปทองคำ\* น.บ., จ.ก., Dr. med. dent.

\*สถาบันทันตกรรม กรมการแพทย์ ตำบลตลาดขวัญ อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี 11000

\*\*ศูนย์วิจัยค้นคว้าและพัฒนายา สำนักงานวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีชั้นสูง มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ (ศูนย์รังสิต) ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

\*\*\*คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สาขาเคมี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ (ศูนย์รังสิต) ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

### Abstract: Cyclooxygenase-2-inhibiting activity of polyphenols in extracts of tea from various geographic locations in Thailand

Kansiri Topothai\*, D.D.S., Nyampak Tayana\*\*, M.Sc.,  
 Saisuree Prateeptongkum\*\*\*, Dr.rer.Nat., Nongnaphat Duangdee\*\*, Dr.rer.nat.,  
 Esthera Prateeptongkum\*, D.D.S., Dip, Dr.med.dent,

\*Institute of Dentistry, Department of Medical Services, Talad Khwan, Mueang, Nonthaburi 11000

\*\*Drug Discovery and Development Center, Office of Advance Science and Technology, Thammasat University, Pathumthani 12120

\*\*\*Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Thammasat University, Pathumthani, 12120, Thailand

(E-mail: salasuang@gmail.com)

(Received: September 8, 2021; Revised: October 29, 2021; Accepted: February 21, 2022)

**Background:** Polyphenols are essential compounds for anti-inflammation commonly found in green tea (*Camellia sinensis*). They influence the inflammatory process by controlling and inhibiting pro-inflammatory cytokines such as cyclooxygenase-2 (COX-2) which is a prominent substance in dental diseases namely periodontal inflammation and oral cancer. However, their quantitative levels of polyphenols depend on geographical locations. **Objectives:** The aim of this research is to determine the polyphenol levels, important compounds for Cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibition, of green tea extracted from various geographical locations in Thailand. **Method:** 70% Ethanol extraction samplings of green tea products were done in groups representing each province in Thailand. The chemotype levels of polyphenols was determined by total polyphenols (Folin-Ciocalteu method) and total flavonoid. Catechin-specific epigallocatechin gallate (EGCG) level was then measured by high-performance liquid chromatography (HPLC). **Result:** Total polyphenols, total flavonoids, and EGCG content in green tea from each province in Thailand are significantly different ( $p < 0.05$ ). The highest amount of polyphenols and flavonoids is Chiang Rai tea. The highest amount of EGCG is Chiang Mai tea. Anti-inflammatory test results resembled as  $IC_{50}$  are ranked in descending order from Chiang Rai, Assam, Narathiwat and Chiang Mai green tea which corresponding to the amount of important substances in green tea, but there is no statistically significant difference ( $p < 0.05$ ). **Conclusion:** Chemotype levels of polyphenols in green tea vary in different cultivation areas ranked in descending order from Chiang Rai province (Assam tea), Narathiwat

province and Chiang Mai Province. The chemotype levels of polyphenols exhibiting preliminary anti-inflammatory properties correlate directly to the concentration of tea. Accordingly, it is shown that green tea grown in Thailand statistically significantly exhibits anti-inflammatory properties.

**Keywords:** Green tea, *Camellia sinensis*, inflammation, polyphenols, cyclooxygenase-2 (COX-2)

## บทคัดย่อ

**ภูมิหลัง:** สารสำคัญ polyphenols เป็นสารสำคัญที่พบได้ในชาเขียว ซึ่งมีผลในการต้านการอักเสบโดยการลดสารตั้งต้นการอักเสบของร่างกาย เช่น เอนไซม์ cyclooxygenase-2 (COX-2) ซึ่งทำให้เกิดการอักเสบ และพบได้ในโรคที่เกี่ยวข้องกับช่องปาก เช่น โรคปริทันต์ และ โรคมะเร็งช่องปาก โดยสภาพภูมิอากาศที่หลากหลายและแตกต่างกัน ส่งผลให้สารสำคัญโพลีฟีนอลและแร่ธาตุแตกต่างกัน **วัตถุประสงค์:** เพื่อศึกษาปริมาณสารสำคัญ polyphenols ในสารสกัดชาเขียวตามแต่ละพื้นที่ในประเทศไทยและ เปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ cyclooxygenase-2 (COX-2) ของสารสำคัญ polyphenols ในสารสกัดชาเขียวตามแต่ละพื้นที่ในประเทศไทย **วิธีการ:** ทำการสุ่มตัวอย่างผลิตภัณฑ์ชาเขียวเพื่อเป็นตัวแทนแต่ละจังหวัดในประเทศไทย สกัดด้วยตัวทำละลาย 70% ethanol นำมาวิเคราะห์หาปริมาณ สารสำคัญ polyphenols ได้แก่ total phenolic compounds, total flavonoid compounds และหาปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญคาเทชินในรูปของสารอีพิกัลโลคาเทชินกัลเลต (epigallocatechin gallate; EGCG) ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวแบบสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography; HPLC) เปรียบเทียบฤทธิ์ต้านการอักเสบเบื้องต้นของการยับยั้งเอนไซม์ COX-2 ด้วย Cayman COX-2 (human) Inhibitor Screening Assay Kit **ผล:** จากการศึกษาพบว่าชาเขียวจากแต่ละพื้นที่ในประเทศไทยมีปริมาณสารสำคัญที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) โดยพบ ชาเขียวจังหวัดเชียงราย พันธุ์อัสสัม มีปริมาณสารโพลีฟีนอลและฟลาโวนอยด์สูงที่สุด ปริมาณสารโพลีฟีนอลรองลงมาคือ ชาเขียวจังหวัดนราธิวาส พันธุ์อัสสัม, ปริมาณ EGCG พบว่า ชาเขียวจังหวัดเชียงใหม่ พันธุ์จิน พบปริมาณ EGCG สูงสุด โดยพบว่ามีค่าแตกต่างกันไปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ค่าการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ COX-2 หรือ Inhibitory Concentration ( $IC_{50}$ ) พบว่า ชาเขียวจังหวัดเชียงราย พันธุ์อัสสัม มีค่า  $IC_{50}$  น้อยที่สุด แสดงถึงความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ได้มากที่สุด ตามด้วย ชาเขียวจังหวัดนราธิวาส พันธุ์อัสสัม และ ชาเขียวจังหวัดเชียงใหม่ พันธุ์จิน ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณสารโพลีฟีนอลและฟลาโวนอยด์ในชาเขียว ทั้งนี้ ค่า  $IC_{50}$  ดังกล่าวไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \geq 0.05$ ) **สรุป:** ปริมาณสารสำคัญโพลีฟีนอลในแต่ละแหล่งปลูกชาเขียว มีระดับที่แตกต่างกันออกไป โดยสารสำคัญ polyphenols แสดงฤทธิ์ต้านการอักเสบเบื้องต้นสัมพันธ์กับแหล่งปลูกดังนี้ ชาเขียวจังหวัดเชียงราย พันธุ์อัสสัม ชาเขียวจังหวัดนราธิวาส พันธุ์อัสสัม และชาเขียวจังหวัดเชียงใหม่ พันธุ์จินที่มีปริมาณสารสำคัญโพลีฟีนอล

สูง จะมีค่าการยับยั้งการอักเสบเพิ่มมากขึ้นตามความเข้มข้นของชา แสดงให้เห็นว่าชาเขียวในประเทศไทยแสดงฤทธิ์ต้านการอักเสบได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

**คำสำคัญ:** ชาเขียว, *Camellia sinensis*, การอักเสบ, สารโพลีฟีนอล, เอนไซม์ไซโคลออกซีจีเนส-2

## บทนำ

การอักเสบเป็นกลไกการป้องกันหนึ่งของร่างกาย ในการตอบสนองต่อ การบาดเจ็บของเนื้อเยื่อ โดยกระบวนการอักเสบเริ่มจากเซลล์อักเสบ กระตุ้น pro-inflammatory cytokine หรือสารตั้งต้นการอักเสบ ได้แก่  $IL-1\beta$ ,  $TNF-\alpha$ , และ  $IL-8$  จากนั้นจะเกิดการกระตุ้นสารตัวกลางในการอักเสบได้แก่ prostaglandins, cyclooxygenase (COX) และ inducible nitric oxide synthase (iNOS) ทำให้เกิดการอักเสบและทำให้เกิดภาวะปวด บวม แดง ร้อน ซึ่งเป็นอาการสำคัญของการอักเสบ<sup>2</sup> ทั้งนี้ กระบวนการอักเสบมีบทบาทในโรคทางระบบและพันธุกรรม เช่น โรคเหงือกอักเสบและปริทันต์<sup>3</sup> แผลในช่องปาก และมะเร็งช่องปาก<sup>4</sup>

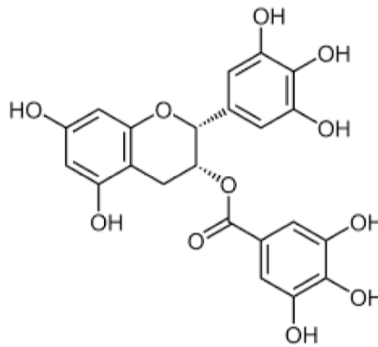
เอนไซม์ไซโคลออกซีจีเนส-2 (cyclooxygenase-2) หรือ COX-2 คือเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการเปลี่ยน arachidonic acid ให้เป็น prostaglandin E2 ( $PGE_2$ ) ซึ่งเป็นสารตัวกลางในการอักเสบ<sup>5</sup> ในทางพันธุกรรม COX-2 จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในภาวะที่มีการอักเสบ<sup>6</sup> เช่น โรคปริทันต์ลุกลาม<sup>5</sup> นอกจากนี้ยังถูกพบได้ในมะเร็งช่องปาก โดยสารดังกล่าวเป็นตัวเชื่อมระหว่างการอักเสบเรื้อรังและการเกิดมะเร็งช่องปาก<sup>4</sup> โดยการส่งเสริมการแบ่งตัวของเซลล์ และยับยั้งการตายของเซลล์แบบ apoptosis<sup>7</sup> ซึ่งจะส่งผลทำให้เกิดมะเร็งขึ้น ในสภาวะปกติ COX-2 พบได้น้อยในเนื้อเยื่อทั่วไป แต่จะพบมากในเซลล์มะเร็งและเซลล์ที่เริ่มมีการเปลี่ยนแปลง (dysplastic cells)<sup>8</sup>

ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) เป็นสารกลุ่มโพลีฟีนอล (polyphenols) ที่ได้จากการสังเคราะห์ของพืช มีโครงสร้าง C6-C3-C6 สามารถแบ่งย่อยตามองค์ประกอบ พบได้มากที่สุดได้อาหาร ได้แก่ ชาชนิดต่าง ๆ และผลไม้ที่มีรสเปรี้ยว<sup>9</sup> ทั้งนี้ การดื่มชาถือเป็นเครื่องดื่มที่เป็นที่นิยมทั่วโลก การดื่มชาทำให้เกิดออกซิเดชันของสารโพลีฟีนอล ซึ่งจะให้สารมีฤทธิ์ต้านทานต่ออนุมูลอิสระ<sup>10</sup> และมีผลในการต้านการอักเสบโดยการลดสารตั้งต้นการอักเสบของร่างกาย<sup>10</sup> และยังมีฤทธิ์ต่อต้านไวรัส (antiviral)<sup>11</sup>

นอกจากนี้ยังพบว่าในชาเขียวมีสารกลุ่มคาเทชิน (catechins) ซึ่งเป็นสารโพลีฟีนอลที่พบมากที่สุด โดยมีปริมาณ 10-30% ตามน้ำหนัก<sup>9</sup> และพบอนุพันธ์หลักของคาเทชิน คือ Epigallocatechin-

3-gallate (EGCG) (ภาพที่ 1) นอกจากนี้ยังพบว่ามีสารอนุพันธ์อื่น ๆ เช่น เควอซีติน (quercetin) กรดแกลลิกและสารประกอบฟีนอลิกอื่น ๆ ที่สามารถยับยั้งการอักเสบได้เช่นกัน ทั้งนี้จากการศึกษาก่อน

หน้าพบว่า คาเทชินและเคอซีตินจากชาเขียวนั้นมีบทบาทสำคัญในการลดปริมาณสารตัวกลางในการอักเสบได้<sup>12</sup>



ภาพที่ 1 ลักษณะโครงสร้างสาร EGCG1

แหล่งเพาะปลูกชาในประเทศไทยส่วนมากอยู่ตามภูเขาทางภาคเหนือและภาคใต้ของประเทศ โดยกระจายอยู่ในหลายจังหวัด ได้แก่ เชียงใหม่ เชียงราย แม่ฮ่องสอน ตาก และนราธิวาส ซึ่งแต่ละแหล่งปลูกจะมีสภาพภูมิอากาศที่แตกต่างกัน ซึ่งปัจจัยดังกล่าวจะส่งผลให้มีปริมาณสารโพลีฟีนอลและแร่ธาตุอื่น ๆ แตกต่างกันด้วย<sup>13</sup>

แม้ว่าในปัจจุบันจะมีการศึกษาฤทธิ์และกลไกในการยับยั้งการอักเสบจากสารหลายชนิด<sup>14</sup> แต่ยังไม่มีการศึกษาถึงผลของการใช้สารโพลีฟีนอลในใบชาที่ส่งผลในการยับยั้งการอักเสบ ในการศึกษาครั้งนี้จึงต้องการศึกษาทั้งปริมาณของโพลีฟีนอล ฟลาโวนอยด์ และ EGCG จากใบชาหลากหลายชนิดและหลากหลายแหล่งที่มา รวม

ถึงผลของโพลีฟีนอลจากใบชาต่อการทำงานของเอนไซม์ COX-2 และปริมาณของ PGE<sub>2</sub>

## วัตถุประสงค์และวิธีการ

### 1. วัตถุประสงค์

ชนิดของพันธุ์ชาเขียว *Camellia sinensis* L. (O.) Ktunze<sup>15</sup> ที่ใช้ในการศึกษาแบ่งได้เป็น 2 สายพันธุ์หลัก ได้แก่ สายพันธุ์อัสสัม (Assam tea หรือ *Camellia sinensis* var. *assamica*) จากจังหวัดเชียงราย และนราธิวาส และสายพันธุ์จีน (*Camellia sinensis* var. *sinensis*) จากจังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย และแม่ฮ่องสอน ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงข้อมูลทั่วไปผลิตภัณฑ์ชาเขียวในประเทศไทย จากแต่ละจังหวัด แบ่งตามชนิดพันธุ์ชาและแหล่งปลูก

จังหวัด	พันธุ์ชา	แหล่งปลูก
เชียงใหม่	<i>C.sinensis</i>	ดอยอ่างขาง ต.แม่งอน อ.ฝาง
เชียงราย	<i>C.sinensis</i>	ดอยแม่สลอง ต.แม่สลองนอก อ.แม่ฟ้าหลวง
แม่ฮ่องสอน	<i>C.sinensis</i>	บ้านรักไทย ต.หมอกจำแป๋ อ.เมือง
เชียงราย	<i>C.assamica</i>	ไร่ชาอุยพง ต.ป่าซาง อ.แม่จัน
นราธิวาส	<i>C.assamica</i>	บ้านเจ๊ะเหม ต.แว้ง อ.แว้ง

โดยชาเขียวที่ใช้เป็นผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากแหล่งสหกรณ์ ร้านค้าหนึ่งผลิตภัณฑ์หนึ่งตำบล ตัวอย่างละ 10 g โดยผลิตภัณฑ์จะถูกผลิตในช่วงฤดูร้อน ระยะเวลาไม่เกิน 3 เดือนนับจากวันที่เริ่มทดลอง (กุมภาพันธ์ 2563 - เมษายน 2563) โดยเก็บตัวอย่างพืชอ้างอิงงานวิจัย (voucher specimen) ไว้

## 2. การสกัดสาร

เตรียมสารสกัดหยาบ (crude extract) โดยนำชาสำเร็จรูป 10 g ใส่ลงในขวดแก้ว สกัดด้วยตัวทำละลาย 70% เอทานอล (ethanol) 50 mL ปิดด้วยกระดาษฟอยล์ ตั้งไว้บนอ่างควบคุมอุณหภูมิความถี่สูง (ultrasonic bath) ที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 30 นาที<sup>13</sup> หลังจากนั้น ใช้สาลีกรองกากชาออกแล้วนำไประเหยเพื่อกำจัดตัวทำละลายด้วยเครื่องกลั่นระเหยระบบสุญญากาศแบบหมุน (rotary evaporator) โดยสกัดทั้งหมด 3 ครั้งเสร็จแล้วทำการชั่งน้ำหนักสารสกัดที่ได้

## 3. การวิเคราะห์ปริมาณโพลีฟีนอลในแต่ละแหล่งปลูก

ผสมสารสกัดสมุนไพรหรือสารมาตรฐาน (Gallic acid) 20 µL, Folin-Ciocalteu reagent ที่เจือจางด้วยน้ำกลั่น 50 µL และ 7.5% w/v sodium bicarbonate 80 µL ทิ้งไว้ 30 นาที โดยเขย่าเป็นครั้งคราว วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) ที่ 765 nm

ปริมาณของโพลีฟีนอลทั้งหมด (Total phenolic compounds) คำนวณเป็นปริมาณ (มิลลิกรัม) ของ Gallic Acid Equivalents (GAE) ต่อ 1 กรัมของสารสกัด (mg GAE/g) โดยทดสอบ 3 ซ้ำ

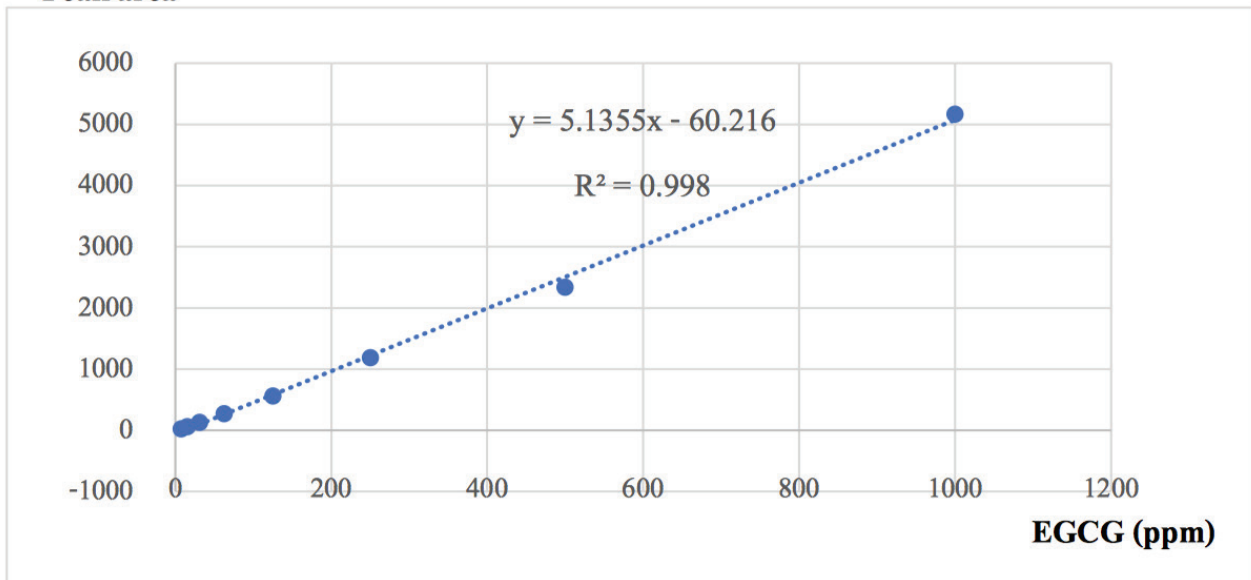
## 4. การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ในแต่ละแหล่งปลูก

ผสมสารสกัดหรือสารมาตรฐาน (quercetin) 100 µL กับ 2% aluminum chloride 100 µL จากนั้นทิ้งไว้ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง โดยเขย่าเป็นครั้งคราว วัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Vis spectro-photometer (Thermo Fisher Scientific) ที่ 415 nm ปริมาณของฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (total flavonoid compounds) คำนวณเป็นปริมาณ (มิลลิกรัม) ของ Quercetin Equivalents (mg QE) ต่อ 1 กรัมของสารสกัด (mg QE/g) โดยทดสอบ 3 ซ้ำ

## 5. การวิเคราะห์ปริมาณ EGCG ในแต่ละแหล่งปลูก

ทำการวัดปริมาณ EGCG ด้วยการทำให้ High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (Agilent รุ่น 1260) โดยใช้ผลิตภัณฑ์ชาเขียวที่บดละเอียดแล้ว 50 mg ละลายในตัวทำละลายเมทานอล (methanol) 10 mL กรองหยาบด้วยล้าสี ปรับสารละลายให้อยู่ที่ความเข้มข้น 50% methanol ก่อนนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสาร EGCG เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน EGCG (ภาพที่ 2) ที่มีความบริสุทธิ์มากกว่าร้อยละ 98.0 จาก Tokyo chemical

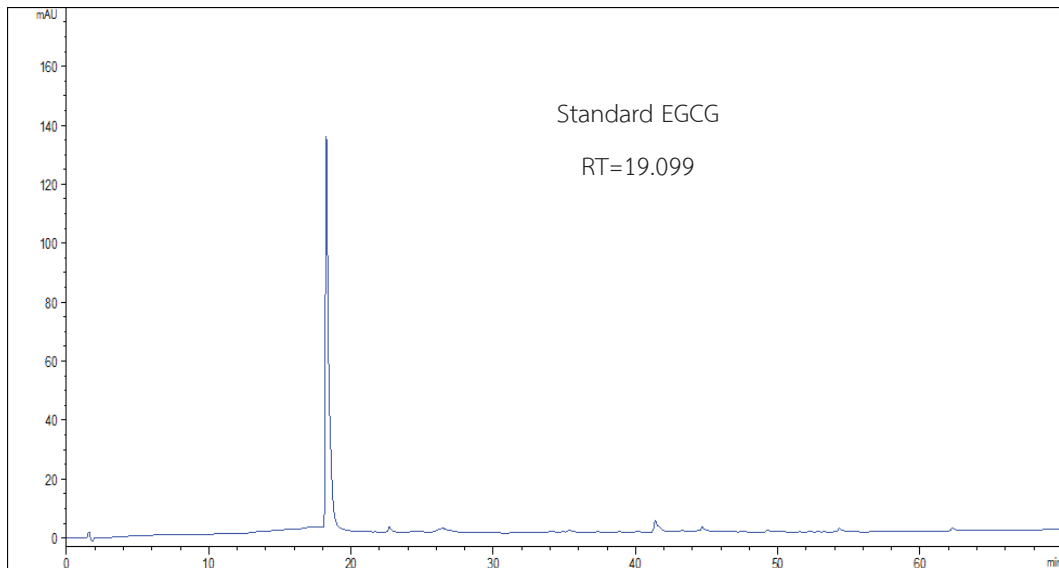
### Peak area



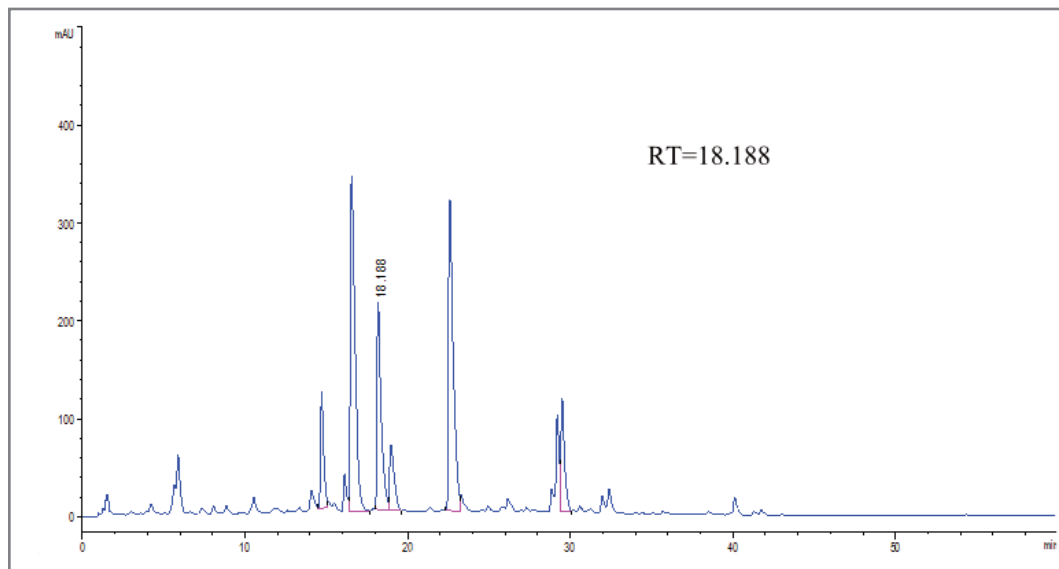
**ภาพที่ 2** กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณ EGCG ที่ความเข้มข้นสารมาตรฐานและพื้นที่ใต้พีคของ HPLC chromatogram มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ ( $R^2$ ) เท่ากับ 0.998

คำนวณค่าสมการเพื่อหาความเข้มข้น EGCG ของสารตัวอย่าง เป็นการยืนยันเอกลักษณ์ของการ EGCG มาตรฐาน (ภาพที่ 3) การทดสอบถูกทำซ้ำ 3 ครั้งเพื่อยืนยันความถูกต้องในการวัด

และนำ retention time ที่ได้มาเทียบกับ HPLC chromatogram สารตัวอย่างในช่วงเวลาใกล้เคียงกันเพื่อหาปริมาณ EGCG (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 3 HPLC chromatogram ของ สารมาตรฐาน EGCG



ภาพที่ 4 HPLC chromatogram ตัวอย่างสารสกัดชาเขียวรายพันธุ์อัสสัม มี retention time แสดงเอกลักษณ์ของ EGCG โกล์เคียงที่เวลา 18.061 นาทีและพื้นที่ใต้ peak 3935.7

## 6. การศึกษาคุณสมบัติในการยับยั้งเอนไซม์ ไซโคลออกซีจีเนส-2 ประกอบด้วย

1. การทำให้เกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ COX-2 (COX-2 reaction)

เพื่อที่จะทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ COX-2 จากสารสกัดชาเขียว ตัวอย่างชาเขียวจากจังหวัดเชียงใหม่ นราธิวาส และเชียงรายที่ความเข้มข้นต่าง ๆ นำไปทำปฏิกิริยาร่วมกับเอนไซม์ COX-2 โดยใช้สาร celecoxib ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ COX-2 เป็นสารมาตรฐาน (standard) และใช้ inactive

COX-2 เป็น negative control และกลุ่มที่ไม่มีสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ COX-2 เป็นกลุ่ม positive control

ในหลอดทดลองที่มีสารสกัดชาเขียวและสารมาตรฐาน จะถูกนำไปแช่ในเครื่อง water bath ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 10 นาที จากนั้นจึงใส่ heme 10 µL, reaction buffer 160 µL ลงใน reaction tube แต่ละหลอด แล้วทำให้เกิดการทำงานของเอนไซม์ COX-2 ด้วยการใส่ arachidonic acid (substrate) 10 µL ลงในทุกหลอดการทดลอง ผสมอย่างรวดเร็วแล้วนำไปแช่ใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 2 นาที แล้วใส่สารละลาย stannous

chloride ที่อิ่มตัวแล้ว (saturated stannous chloride) 30  $\mu$ L ในแต่ละหลอดการทดลองเพื่อหยุดปฏิกิริยา นำไปปั่นในเครื่อง vortex incubator ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที ให้ได้สารละลายที่มีลักษณะขุ่น (cloudy) แล้วนำไปตรวจสอบปริมาณสาร prostaglandin E2 ที่เกิดขึ้นด้วยการทำ competitive ELISA

## 2. การทำปฏิกิริยา Competitive ELISA

การทำ competitive ELISA จะใช้ชุด COX-2 (human) Inhibitor Screening Assay Kit จาก Cayman Chemical โดยวิธีการทำจะเป็นไปตามที่คู่มือกำหนด ค่าที่ได้จะถูกนำไปคำนวณเป็นความเข้มข้นยับยั้งครึ่งหนึ่ง (Inhibitory Concentration: IC<sub>50</sub>) โดยใช้การวิเคราะห์การถดถอยโลจิสติก (logistic regression analysis) เพื่อนำมาใช้วิเคราะห์หาค่า IC<sub>50</sub>

## 7. สถิติและการวิเคราะห์ข้อมูล

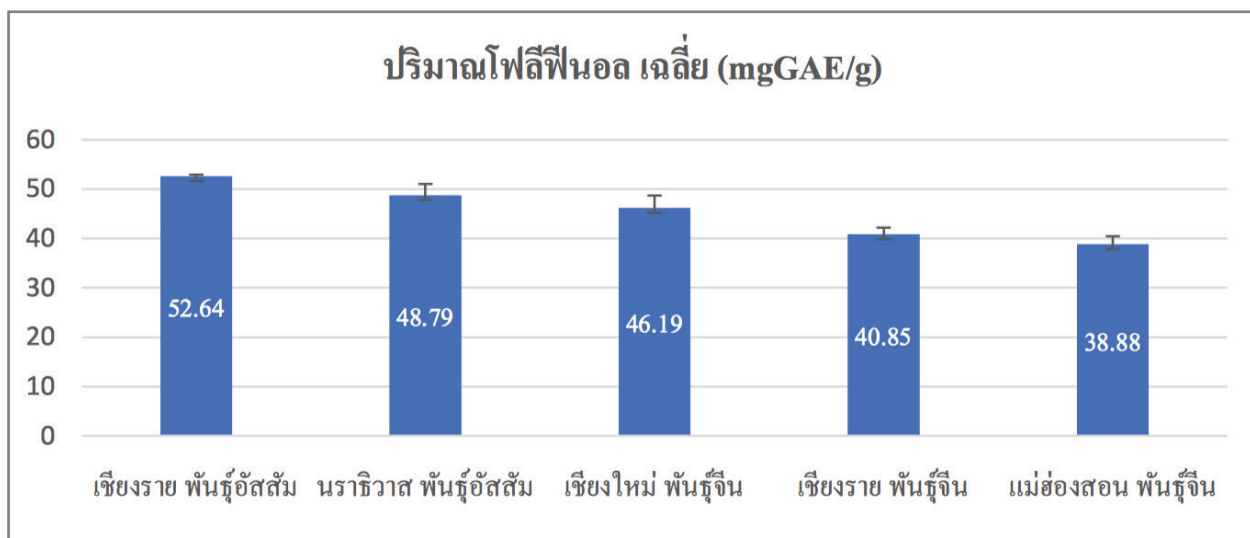
นำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยในแต่ละกลุ่มโดยใช้สถิติ one-way ANOVA ร่วมกับ post-hoc analysis หรือ Kruskal

Wallis ร่วมกับ Mann-Whitney test กรณีข้อมูลไม่แจกแจงปกติ (p-value < 0.05)

## ผล

### 1. การศึกษาสารสำคัญ โพลีฟีนอล (total phenolic compounds) จากชาเขียวแต่ละแหล่งปลูก

จากการศึกษาปริมาณสารโพลีฟีนอลจากตัวอย่างสารสกัดชาเขียวสายพันธุ์อัสสัม จากจังหวัดเชียงราย และนราธิวาส และสายพันธุ์จิ้น จากจังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย และแม่ฮ่องสอน พบว่าปริมาณสารสำคัญโพลีฟีนอล (total phenolic compounds) จากชาเขียวจังหวัดเชียงราย พันธุ์อัสสัม มีปริมาณสูงที่สุด (52.64 mgGAE/g) รองลงมาคือ ชาเขียวจังหวัดนราธิวาส พันธุ์อัสสัม (48.79 mgGAE/g), ชาเขียวจังหวัดเชียงใหม่ พันธุ์จิ้น (46.19 mgGAE/g), และต่ำที่สุดคือ ชาเขียวจังหวัดแม่ฮ่องสอน พันธุ์จิ้น (38.88 mgGAE/g) โดยพบว่าทุกแหล่งมีความแตกต่างของปริมาณสารโพลีฟีนอลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) (ภาพที่ 5)

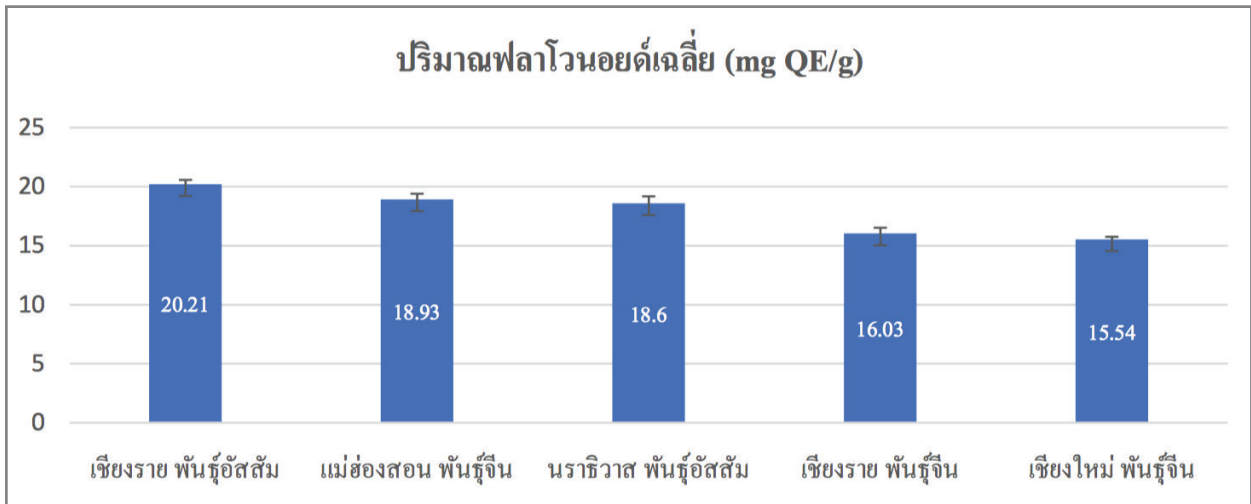


ภาพที่ 5 กราฟแสดงปริมาณโพลี ฟีนอล แต่ละแหล่งปลูกแยกชนิดพันธุ์ชา ( $p < 0.05$ )

### 2. การศึกษาสารฟลาโวนอยด์ (total flavonoid compounds) จากชาเขียวแต่ละแหล่งปลูก

จากการศึกษาปริมาณสารสำคัญฟลาโวนอยด์ พบว่าชาเขียวจังหวัดเชียงราย พันธุ์อัสสัมมีปริมาณสาร ฟลาโวนอยด์สูงที่สุด (20.21 mgQE/g) รองลงมาคือ ชาเขียวจังหวัดแม่ฮ่องสอน พันธุ์จิ้น (18.93 mgQE/g), ชาเขียวนราธิวาส พันธุ์อัสสัม (18.6 mgQE/g),

ชาเขียวเชียงราย พันธุ์จิ้น (16.03 mgQE/g) และชาเขียวจังหวัดนราธิวาส พันธุ์อัสสัม (18.6 mgQE/g) โดยพบว่าทุกแหล่งมีความแตกต่างของปริมาณสารฟลาโวนอยด์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ยกเว้นปริมาณสารฟลาโวนอยด์จากชาเขียวจังหวัดแม่ฮ่องสอน พันธุ์จิ้น และชาเขียวจังหวัดนราธิวาส พันธุ์อัสสัม ที่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \geq 0.05$ ) (ภาพที่ 6)

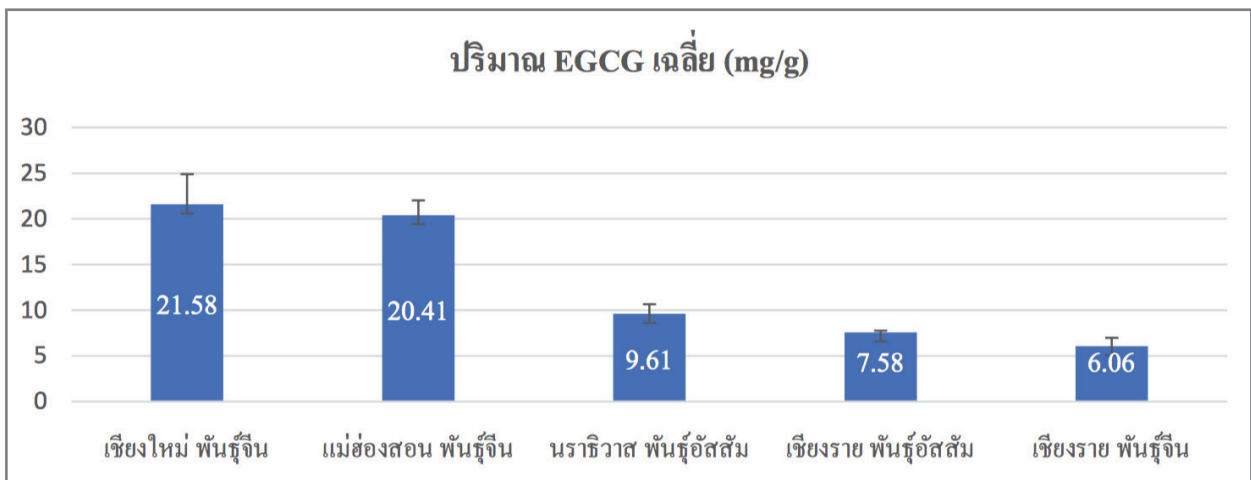


ภาพที่ 6 กราฟแสดงปริมาณฟลาโวนอยด์ แต่ละแหล่งปลูกแยกชนิดพันธุ์ชา ( $p < 0.05$ )

### 3. การศึกษาสาร EGCG (Epigallocatechin-3-gallate) จากชาเขียวแต่ละแหล่งปลูก

จากการศึกษาปริมาณสาร EGCG จากชาเขียวแต่ละแหล่งปลูก พบว่า ชาเขียวจังหวัดเชียงใหม่ พันธุ์จีน มีปริมาณสาร EGCG สูงที่สุด (21.58 mg/g) รองลงมาคือ ชาเขียวจังหวัดแม่ฮ่องสอน

พันธุ์จีน (20.41 mg/g) ชาเขียวนราธิวาส พันธุ์อัสสัม (7.58 mg/g) ส่วนชาเขียวจังหวัดเชียงราย พันธุ์จีนมีปริมาณสาร EGCG น้อยที่สุด (6.06 mg/g) โดยพบว่าทุกแหล่งมีความแตกต่างของปริมาณสาร EGCG อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 7 กราฟแสดงปริมาณ EGCG แต่ละแหล่งปลูกแยกชนิดพันธุ์ชา ( $p < 0.05$ )

จากการศึกษาด้วย competitive ELISA เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ COX-2 จากสารสกัดชาเขียวสายพันธุ์อัสสัม จากจังหวัดเชียงรายและนราธิวาส และสายพันธุ์จีนจากจังหวัดเชียงใหม่ พบว่าชาเขียวสายพันธุ์อัสสัมจากจังหวัดเชียงรายสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ COX-2 ได้มากที่สุด ( $IC_{50} = 8.18$  ppm) รองลงมาคือ ชาเขียวสายพันธุ์อัสสัมจากจังหวัดนราธิวาส ( $IC_{50} = 8.68$  ppm) และชาเขียวสายพันธุ์จีนจังหวัดเชียงใหม่ ( $IC_{50} = 9.15$  ppm) โดยทั้งหมดไม่มีความแตกต่าง

อย่างมีนัยสำคัญสถิติ ( $p \geq 0.05$ ) อย่างไรก็ตาม สารสกัดจากชาเขียวทั้งสามแห่งมีค่า  $IC_{50}$  มากกว่า celecoxib ซึ่งเป็นสารยับยั้งเอนไซม์ COX-2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

นอกจากนี้ยังพบว่า ความเข้มข้นของสารสกัดจากชาเขียวที่เพิ่มมากขึ้นทำให้มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ COX-2 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) โดยพบผลดังกล่าวในสารสกัดชาเขียวจากทั้งสามแหล่ง (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของ ชาเชียงใหม่ นราธิวาส และ เชียงราย และ Celecoxib ( $p < 0.05$ )

แหล่งปลูก	Inhibitory Concentration: IC <sub>50</sub> (ppm)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (%inhibition) การทำงานของเอนไซม์ COX-2 จากชาเขียวที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน		
		2 ppm	10 ppm	20 ppm
เชียงราย พันธุ์อัสสัม	8.18	47	55	58
นราธิวาส พันธุ์อัสสัม	8.68	46	54	57
เชียงใหม่ พันธุ์จีน	9.15	48	53	56
Celecoxib	0.03			

## วิจารณ์

การทดลองนี้เลือกชาสำเร็จรูปที่เป็นที่นิยมดื่มในประเทศไทยจากแหล่งปลูกที่แตกต่างกัน เนื่องจากภูมิประเทศที่แตกต่างกัน ส่งผลต่อปริมาณสารสำคัญที่แตกต่างกัน เพื่อที่จะนำมาเปรียบเทียบคุณสมบัติในการยับยั้งเอนไซม์ ไซโคลออกซีจีเนส- 2 ในสารสกัดชาเขียวตามแต่ละพื้นที่ในประเทศไทย

จากงานวิจัยที่ผ่านมา<sup>16,17,18</sup> สารสำคัญในใบชาเขียวกลุ่มโพลีฟีนอลนั้นมีสารสำคัญหลักเป็นอนุพันธ์คาเทชิน (catechin derivatives) อาทิเช่น EGCG, EGC และ gallic acid ซึ่งเป็น hydrolyzing moiety ของ EGCG นอกจากนี้ยังพบสารอนุพันธ์ควอซิติน (quercetin derivatives) เช่น kaempferol, myricetin และ quercetin เป็นต้น โดยสารสำคัญแต่ละตัวจะมี structural activity ต่างกัน รวมถึงความสามารถในการจับและยับยั้ง COX-2 ต่างกัน

จากการศึกษาพบว่า สารสำคัญโพลีฟีนอลและฟลาโวนอยด์ มีปริมาณที่ต่างกัน ใบชาเขียวจากแต่ละสายพันธุ์และแต่ละแหล่งปลูก สภาพภูมิอากาศ สายพันธุ์ การเก็บเกี่ยว ช่วงเวลาการเก็บเกี่ยว การจัดการหลังการเก็บเกี่ยว และ กระบวนการผลิต<sup>16</sup> และพบว่าชาเขียวสายพันธุ์อัสสัม จังหวัดเชียงราย มีปริมาณสารโพลีฟีนอลและฟลาโวนอยด์มาก อย่างไรก็ตาม การศึกษานี้กลับว่าปริมาณสารสำคัญ EGCG กลับไม่สอดคล้องไปกับปริมาณสารโพลีฟีนอลและฟลาโวนอยด์ โดยพบว่า ชาเขียวสายพันธุ์จีนจากจังหวัดเชียงใหม่กลับมีปริมาณสาร EGCG มากที่สุด แสดงให้เห็นว่าชาแต่ละพื้นที่มีส่วนของ อนุพันธ์คาเทชิน (catechin derivatives) และ อนุพันธ์ควอซิติน (quercetin derivatives) ที่แตกต่างกันเนื่องจากปัจจัยที่กล่าวข้างต้น

เมื่อศึกษาผลการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ COX-2 ของสารสกัดชาเขียวจาก 3 แหล่งปลูก ได้แก่ สายพันธุ์อัสสัม จังหวัดเชียงราย และจังหวัดนราธิวาส และสายพันธุ์จีน จังหวัดเชียงใหม่ ด้วยการคำนวณ inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) พบว่า ชาเขียวจังหวัดเชียงราย พันธุ์อัสสัมมีปริมาณ IC<sub>50</sub> น้อยที่สุด (8.18 ppm) แสดง

ถึงสารความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ COX-2 ได้มากที่สุด ชาที่มีปริมาณสารสำคัญโพลีฟีนอลสูง จะมีค่าการยับยั้งการอักเสบเพิ่มมากขึ้นตามความเข้มข้นของชา อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบกับ Celecoxib ที่เป็น Selective COX-2 inhibitor แล้ว กลับพบว่า Celecoxib ยังมีค่า IC<sub>50</sub> น้อยกว่าสารสกัดจากชาเขียวทั้ง 3 แหล่งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) แสดงว่า ชาเขียวจังหวัดเชียงราย พันธุ์อัสสัมยังมีประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์ COX-2 ได้น้อยกว่า Celecoxib

เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ COX-2 ของทั้ง 3 แหล่งปลูกพบว่า ชาเขียวพันธุ์อัสสัม จังหวัดเชียงราย มีประสิทธิภาพมากที่สุด รองลงมาคือ ชาเขียวสายพันธุ์อัสสัม จังหวัดนราธิวาส และชาเขียวสายพันธุ์จีน จังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งลำดับดังกล่าวสอดคล้องกับลำดับของปริมาณสารโพลีฟีนอลและฟลาโวนอยด์ที่พบจากแต่ละแหล่งปลูก ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ได้กล่าวถึงปริมาณของสารโพลีฟีนอลและฟลาโวนอยด์มีความสัมพันธ์กับความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ COX-2 โดยพบว่ายิ่งมีปริมาณของสารสำคัญมากจะยิ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้มาก<sup>17</sup> การศึกษาดังกล่าวจึงสอดคล้องกับงานวิจัยนี้ที่พบว่าการยับยั้งเอนไซม์ COX-2 จะขึ้นกับปริมาณโพลีฟีนอลของชาเขียวเป็นหลัก

อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการศึกษาก่อนหน้านี้ที่หาปริมาณ IC<sub>50</sub> ของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ COX-2 จากชาเขียวมาก่อน ทั้งนี้มีการศึกษาที่แสดงถึงค่า IC<sub>50</sub> ของค่าต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) จากชาเขียว ในการศึกษาดังกล่าวพบว่า IC<sub>50</sub> ของความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจากชาเขียวอยู่ที่  $6.7 \pm 0.1 \mu\text{g/ml}$ <sup>18</sup> ซึ่งมีปริมาณที่มากกว่าปริมาณ IC<sub>50</sub> ของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ COX-2 อย่างมาก จึงอาจเป็นไปได้ว่าสารสำคัญจากชาเขียวมีคุณสมบัติในการต้านการอักเสบได้น้อยกว่าการต้านอนุมูลอิสระ

เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการต้านอักเสบของชาเขียวแต่ละชนิดจากแต่ละแหล่งปลูกในประเทศไทยนั้น พบว่าแต่ละแหล่ง



ปลูกให้ผล IC<sub>50</sub> ที่ไม่แตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \geq 0.05$ ) ดังนั้น จึงอาจกล่าวได้ว่าหากพิจารณาการใช้ชาเขียวเพื่อลดการอักเสบแล้ว และสามารถนำชาเขียวจากแหล่งปลูกอื่นเพื่อทดแทนได้

ในปัจจุบัน การศึกษาหาสารชนิดใหม่จากธรรมชาติที่มีประสิทธิภาพลดภาวะค่าใช้จ่าย และมีผลข้างเคียงน้อยยังคงมีความจำเป็น ซึ่งสารโพลีฟีนอล อาจเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการรักษาโรค เพราะฉะนั้นการศึกษาเปรียบเทียบสารแต่ละตัวในชาแต่ละชนิด สามารถเป็นข้อมูลในการพัฒนาสารชนิดนี้เพื่อเป็นอีกตัวช่วยในการป้องกันการอักเสบซึ่งนำไปสู่โรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบทางทันตกรรม รวมไปถึงสามารถนำข้อมูลที่ได้ไปพัฒนาผลิตภัณฑ์ทางเลือกใหม่ได้ต่อไปในอนาคต

## สรุป

จากการศึกษาเปรียบเทียบปริมาณโพลีฟีนอล และ ฟลาโวนอยด์ จากชาเขียวสายพันธุ์ที่แตกต่างกันและมีแหล่งเพาะปลูกที่แตกต่างกันในประเทศไทย สารสกัดชาเขียวสายพันธุ์อัสสัม จากจังหวัดเชียงราย มีปริมาณโพลีฟีนอลและฟลาโวนอยด์มากที่สุด

## เอกสารอ้างอิง

1. Fan F-Y, Sang, L.-X., Jiang, M. Catechins and Their Therapeutic Benefits to Inflammatory Bowel Disease. *Molecules*. 2017.
2. Munn LL. Cancer and inflammation. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2017;9(2).
3. Holzhausen M, Spolidorio DMP, Muscara MN, Hebling J, Spolidorio LC. Protective effects of etoricoxib, a selective inhibitor of cyclooxygenase-2, in experimental periodontitis in rats. 2005;40(3):208-11.
4. Erovic BM, Pelzmann M, Turhani D, Pammer J, Niederberger V, Neuchrist C, et al. Differential Expression Pattern of Cyclooxygenase-1 and -2 in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. 2003;123(8):950-3.
5. Morton RS, Dongari-Bagtzoglou AI. Cyclooxygenase-2 Is Upregulated in Inflamed Gingival Tissues. 2001;72(4):461-9.
6. Balakumar C, Lamba P, Pran Kishore D, Lakshmi Narayana B, Venkat Rao K, Rajwinder K, et al. Synthesis, anti-inflammatory evaluation and docking studies of some new fluorinated fused quinazolines. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2010;45(11):4904-13.
7. Oyama K. A COX-2 inhibitor prevents the esophageal inflammation-metaplasia-adenocarcinoma sequence in rats. *Carcinogenesis*. 2004;26(3):565-70.
8. Shibata M, Kodani I, Osaki M, Araki K, Adachi H, Ryoike K, et al. Cyclo-oxygenase-1 and -2 expression in human oral mucosa, dysplasias and squamous cell carcinomas and their pathological significance. 2005;41(3):304-12.
9. Theerapong Theppakorn. Stability of Catechins During Processing of Green Tea and Green Tea Beverage. *KKU Sci J*. 2014;19:41(1) 6-55 (2013).
10. Heijnen CGM, Haenen GRMM, Wiseman SA, Tijburg LBM, Bast A. The interaction of tea flavonoids with the NO-system: discrimination between good and bad NO. *Food Chemistry*. 2000;70(3):365-70.
11. Middleton E. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Advances in experimental medicine and biology*. 1998;439:175-82.
12. Noreen Y, Serrano G, Perera P, Bohlin L. Flavan-3-ols Isolated from Some Medicinal Plants Inhibiting COX-1 and COX-2 Catalysed Prostaglandin Biosynthesis. 1998;64(06):520-4.
13. Kulrath P DN, Supompun N, Prateeptongkum E. Comparison of Fluoride and Catechin Levels in Green Tea Extract at Various Geographical Locations in Thailand. *Journal of department of medicine* 2019;44:140-20.
14. Pahwa V, Nair S, Shetty RS, Kamath A. Prevalence of Oral Premalignant Lesions and Its Risk Factors among the Adult Population in Udupi Taluk of Coastal Karnataka, India. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2018;19(8):2165-70.

ในขณะที่สารสกัดชาเขียวสายพันธุ์จันทน์จากจังหวัดเชียงใหม่มีปริมาณ EGCG มากที่สุด เมื่อศึกษาความสามารถในการต้านการอักเสบจากสารสกัดชาเขียว พบว่า สารสกัดชาเขียวสายพันธุ์อัสสัมจากจังหวัดเชียงรายมีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ COX-2 ได้มากที่สุดซึ่งสอดคล้องกับปริมาณโพลีฟีนอลที่มีมากที่สุด โดยมีความสามารถในการยับยั้งการทำงานที่เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัดที่เพิ่มมากขึ้น แสดงให้เห็นว่าชาเขียวที่มีการเพาะปลูกในประเทศไทยมีฤทธิ์ต้านการอักเสบได้

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสถาบันทันตกรรม ดร.สมหมาย คชนาม นายบุญวิเศษ แซ่ฮ้อ และ นางสาวพัชรี กุลฤทธิ สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ (รังสิต) รวมถึงบุคลากรทุกท่านจากศูนย์วิจัย ค้นคว้าและพัฒนาฯ สำนักงานวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีขั้นสูง มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ (ศูนย์รังสิต) ที่ช่วยสนับสนุนทำให้งานวิจัยสามารถลุล่วงไปได้เป็นอย่างดี

15. Visser T. *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze. Outlines of perennial crop breeding in the tropics Landbouwhogeschool Wageningen, The Netherlands. 1969:459-93.
16. Rusak G, Komes D, Likić S, Horžić D, Kovač M. Phenolic content and antioxidative capacity of green and white tea extracts depending on extraction conditions and the solvent used. *Food Chemistry*. 2008;110(4):852-8.
17. Kutil Z, Temml V, Maghradze D, Pribylova M, Dvorakova M, Schuster D, et al. Impact of Wines and Wine Constituents on Cyclooxygenase-1, Cyclooxygenase-2, and 5-Lipoxygenase Catalytic Activity. *Mediators of Inflammation*. 2014;2014:1-8.
18. Khalaf NA, Shakya AK, Al-Othman A, El-Agbar Z, Farah H. Antioxidant activity of some common plants. *Turkish Journal of Biology*. 2008;32(1):51-5.