



การศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ระหว่างสารสกัดชาเขียวและสารสกัดชาดำในเชิงพาณิชย์
ต่อการต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

COMPARATIVE STUDIES OF COMMERCIAL GREEN TEA EXTRACT AND
BLACK TEA EXTRACT ON ANTIOXIDANT AND
ANTI-TYROSINASE ACTIVITY

สุจินันท์ ด่านยุทธพลชัย

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชะลอวัยและฟื้นฟูสุขภาพ

สำนักวิชาเวชศาสตร์ชะลอวัยและฟื้นฟูสุขภาพ

มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

2567

©ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

การศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ระหว่างสารสกัดชาเขียวและสารสกัดชาดำในเชิงพาณิชย์

ต่อการต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

COMPARATIVE STUDIES OF COMMERCIAL GREEN TEA EXTRACT AND
BLACK TEA EXTRACT ON ANTIOXIDANT AND
ANTI-TYROSINASE ACTIVITY

สุจินันท์ ด้านยุทธพลชัย

การค้นคว้าอิสระนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชะลอวัยและฟื้นฟูสุขภาพ

สำนักวิชาเวชศาสตร์ชะลอวัยและฟื้นฟูสุขภาพ

มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

2567

©ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง



หน้าอนุมัติการค้นคว้าอิสระ

มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชะลอวัยและฟื้นฟูสุขภาพ

การค้นคว้าอิสระเรื่อง การศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ระหว่างสารสกัดชาเขียวและสารสกัดชาดำ

ในเชิงพาณิชย์ต่อการต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

Comparative Studies of Commercial Green Tea Extract and

Black Tea Extract on Antioxidant and Anti-Tyrosinase Activity

ผู้ประพันธ์ สุจินันท์ ด้านยุทธพลชัย

คณะกรรมการสอบ

รองศาสตราจารย์ ดร.ภัทรวรรณ สิทธิประภาพร

ประธานกรรมการ

อาจารย์ ดร.กานต์ วงศ์ศุภสวัสดิ์

กรรมการ

รองศาสตราจารย์ ดร.วงเดือน บันดี

กรรมการ

อาจารย์ที่ปรึกษา

Kant W.

.....อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

(อาจารย์ ดร.กานต์ วงศ์ศุภสวัสดิ์)

คณบดี

Kant W.

.....
(อาจารย์ ดร.กานต์ วงศ์ศุภสวัสดิ์)

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.กานต์ วงศ์ศุภสวัสดิ์ อาจารย์ที่ปรึกษา และรองศาสตราจารย์ ดร.วงเดือน ปั่นดี อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้คำแนะนำแนวทาง และข้อเสนอแนะที่มีคุณค่าตลอดระยะเวลาการทำงานวิจัย จนสามารถดำเนินงานวิจัยฉบับนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณบริษัท วีเอส อินกรีเดียส์ จำกัด และซัพพายเออร์ ที่ได้ให้ความช่วยเหลืออำนวยความสะดวก และให้การสนับสนุนทั้งในด้านวิชาการ และด้านอื่น ๆ ที่จำเป็นต่อการดำเนินงานวิจัยฉบับนี้ สุดท้ายนี้ขอขอบคุณครอบครัว และเพื่อน ๆ ที่ให้กำลังใจตลอดระยะเวลาการศึกษา และการจัดทำวิจัยฉบับนี้

สุจินันท์ ด่านยุทธพลชัย



ชื่อเรื่องการค้นคว้าอิสระ

การศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ระหว่างสารสกัดชาเขียวและสารสกัดชาดำในเชิงพาณิชย์ต่อการต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

ผู้ประพันธ์

สุจินันท์ ด่านยุทธพลชัย

หลักสูตร

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์ชะลอวัยและฟื้นฟูสุขภาพ)

อาจารย์ที่ปรึกษา

อาจารย์ ดร.กานต์ วงศ์สุภาสวัสดิ์

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดชาเขียว (Green tea extract: GTE) และสารสกัดชาดำ (Black tea extract: BTE) โดยใช้วิธี DPPH Radical Scavenging Assay และ Tyrosinase Inhibition Assay ตามลำดับ สารสกัดที่ใช้มีการควบคุมปริมาณสาร EGCG ในสารสกัดชาเขียวและ Theaflavin (TF) ในสารสกัดชาดำไม่ต่ำกว่า 25% วิเคราะห์ค่าร้อยละของการยับยั้งจากผลการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ในแต่ละระดับความเข้มข้น (1.000 – 0.001 mg/mL) และใช้การวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติแบบ Two-way ANOVA และ One-way ANOVA พร้อมการเปรียบเทียบพหุคูณ ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดชาดำมีค่าเฉลี่ยการยับยั้งอนุมูลอิสระสูงกว่าสารสกัดชาเขียวเล็กน้อย (74.47% เทียบกับ 71.97%) อย่างไรก็ตาม เมื่อวิเคราะห์ในแต่ละระดับความเข้มข้นพบว่า GTE แสดงฤทธิ์สูงกว่าในระดับความเข้มข้นสูง ขณะที่ BTE แสดงฤทธิ์สูงกว่าที่ระดับความเข้มข้นต่ำ สำหรับฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่า BTE มีค่าเฉลี่ยสูงกว่า GTE อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกระดับความเข้มข้น (65.74% เทียบกับ 38.29%) ผลการศึกษาสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้า และสามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ในกลุ่ม Whitening และ Anti-aging โดยเลือกใช้สารสกัดจากธรรมชาติที่มีความปลอดภัยและประสิทธิภาพสูง

คำสำคัญ: สารสกัดชาเขียว, สารสกัดชาดำ, สารต้านอนุมูลอิสระ, สารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส, EGCG, Theaflavin

Independent Study Title	Comparative Studies of Commercial Green Tea Extract and Black Tea Extract on Antioxidant and Anti-Tyrosinase Activity
Author	Sujinun Danyutthaponchai
Degree	Master of Science (Anti-Aging and Regenerative Science)
Advisor	Karnt Wongsuphasawat, Ph. D.

ABSTRACT

This study aimed to compare the antioxidant and tyrosinase inhibitory activities of green tea extract (GTE) and black tea extract (BTE). The DPPH radical scavenging assay and the tyrosinase inhibition assay were employed to evaluate antioxidant capacity and melanogenesis inhibition, respectively. The tea extracts were standardized to contain not less than 25% EGCG for GTE and theaflavin for BTE. Each extract was tested at eleven different concentrations (1.000–0.001 mg/mL), and the percentage of inhibition was calculated based on triplicate measurements. Statistical analyses were conducted using Two-way ANOVA and One-way ANOVA followed by multiple comparisons. The results indicated that BTE exhibited slightly higher average antioxidant activity than GTE (74.47% vs. 71.97%). However, GTE demonstrated stronger antioxidant effects at higher concentrations, while BTE was more effective at lower concentrations. Regarding tyrosinase inhibition, BTE showed significantly higher inhibitory activity than GTE across all concentrations (65.74% vs. 38.29%). These findings are consistent with previous studies and support the potential use of tea extracts as natural ingredients in whitening and anti-aging cosmetic formulations.

Keywords: Green Tea Extract, Black Tea Extract, Antioxidant, Tyrosinase Inhibitor, EGCG, Theaflavin

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหาวิจัย	1
1.2 ความสำคัญของการวิจัย	2
1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.4 สมมติฐานของการวิจัย	3
1.5 กรอบแนวคิดการวิจัย	3
1.6 ขอบเขตของการวิจัย	4
1.7 นิยามศัพท์เฉพาะ	4
2 การทบทวนวรรณกรรม	5
2.1 ทฤษฎีสูงอายุที่เกี่ยวข้องกับอนุมูลอิสระ	5
2.2 ชาเขียว ชาดำ และสารสกัดจากชาเขียว สารสกัดจากชาดำ	6
2.3 การตรวจสอบประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระ	7
2.4 สารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและการตรวจสอบการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส	8
2.5 งานวิจัยเปรียบเทียบประสิทธิภาพสารสกัดชาเขียวและสารสกัดชาดำ	10
3 ระเบียบวิธีวิจัย	11
3.1 สารเคมี	11
3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์	11
3.3 วิธีดำเนินงานวิจัย	12
3.4 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล	15
4 ผลงานวิจัย	16
4.1 การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	16
4.2 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส	18
5 อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ	20
รายการอ้างอิง	22
ภาคผนวก	25
ภาคผนวก ก เอกสาร CERTIFICATE OF ANALYSIS GREEN TEA EXTRACT	25

สารบัญ

บทที่	หน้า
ภาคผนวก ข เอกสาร CERTIFICATE OF ANALYSIS BLACK TEA EXTRACT	26
ภาคผนวก ค กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างประเภทสารสกัดและระดับความเข้มข้นที่มีอิทธิพลต่อค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระ	27
ภาคผนวก ง กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างประเภทสารสกัดและระดับความเข้มข้นที่มีอิทธิพลต่อค่าการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส	28
ประวัติผู้ประพันธ์	29



สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
2.1 เปรียบเทียบลักษณะชาเขียวและชาดำ	6
3.1 ขั้นตอนการเจือจางในแต่ละระดับความเข้มข้น	12
4.1 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการยับยั้งอนุมูลอิสระ (% Inhibition) ของสารสกัดชาเขียวและ สารสกัดชาดำแต่ละระดับความเข้มข้น	16
4.2 ประเภทสารสกัดชา และระดับความเข้มข้น กับค่าเฉลี่ยในการยับยั้งอนุมูลอิสระ	17
4.3 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของระดับความเข้มข้นที่ให้ค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระที่แตกต่าง	17
4.4 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (% Inhibition) ของสารสกัด ชาเขียว และสารสกัดชาดำแต่ละระดับความเข้มข้น	18
4.5 ประเภทสารสกัดชา และระดับความเข้มข้น กับค่าเฉลี่ยในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส	19
4.6 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของระดับความเข้มข้นที่ให้ค่าเฉลี่ยการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ที่แตกต่าง	19

สารบัญภาพ

ภาพ	หน้า
1.1 กรอบแนวคิดในการวิจัย	3
3.1 วิธีการเก็บเอกสารตัวอย่าง	13



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหาวิจัย

ชา (Camelia sinensis) เป็นพืชที่นำมาใช้เป็นเครื่องดื่มที่มีการบริโภคมากที่สุดรองจากน้ำดื่มและยังคงมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ชายังเป็นเครื่องดื่มที่ดีต่อสุขภาพเนื่องจากมีสารต้านอนุมูลอิสระกลุ่มโพลีฟีนอล (Stodt & Engelhardt, 2013) โดยสารออกฤทธิ์สำคัญคือ คาเทชิน (Catechin) และธีรฟลาวิน (Theaflavin, TF)

ประเภทของชาจะขึ้นอยู่กับกระบวนการแปรรูปใบชา โดยชาแบ่งออกเป็นสามประเภทหลักได้แก่ ชาเขียวจะไม่มีการอบแห้ง ผลผลิตโดยการทำให้แห้งและนึ่งใบสดเพื่อหยุดการทำงานของโพลีฟีนอลออกซิเดสทำให้ไม่เกิดออกซิเดชัน ชาอู่หลงเป็นชากึ่งหมักโดยใบชาสดจะผ่านขั้นตอนการหมักบางส่วนก่อนทำให้แห้ง ชาดำและชาแดง (ผู่อ๋อ) จะผ่านการหมักหลังการเก็บเกี่ยวก่อนการอบแห้งและนึ่ง โดยชาดำจะเกิดการออกซิเดชันโดยใช้เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสในการเร่งปฏิกิริยา ในขณะที่ชาแดงใช้จุลินทรีย์ (McKay & Blumberg, 2002)

มีการศึกษาและวิจัยถึงคุณประโยชน์จากชาต่อสุขภาพร่างกายในหลายด้าน สามารถช่วยลดและป้องกันโรคได้ เช่น ลดความเสี่ยงโรคหัวใจและหลอดเลือด ลดระดับ LDL cholesterol ปรับสมดุลไขมันในเลือด ช่วยควบคุมน้ำหนัก เพิ่มอัตราการเผาผลาญพลังงาน ช่วยสลายไขมัน ลดการอักเสบในระดับเซลล์ และช่วยป้องกันโรคเรื้อรัง (Cabrera et al., 2006) สารสำคัญที่พบในชาเขียวส่วนมากแล้วจะพบสารในกลุ่มคาเทชินโดยจะมี (-)-epigallocatechin gallate (EGCG) ที่พบมากที่สุด ในธรรมชาติ (Graham, 1992) ในปริมาณสูงถึง 7-13% ในขณะที่สารตัวอื่นๆ ที่จัดอยู่ในกลุ่มคาเทชินได้แก่ (-)-epicatechin gallate (ECG) จะพบเพียง 3-6% (-)-epigallocatechin (EGC) พบได้เพียง 3-6% และ (-)-epicatechin (EC) พบเพียง 1-3% นอกจากนี้ยังพบสารอื่นๆ อีกในชาเขียวและสารสำคัญที่พบในชาดำจะพบสารธีรฟลาวินและธีรซินนินเป็นหลักในปริมาณสูง (Liu et al., 2021)

จากกระแสนิยมในการบริโภคชา สารสกัดจากชาถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเพิ่มมากขึ้น เพื่อเพิ่มคุณประโยชน์ด้านสุขภาพให้กับผู้บริโภคในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและอาหารเพื่อสุขภาพ (Younes et al., 2018) จึงมีการนำเข้าสู่สารสกัดจากชาและชาเป็นส่วนใหญ่ โดยเฉพาะอย่างยิ่งจากประเทศจีน ซึ่งเป็นที่ตั้งของสวนชาครึ่งหนึ่งของโลก

เป็นที่ทราบกันอย่างแพร่หลายถึงสรรพคุณของชาในการต้านอนุมูลอิสระ จึงมีงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับองค์ประกอบของสารที่พบในชาและเปรียบเทียบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์การต้านจุลชีพของชาเขียวและชาดำโดยวิธี infusion (Bancirova., 2010) พบว่าชาทั้งสองชนิดในสถานะสดมีค่าเฉลี่ยของฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ TEAC ที่เท่ากัน และยังพบงานวิจัยเพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ Theaflavins (TFs) ในชาดำ กับ Catechins ในชาเขียว โดยใช้การออกซิเดชัน LDL ที่กระตุ้นด้วยทองแดงเป็นโมเดลการทดลอง (Leung et al., 2001) พบว่า Theaflavins ในชาดำมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระไม่แพ้ catechins ในชาเขียว อย่างไรก็ตามยังพบงานวิจัยเปรียบเทียบโปรไฟล์สารโพลีฟีนอล และ ความสามารถต้านอนุมูลอิสระ ในเครื่องดื่มยอดนิยม 3 ประเภท คือ กาแฟ ชา (ชาเขียวและชาดำ) และไวน์แดง โดยเปรียบเทียบในปริมาณที่ดื่มจริง (serving size) (Pintač et al., 2022) พบว่า ชาเขียว (200 มิลลิลิตร) มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงสุด เมื่อเทียบกับชาดำ กาแฟ (ตุรกี, ชงสด, กาแฟสำเร็จรูป) และไวน์แดง อีกทั้งยังพบงานวิจัยศึกษาผลกระทบของสารสกัดน้ำจากชาดำ ชาเขียว และชาขาว (*Camellia sinensis* water extracts; CSWEs) ต่อการสร้างเมลานินและเอนไซม์ไทโรซิเนสในเซลล์ melan-A (immortalized melanocytes) โดยเปรียบเทียบกับสารควบคุมเช่น arbutin และ EGCG (Young Chul Kim et al., 2015) พบว่า สารสกัดชาดำแสดงฤทธิ์ต้านเมลานินและไทโรซิเนสดีกว่า arbutin และบางกรณีสูงกว่า EGCG (ชาเขียว) ในปัจจุบันนอกจากใบชาที่ใช้ชงดื่มยังมีผลิตภัณฑ์ในกลุ่มสารสกัดจากชา ผู้วิจัยจึงสนใจทำการศึกษาโดยนำสารสกัดจากชาเขียวและสารสกัดชาดำมาศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในหลอดทดลอง เพื่อให้ทราบถึงความสามารถและความแตกต่างของฤทธิ์ระหว่างสารสกัดทั้งสองชนิดในแต่ละระดับความเข้มข้น

1.2 ความสำคัญของการวิจัย

ใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงเบื้องต้นในการเปรียบเทียบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ระหว่างสารสกัดชาเขียวและสารสกัดชาดำเพื่อเป็นแนวทางในการวิจัยต่อในมนุษย์หรือนำข้อมูลไปใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ทั้งในกลุ่มผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและเครื่องสำอาง

1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ระหว่างสารสกัดชาเขียวและสารสกัดชาดำในการต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

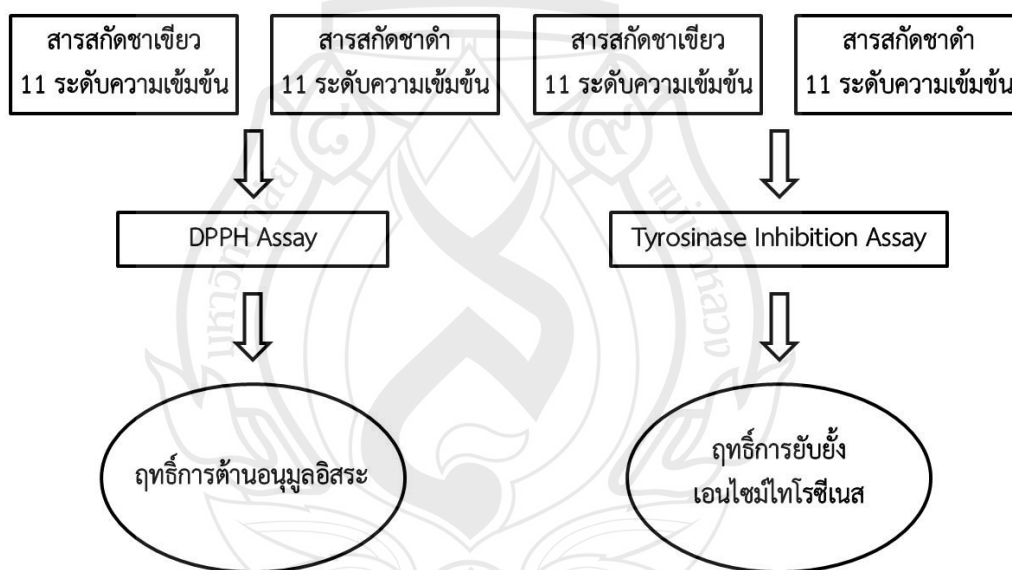
1.4 สมมติฐานของการวิจัย

1.4.1 ประเภทของสารสกัดชาเขียวและสารสกัดชาดำมีผลต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

1.4.2 ระดับความเข้มข้นของสารสกัดชาเขียวและสารสกัดชาดำมีผลต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

1.4.3 ประเภทและระดับความเข้มข้นของสารสกัดชาเขียวและสารสกัดชาดำมีผลต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

1.5 กรอบแนวคิดการวิจัย



หมายเหตุ 11 ระดับความเข้มข้นดังต่อไปนี้ 1.000, 0.500, 0.250, 0.125, 0.062, 0.031, 0.015, 0.008, 0.004, 0.002 และ 0.001 mg/ml

ภาพที่ 1.1 กรอบแนวคิดในการวิจัย

1.6 ขอบเขตของการวิจัย

การศึกษานี้เป็นการวิจัยเชิงทดลองในห้องปฏิบัติการ เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ และการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสระหว่างสารสกัดชาเขียวและสารสกัดชาดำที่มีจำหน่ายในท้องตลาด และมีการควบคุมปริมาณสารสำคัญ EGCG มากกว่า 25% ในสารสกัดชาเขียว และในสารสกัดชาดำมีการควบคุมปริมาณสารสำคัญ TF มากกว่า 25% (แนบเอกสาร Certificate of Analysis ในภาคผนวก)

1.7 นิยามศัพท์เฉพาะ

สารสกัดชาเขียว (Green Tea Extract) ได้จากการนำใบชาที่ยังไม่ผ่านการหมักมาผ่านกระบวนการในการสกัดโดยใช้ตัวทำละลาย (เช่น น้ำ, เอทานอล) เพื่อสกัดสารออกฤทธิ์ให้ได้สารสำคัญที่มีอยู่ในใบชาเขียว

สารสกัดชาดำ (Black Tea Extract) ได้จากการนำใบชาที่ผ่านกระบวนการหมักทำให้มีระดับของปฏิกิริยาออกซิเดชันเกิดขึ้นแล้วจึงนำใบชามาสกัดอีกครั้งโดยใช้ตัวทำละลาย (เช่น น้ำ, เอทานอล) เพื่อสกัดสารออกฤทธิ์เพื่อให้ได้สารสำคัญที่มีอยู่ในใบชาดำ

DPPH Assay เป็นวิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้ 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่เสถียร หากสารที่ทดสอบสามารถจับกับ อนุมูล DPPH• ไดสีของสารละลาย DPPH จะเปลี่ยนจากสีม่วงเพนสีเหลือง ซึ่งสามารถวัดการเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องวัดการดูดกลืนแสง

Tyrosinase Inhibitory Assay เป็นการทดสอบทางชีวภาพเพื่อวัดความสามารถของสารตัวอย่างในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส แบ่งเป็น 2 วิธีคือ วิธีทดสอบในหลอดทดลอง (In vitro test) และในสัตว์ทดลอง (In vivo test) โดยเอนไซม์ไทโรซิเนสเป็นเอนไซม์หลักในกระบวนการสร้างเมลานิน (Melanogenesis) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการหมองคล้ำของผิวหนัง

บทที่ 2

การทบทวนวรรณกรรม

การวิจัยนี้มีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องและสัมพันธ์กันกับเรื่องที่วิจัย ดังรายละเอียดในแต่ละหัวข้อ ดังนี้

1. ทฤษฎีสูงอายุที่เกี่ยวข้องกับอนุมูลอิสระ
2. ชาเขียว ชาดำ และ สารสกัดจากชาเขียว สารสกัดจากชาดำ
3. การตรวจสอบประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระ
4. สารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและการตรวจสอบการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส
5. งานวิจัยเปรียบเทียบประสิทธิภาพสารสกัดชาเขียวและสารสกัดชาดำ

2.1 ทฤษฎีสูงอายุที่เกี่ยวข้องกับอนุมูลอิสระ

ทฤษฎีอนุมูลอิสระตามสมมติฐานในช่วงทศวรรษที่ 50 โดย Denham Harman (Harman, 1956) เสนอว่า การเพิ่มการผลิตและการสะสมของอนุมูลอิสระตามอายุที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้เกิดความเสียหายต่อสารชีวโมเลกุลพื้นฐานได้แก่ กรดนิวคลีอิก ไขมันและโปรตีน ความเสียหายต่อองค์ประกอบของเซลล์หรือส่วนประกอบระหว่างเซลล์มีส่วนทำให้การทำงานของสรีรวิทยาลดลง ซึ่งเกี่ยวข้องกับการชราภาพ ฮาร์มานเองได้ข้อสรุปในเวลาต่อมาว่าไมโทคอนเดรียเป็นแหล่งที่มาและเป็นเป้าหมายของอนุมูลอิสระ ซึ่งนำไปสู่ “ทฤษฎีไมโทคอนเดรียของการชราภาพ” (Harman, 1972)

โดยอนุมูลอิสระสามารถแบ่งตามชนิดของปฏิกิริยาที่ตั้งชื่อตามอะตอมที่ทำปฏิกิริยาได้แก่ ออกซิเจน ไนโตรเจน หรือกำมะถัน อนุมูลอิสระชนิดออกซิเจน (Reactive Oxygen Species, ROS) ที่เกิดปฏิกิริยาส่วนใหญ่ เกิดขึ้นจากกระบวนการหายใจในไมโทคอนเดรีย เพื่อใช้ในการผลิตพลังงานภายในเซลล์ ROS ที่เกิดขึ้นหากร่างกายไม่สามารถกำจัดได้หมดจะเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (Oxidative Stress) เกิดความไม่สมดุลระหว่างอนุมูลอิสระกับระบบต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งอนุมูลอิสระ ROS จะทำลายส่วนต่าง ๆ ภายในเซลล์ก่อให้เกิดการอักเสบและโรคต่าง ๆ รวมถึงความชรา โดยปกติร่างกายจะมีกลไกการกำจัดของเสียหรือสารที่ร่างกายไม่ต้องการ รวมทั้งซ่อมแซมส่วนที่สึกหรออยู่ตลอดเวลา แต่เชื่อว่าการสะสมของอนุมูลอิสระเกิดขึ้นรวดเร็วกว่าการซ่อมแซม ดังนั้นหากร่างกายได้รับสารที่มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ จะมีส่วนช่วยยับยั้งการทำงานหรือการสร้างอนุมูลอิสระให้เกิดขึ้นน้อยลงได้

2.2 ชาเขียว ชาดำ และสารสกัดจากชาเขียว สารสกัดจากชาดำ

ชาเขียว (Green Tea) เป็นชาที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก แต่ใช้ความร้อนในการหยุดยั้งการทำงานของเอนไซม์ polyphenol oxidase เพื่อป้องกันการเกิดออกซิเดชัน โดยการนึ่ง (Steaming) พบมากในชาเขียวญี่ปุ่น เช่น Sencha Matcha และการคั่ว (Pan-firing/Roasting) พบมากในชาเขียวจีน เช่น Longjing (Dragon Well) โดยใช้วิธีให้ความร้อนเพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์ในใบชา ทำให้คงปริมาณสารโพลีฟีนอลกลุ่ม catechins ไว้ได้สูง เช่น EGCG, EGC, ECG และ EC (Zhao et al., 201; Cabrera et al., 2006) ชาเขียวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงจากกลไกการกำจัดอนุมูลอิสระ และยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของไขมัน (McKay & Blumberg, 2002) นอกจากนี้ catechins โดยเฉพาะ EGCG ยังสามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสซึ่งมีบทบาทในการสร้างเม็ดสีเมลานิน (Kubo et al., 2000)

ชาดำ (Black Tea) ชาดำเป็นชาที่ผ่านกระบวนการหมักเต็มที่ ทำให้สาร catechins เปลี่ยนไปเป็น theaflavins และ thearubigins ซึ่งเป็นสารฟีนอลที่มีสีเข้ม (Zhao et al., 2019) ถึงแม้ปริมาณ catechins จะลดลง แต่ theaflavins ยังคงแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและสามารถยับยั้งไทโรซิเนสได้ในระดับหนึ่ง (Cabrera et al., 2006)

ตารางที่ 2.1 เปรียบเทียบลักษณะชาเขียวและชาดำ

ลักษณะ	ชาเขียว	ชาดำ
กระบวนการผลิต	ไม่หมัก (Non-fermented)	หมักเต็มที่ (Fully fermented)
สารโพลีฟีนอลหลัก	Catechins (EGCG, EGC, ECG, EC)	Theaflavins, Thearubigins
ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	สูง	ปานกลาง
ฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนส	สูง (EGCG)	ปานกลาง (Theaflavins)
สีและรสชาติ	สีอ่อน กลิ่นสดชื่น รสฝาดเล็กน้อย	สีเข้ม กลิ่นหอม รสเข้ม

ความแตกต่างระหว่างชาและสารสกัดจากชา โดยชา (Tea) หมายถึงผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการนำใบชาแห้ง (*Camellia sinensis*) มาชงกับน้ำร้อนเพื่อบริโภคในรูปแบบเครื่องดื่ม โดยมีการละลายของสารออกฤทธิ์บางส่วนลงในน้ำชง เช่น catechins, theaflavins, caffeine และกรดอะมิโนบางชนิด (Cabrera et al., 2006) ในทางตรงกันข้าม สารสกัดจากชา (Tea extract) เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการนำใบชาผ่านกระบวนการสกัด โดยใช้ความร้อน เอทานอล หรือสารละลายอื่น ๆ เพื่อให้ได้สารออกฤทธิ์เข้มข้น เช่น EGCG หรือ theaflavins และสามารถนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร เครื่องสำอาง หรือยาได้โดยตรง (McKay & Blumberg, 2002) ข้อแตกต่างสำคัญคือ สารสกัดจากชา

มีความสามารถในการควบคุมปริมาณสารสำคัญได้แม่นยำกว่า และมักมีความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์สูงกว่าชงใบชาธรรมดา (Zhao et al., 2019) ตัวอย่างเช่น การชงชาเขียวในบ้านทั่วไปอาจได้ EGCG ประมาณ 20–50 mg ต่อถ้วย ในขณะที่ผลิตภัณฑ์สารสกัดชาเขียวในรูปแบบแคปซูลอาจให้ EGCG ถึง 200–300 mg ต่อแคปซูล (Zhao et al., 2019) ดังนั้น สารสกัดจากชาจึงเหมาะสมกับการนำไปใช้ในงานวิจัยทางชีวภาพหรือการพัฒนาผลิตภัณฑ์เชิงพาณิชย์ที่ต้องการควบคุมปริมาณสารออกฤทธิ์ให้คงที่ ในขณะที่การบริโภคชาในรูปแบบเครื่องดื่มมีประโยชน์ในแง่ของการบริโภคประจำวันและสุขภาพโดยรวม (Cabrera et al., 2006; McKay & Blumberg, 2002)

2.3 การตรวจสอบประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ (Free Radicals) เป็นโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนที่ไม่จับคู่ ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยาเคมีที่เป็นอันตรายกับเซลล์ในร่างกาย และเป็นหนึ่งในปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคเรื้อรังหลายชนิด เช่น โรคหัวใจ มะเร็ง และโรคอัลไซเมอร์ ด้วยเหตุนี้ การค้นหาและพัฒนาแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพจึงเป็นประเด็นสำคัญทางวิทยาศาสตร์และการแพทย์

การตรวจสอบประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระในงานวิจัยสามารถทำได้หลายวิธีดังนี้

2.3.1 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical) assay เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากเนื่องจากความง่ายและรวดเร็ว วัดความสามารถของสารตัวอย่างในการให้ไฮโดรเจนหรืออิเล็กตรอนไปจับกับอนุมูล DPPH• ซึ่งมีสีม่วงเข้ม เมื่อถูกลดรูปจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองซีด วัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ที่ความยาวคลื่น 520 nm การลดลงของค่าการดูดกลืนแสงจึงสามารถใช้ประเมินความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารนั้นได้ (Rankovic et al., 2012)

2.3.2 ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) assay ใช้อนุมูลอิสระชนิด ABTS⁺• ซึ่งมีสีเขียว-ฟ้า เมื่อเติมสารตัวอย่างที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระลงไป สารเหล่านี้จะทำปฏิกิริยารีดิวซ์ ABTS⁺• ทำให้ความเข้มของสีลดลง วัดการลดลงของสีโดยวัด Absorbance ที่ 734 nm สามารถใช้ได้กับสารที่ละลายน้ำหรือไขมัน และวัดต่อสารต้านอนุมูลอิสระหลายชนิดมากกว่า DPPH (Re et al., 1999)

2.3.3 FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) วัดความสามารถของสารในการเปลี่ยน Fe³⁺-TPTZ (Ferric-2,4,6-tripyridyl-s-triazine) ให้เป็น Fe²⁺ ที่มีสีฟ้า วัด Absorbance ที่ 593 nm เป็นวิธีที่ง่าย แต่ทำได้เฉพาะกับสารที่มีฤทธิ์รีดิวซ์ (reducing capacity) เท่านั้น (Benzie & Strain, 1996)

2.3.4 ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) วัดความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการป้องกันการเกิดอนุมูล peroxyl ที่ทำลายสาร fluorescein โดยใช้ AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride) เป็นตัวกระตุ้น วัด Fluorescence ลดลงเมื่อเวลาผ่านไป assay เป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพในการวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารชีวภาพในเชิง kinetic สามารถใช้เปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระได้แม่นยำและครอบคลุม แต่มีข้อจำกัดในแง่ของเวลาในการทดสอบและเครื่องมือที่ใช้ (Ou et al., 2001)

2.3.5 Hydroxyl Radical Scavenging Assay ใช้ระบบปฏิกิริยา Fenton ที่สร้างอนุมูลไฮดรอกซิล Hydroxyl radical ($\bullet\text{OH}$) เป็นหนึ่งในอนุมูลอิสระที่มีความว่องไวสูงและเป็นอันตรายต่อเซลล์มากที่สุด โดยสามารถทำลาย DNA, โปรตีน และไขมันในร่างกายได้ ซึ่งจะทำลายสารตั้งต้น เช่น deoxyribose หรือ salicylic acid ผลิตภัณฑ์จากการทำลาย deoxyribose จะทำปฏิกิริยากับ thiobarbituric acid (TBA) เมื่อให้ความร้อนในกรด จะเกิดสารสีชมพูที่วัดค่าดูดกลืนแสงได้ที่ 532 nm สารต้านอนุมูลอิสระจะเข้าไปยับยั้งปฏิกิริยานี้ ส่งผลให้สีลดลง ค่าวัด Absorbance ต่ำลง แสดงถึงฤทธิ์กำจัดอนุมูลไฮดรอกซิล (Halliwell et al., 1987)

2.4 สารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและการตรวจสอบการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

เอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase) เป็นเอนไซม์ที่มีทองแดงเป็นองค์ประกอบ ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการสร้างเมลานิน (melanin) โดยเร่งปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชันของแอล-ไทโรซีน (L-tyrosine) ให้กลายเป็นแอล-โดปา (L-DOPA) และออกซิเดชันของแอล-โดปาไปเป็นโดปาคิวโนน ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสร้างเม็ดสีผิวในมนุษย์ (Solano et al., 2006) การทำงานที่มากเกินไปของเอนไซม์นี้สัมพันธ์กับภาวะผิวหนังคล้ำผิดปกติ เช่น ฝ้า กระ และจุดด่างดำ สารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจึงได้รับความสนใจอย่างมากในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง และการแพทย์ โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์บำรุงผิวที่มีฤทธิ์ลดจุดด่างดำ ปรับสีผิวให้สม่ำเสมอ ตลอดจนมีการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เพื่อป้องกันการเปลี่ยนสีของผลไม้และผักจากปฏิกิริยาเอนไซม์ไทโรซิเนส

2.4.1 สารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสามารถจำแนกได้ตามกลไกการยับยั้ง ได้แก่

2.4.1.1 Competitive inhibitors สารยับยั้งชนิดนี้จะแข่งขันกับซับสเตรต (เช่น L-tyrosine หรือ L-DOPA) เพื่อจับกับตำแหน่งออกฤทธิ์ของเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ ตัวอย่างเช่น Kojic acid, Arbutin (Kim & Uyama, 2005)

2.4.1.2 Non-competitive inhibitors สารจะจับกับตำแหน่งอื่นของเอนไซม์ที่ไม่ใช่ตำแหน่งออกฤทธิ์ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเอนไซม์ ส่งผลให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้แม้มีซับสเตรตอยู่ ตัวอย่างเช่น Glabridin (Chang, 2009)

2.4.1.3 Mixed-type inhibitors เป็นการยับยั้งแบบผสมระหว่าง competitive และ non-competitive โดยสารยับยั้งสามารถจับกับทั้งเอนไซม์เปล่า และเอนไซม์-ซับสเตรตคอมเพล็กซ์ ทำให้ลดกิจกรรมของเอนไซม์อย่างมีประสิทธิภาพ ตัวอย่างเช่น สารฟลาโวนอยด์จากพืชบางชนิด (Seo et al., 2003)

2.4.1.4 Uncompetitive Inhibition เป็นกลไกที่สารยับยั้งจะจับกับเอนไซม์ เฉพาะเมื่อเอนไซม์ได้จับกับซับสเตรตแล้วเท่านั้น ทำให้เกิดเอนไซม์-ซับสเตรต-อินฮิบิเตอร์ คอมเพล็กซ์ กลไกนี้มักพบได้น้อยในกรณีของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Khatib et al., 2007)

ตัวอย่างสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนส สารธรรมชาติ ได้แก่ Kojic acid, Arbutin, Glabridin และ Resveratrol พืชสมุนไพรไทย ได้แก่ มะขามป้อม ใบฝรั่ง มังคุด และขมิ้นชัน สารสังเคราะห์ ได้แก่ Hydroquinone และ อนุพันธ์ของ Ascorbic acid

2.4.2 การทดสอบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส สามารถแบ่งได้ดังนี้

2.4.2.1 Spectrophotometric Assay วัดการดูดกลืนแสงของ dopachrome ที่เกิดจากปฏิกิริยาของ tyrosinase กับ L-DOPA หรือ L-tyrosine ที่ความยาวคลื่น 475–492 nm เป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็ว ใช้เครื่องมือพื้นฐานทั่วไป (microplate reader) เหมาะกับการคัดกรองสารจำนวนมาก มีข้อจำกัดหากตัวอย่างมีสีจะทำความแม่นยำลดลง (Seo et al., 2003)

2.4.2.2 Melanin Formation Assay วัดปริมาณเมลานินที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาไทโรซิเนส โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 nm หรือใช้วิธีสกัดเมลานินและชั่งน้ำหนัก วิธีนี้สะท้อนกระบวนการสร้างเมลานินจริง และเหมาะสำหรับการทดสอบผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป แต่ใช้เวลานาน และค่าความแม่นยำต่ำกว่าวิธีอื่น (Chang, 2009)

2.4.2.3 Kinetic Inhibition Assay ศึกษาพารามิเตอร์ทางเอนไซม์ เช่น K_m , V_{max} เพื่อจำแนกกลไกการยับยั้ง เป็นวิธีวิเคราะห์กลไกการยับยั้งได้ละเอียด และใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาเภสัชภัณฑ์ แต่มีขั้นตอนซับซ้อน และต้องใช้ความรู้ด้านเอนไซม์จลนศาสตร์ (Seo et al., 2003)

2.4.2.4 Cell-based Tyrosinase Assay ใช้เซลล์ที่แสดงออก tyrosinase เช่น B16 melanoma cells วัดผลของสารยับยั้งต่อการสร้างเมลานินจริงในเซลล์ เป็นวิธีที่สะท้อนผลในระบบชีวภาพ และสามารถประเมินความปลอดภัยร่วมได้ แต่ต้องใช้เทคนิคการเลี้ยงเซลล์ซึ่งมีต้นทุนและเวลาในการทำสูง (Chang, 2009)

2.5 งานวิจัยเปรียบเทียบประสิทธิภาพสารสกัดชาเขียวและสารสกัดชาดำ

มีงานวิจัยของ Zhong et al. (2019) ศึกษาเปรียบเทียบปริมาณสารที่พบในชาเขียวและชาดำ ซึ่งมีวิธีวิจัยโดยการนำใบชาทั้ง 2 ประเภทมาทำการ Infusion จากนั้นจึงนำมาหาปริมาณของสารสำคัญ โดยพบว่า ชาเขียวจะมีปริมาณของ EGCG มากที่สุด 48.48 ± 9.16 mg/g แต่ไม่พบ Theaflavin และชาดำจะพบปริมาณทั้ง TFs และ EGCG ในปริมาณ 0.70 ± 0.08 mg/g และ 2.15 ± 0.15 mg/g ตามลำดับ และพบว่าชาเขียวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่าชาดำจากการทดสอบด้วยวิธี Ferric-Reducing Antioxidant Power (FRAP) และ Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) และยังพบงานวิจัยของ Pintač, et al. (2022) ที่ให้ผลเช่นเดียวกัน

ในงานวิจัยของ Leung et al. (2001) พบว่า Theaflavin ที่พบในชาดำมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในระดับที่ใกล้เคียงกับสารคาเทชินในชาเขียว โดยเฉพาะในแง่ของการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำ (LDL) ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยไอออนทองแดง (Cu^{2+})

สำหรับการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสมีงานวิจัยที่ศึกษาโดยวิธีสกัดใบชา รายงานว่า สารสกัดจากชาดำจะมีประสิทธิภาพยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ดีกว่าสารสกัดจากชาขาวและชาเขียว (Young et al., 2015)

บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

รูปแบบการวิจัยเชิงทดลองในห้องปฏิบัติการ กลุ่มตัวอย่างสารสกัดชาเขียวและสารสกัดชาดำจากผู้ผลิต และมีการควบคุมปริมาณสารสำคัญ EGCG และ TF มากกว่า 25%

3.1 สารเคมี

- 3.1.1 Green tea extract 25% EGCG, BAOJI OASIER NUTRI-TECH CO., LTD (China)
- 3.1.2 Tea extract TF25, YAIZU SUIKAGAKU INDUSTRY CO., LTD. (Japan)
- 3.1.3 Methanol analytical grade
- 3.1.4 Distilled water (น้ำกลั่น)
- 3.1.5 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
- 3.1.6 Ascorbic acid
- 3.1.7 Kojic acid
- 3.1.8 Dimethyl sulfoxide (DMSO)
- 3.1.9 Phosphate buffer (pH 6.8)
- 3.1.10 Tyrosinase from mushroom (Sigma T3824)
- 3.1.11 L-tyrosine

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

- 3.2.1 Spectrophotometer (AMR-100 Microplate Reader, ALLSHENG)
- 3.2.2 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (JB 3002รุ่นG/FACT)
- 3.2.3 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (METTLER TOLEDO รุ่น: MS3002TS)
- 3.2.4 Auto pipette (Biohit PLC.)
- 3.2.5 Multichannel pipette
- 3.2.6 ถังมือปลอดเชื้อ

3.2.7 บีกเกอร์

3.2.8 Volumetric flask

3.2.9 กระบอกตวง

3.2.10 Micropipette tip

3.2.11 Vortex mixer (Scientific Industries GENE2 รุ่น G560E)

3.2.12 Microwell plate (96-Well Plate)

3.2.13 ขวดแก้ว

3.2.14 แผ่นอลูมิเนียมฟอยล์

3.2.15 Eppendorf tube 1.5 ml

3.3 วิธีดำเนินงานวิจัย

3.3.1 การเตรียมสารละลายจากสารสกัดชาเขียว และสารสกัดชาดำ

เตรียมสารละลายตัวอย่างที่ต้องการศึกษา และ สารละลายมาตรฐาน Ascorbic acid และ Kojic acid เข้มข้น 1 mg/mL โดยชั่งสารจำนวน 3 mg ใส่ลงใน Eppendorf tube เติมน้ำกลั่น 3 ml โดยใช้ Micropipette เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex mixer

3.3.2 การเจือจางสารละลายตัวอย่างลงใน 96-Well Plate

3.3.2.1 เตรียมแผ่น 96-well plate เติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 μ L ลงในหลุมที่ 2 ถึง 11

3.3.2.2 เติมสารละลายตัวอย่าง และ สารละลายมาตรฐานที่เตรียมไว้แล้วที่ความเข้มข้น 1 mg/mL ปริมาตร 100 μ L ใส่ลงในหลุมที่ 1 ของแผ่น 96-well plate

3.3.2.3 ทำการเจือจางแบบ 2 เท่า โดยดูดสารละลายจากหลุมก่อนหน้า 50 μ L ผสมกับ ตัวทำละลายน้ำกลั่นในหลุมถัดไป 50 μ L แล้วผสมให้เข้ากัน โดยการดูด-ปล่อย (pipette up-down) 5-10 ครั้ง ในแต่ละชั้น จนได้สารละลายทั้งหมด 11 ระดับความเข้มข้น

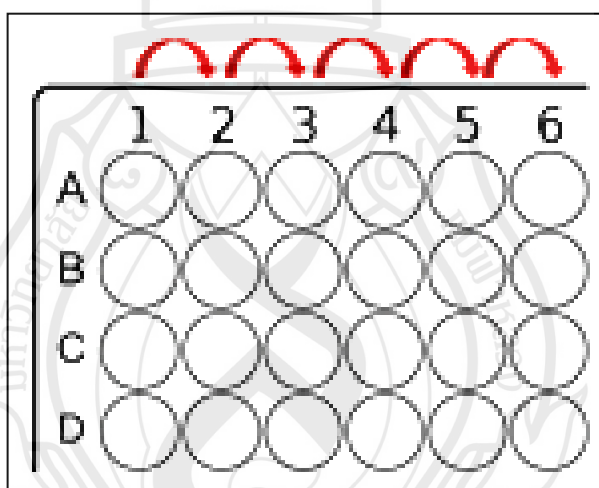
ตารางที่ 3.1 ขั้นตอนการเจือจางในแต่ละระดับความเข้มข้น

หลุมที่	ขั้นตอนการเจือจาง	ความเข้มข้น (mg/mL)
1	เติม stock 100 μ L	1.000
2	ดูดจากหลุม 1 $\rightarrow$ 50 μ L + 50 μ L ตัวทำละลาย	0.500
3	ดูดจากหลุม 2 $\rightarrow$ 50 μ L + 50 μ L ตัวทำละลาย	0.250
4	ดูดจากหลุม 3 $\rightarrow$ 50 μ L + 50 μ L ตัวทำละลาย	0.125
5	ดูดจากหลุม 4 $\rightarrow$ 50 μ L + 50 μ L ตัวทำละลาย	0.062

ตารางที่ 3.1 (ต่อ)

หลุมที่	ขั้นตอนการเจือจาง	ความเข้มข้น (mg/mL)
6	ดูดจากหลุม 5 → 50 μ L + 50 μ L ตัวทำละลาย	0.031
7	ดูดจากหลุม 6 → 50 μ L + 50 μ L ตัวทำละลาย	0.016
8	ดูดจากหลุม 7 → 50 μ L + 50 μ L ตัวทำละลาย	0.008
9	ดูดจากหลุม 8 → 50 μ L + 50 μ L ตัวทำละลาย	0.004
10	ดูดจากหลุม 9 → 50 μ L + 50 μ L ตัวทำละลาย	0.002
11	ดูดจากหลุม 10 → 50 μ L + 50 μ L ตัวทำละลาย	0.001

ในหลุมที่ 11 หลังจากผสมให้เข้ากันดีแล้ว จากนั้นดูดทั้ง 50 μ L เพื่อปรับปริมาตรให้เป็น 50 μ L ให้เท่ากันทุกหลุมเพื่อเตรียมทดสอบต่อไป



ภาพที่ 3.1 วิธีการเจือจางสารละลายตัวอย่าง

3.3.3 การเตรียมสารละลาย 1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl (DPPH)

เตรียมความเข้มข้นของ DPPH ที่ 0.05 g/L โดยชั่ง DPPH 0.5 mg ใส่ลงใน volumetric flask เติมน methanol analytical grade เขย่าให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตรให้ได้ 10 ml

3.3.4 การเตรียมเอนไซม์ Tyrosinase

เตรียมเอนไซม์ Tyrosinase ที่ได้จากเห็ด (mushroom tyrosinase) ความเข้มข้น 250 units/ml โดยชั่งผง Tyrosinase 0.50 mg ละลายใน phosphate buffer pH 6.8 เติมนจนได้ปริมาตร 2 ml เขย่าจนละลายหมด เก็บในสภาวะเย็น หลีกเลี่ยงแสงและความร้อน

3.3.5 การเตรียมสารตั้งต้น L-Tyrosine

เตรียมสารละลาย L-tyrosine ความเข้มข้น 5 mM โดยชั่ง L-tyrosine 4.53 mg ละลายใน phosphate buffer pH 6.8 จนได้ปริมาตร 5 ml เขย่าหรือคนให้ละลายจนหมด

3.3.6 การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl Scavenging Capacity (DPPH)

การศึกษากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีของ (Rankovic et al., 2012) โดยนำสารละลายที่เตรียมไว้ใน 96-Well Plate ในแต่ละระดับความเข้มข้นที่เจือจางแล้วจำนวน 50 ไมโครลิตร มาเติมสารละลาย DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical) 100 ไมโครลิตรในแต่ละหลุม ผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็วจากนั้นตั้งไว้ในที่มืดอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาการต้านอนุมูลอิสระ สีของสารละลายจะเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลืองหรือสีจะซีดจางลง โดยเปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระที่ใช้เป็นสารมาตรฐานคือ Ascorbic acid จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร โดยเครื่อง Microplate Reader นำค่าที่ได้มาคำนวณค่าร้อยละของการยับยั้ง (% Inhibition) ซึ่งเป็นตัวชี้บ่งฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) ทำการทดลอง 3 ครั้ง สูตรการคำนวณหา % Inhibition

$$\% \text{ Inhibition} = [(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$$

เมื่อ A_1 = A sample absorbance ที่วัดได้ของสารสกัดตัวอย่าง

A_0 = A control absorbance ที่วัดได้จากสารมาตรฐาน Ascorbic acid

3.3.7 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

การยับยั้งไทโรซิเนสดำเนินการโดยใช้ไมโครเพลท 96 หลุม ดัดแปลงตามวิธีของ Larik et al. (2017) โดยใช้ 10% DMSO ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 6.8) เป็นตัวทำละลายในการเตรียมสารละลายตัวอย่างและสารละลายมาตรฐาน หลังจากเตรียมสารละลายและทำการเจือจางเพื่อให้ได้ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ สารละลายตัวอย่าง 50 ไมโครลิตรในบัฟเฟอร์ถูกใส่ในจาน 96 หลุม จากนั้นเติมเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ได้จากเห็ดจำนวน 50 ไมโครลิตร (250 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร) แล้วนำส่วนผสมไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง และคลุมด้วยอลูมิเนียมฟอยล์เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมแอล-ไทโรซีนจำนวน 50 ไมโครลิตร (2.5 มิลลิโมลาร์) แล้วจึงบ่มเพิ่มที่อุณหภูมิห้อง และคลุมด้วยอลูมิเนียมฟอยล์อีก 20 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร โดยเครื่อง Microplate Reader นำค่าที่ได้มาคำนวณค่าร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (% Inhibition) ใช้ Kojic acid เป็นสารมาตรฐานเปอร์เซ็นต์ของการยับยั้งไทโรซิเนสคำนวณจากสูตรต่อไปนี้

$$\% \text{ Tyrosinase Inhibition} = [(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$$

เมื่อ A_1 = A sample absorbance ที่วัดได้ของสารสกัดตัวอย่าง

A_0 = A control absorbance ที่วัดได้จากสารมาตรฐาน Kojic acid

3.4 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

รายงานผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ยร้อยละของการยับยั้ง จากข้อมูลผลการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ในแต่ละระดับความเข้มข้น และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างร้อยละค่าเฉลี่ยการยับยั้งระหว่างสารสกัดชาเขียว และสารสกัดชาดำ ด้วยวิธีการวิเคราะห์สถิติ Independent sample T-Test ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P < 0.05$)

วิเคราะห์เปรียบเทียบอิทธิพลร่วมระหว่างประเภทของสารสกัดและระดับความเข้มข้นด้วยวิธีการวิเคราะห์สถิติ Two way ANOVA ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P < 0.05$)

วิเคราะห์เปรียบเทียบพหุคูณ (multiple comparisons) คู่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างด้วยวิธีการวิเคราะห์สถิติ One way ANOVA ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P < 0.05$)

ใช้โปรแกรม IBM® SPSS® Statistics version 24 ในการวิเคราะห์ผลทางสถิติ



บทที่ 4

ผลงานวิจัย

4.1 การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical) radical scavenging assay โดยการสังเกตความสามารถในการดักจับ DPPH เทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน Ascorbic acid พบว่า สารสกัดชาเขียวมีค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH (% inhibition) เท่ากับ 71.97 และ สารสกัดชาดำมีค่าเท่ากับ 74.47 เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดชาเขียว และ สารสกัดชาดำในแต่ละระดับความเข้มข้น พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 1.000, 0.250, 0.008, 0.004, 0.002 และ 0.001 mg/ml มีค่า p-value ≤ 0.05 แสดงว่าที่ระดับความเข้มข้นข้างต้นสารสกัดทั้งสองประเภทมีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระที่แตกต่างกัน ดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการยับยั้งอนุมูลอิสระ (% Inhibition) ของสารสกัดชาเขียว และสารสกัดชาดำแต่ละระดับความเข้มข้น

ระดับความ เข้มข้น	การยับยั้งอนุมูลอิสระ (% Inhibition)						
	สารสกัดชาเขียว			สารสกัดชาดำ			p-value
	จำนวน	$\bar{X}$	S.D.	จำนวน	$\bar{X}$	S.D.	
1.000 mg/ml	3	98.02	0.93	3	90.48	1.21	0.001
0.500 mg/ml	3	95.17	4.88	3	90.09	0.77	0.149
0.250 mg/ml	3	92.07	0.77	3	89.12	0.44	0.005
0.125 mg/ml	3	89.10	0.21	3	88.53	1.21	0.475
0.062 mg/ml	3	86.62	3.88	3	88.14	0.89	0.543
0.031 mg/ml	3	85.01	2.48	3	84.16	1.1	0.617
0.016 mg/ml	3	82.90	1.97	3	83.38	2.54	0.808
0.008 mg/ml	3	71.00	4.29	3	82.51	2.54	0.016
0.004 mg/ml	3	47.21	3.55	3	63.46	1.1	0.002
0.002 mg/ml	3	22.30	4.02	3	37.42	0.73	0.003
0.001 mg/ml	3	6.69	1.12	3	21.86	4.01	0.003
รวม	33	71.97		33	74.47		

หมายเหตุ p-value ≤ 0.05

จากการวิเคราะห์ผลของประเภตสารสกัดชา และระดับความเข้มข้น ต่อค่าเฉลี่ยในการยับยั้งอนุมูลอิสระพบว่า ประเภตสารสกัดชา มีผลต่อค่าเฉลี่ยในการยับยั้งอนุมูลอิสระอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p\text{-value} < 0.001$ ระดับความเข้มข้น มีผลต่อค่าเฉลี่ยในการยับยั้งอนุมูลอิสระอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p\text{-value} < 0.001$ และพบว่า ประเภตสารสกัดชา และระดับความเข้มข้น มีผลต่อค่าเฉลี่ยในการยับยั้งอนุมูลอิสระอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p\text{-value} < 0.001$ ดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ประเภตสารสกัดชา และระดับความเข้มข้น กับค่าเฉลี่ยในการยับยั้งอนุมูลอิสระ

แหล่งที่มา	dj	SS	MS	F	p-value
ประเภตสารสกัดชา	1	102.73	102.73	15.05	0.001
ระดับความเข้มข้น	10	39713.98	3971.40	581.94	0.001
ประเภตสารสกัดชา * ระดับความเข้มข้น	10	977.01	97.70	14.32	0.001

หมายเหตุ $p\text{-value} \leq 0.05$

จากการเปรียบเทียบความแตกต่างรายคู่ของระดับความเข้มข้นต่อค่าเฉลี่ยการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดจำแนกด้วยวิธี Scheffe พบความแตกต่างกันอย่างน้อย 1 คู่ ของระดับความเข้มข้นต่อค่าเฉลี่ยการยับยั้งอนุมูลอิสระ ดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 การเปรียบเทียบคู่ของระดับความเข้มข้นที่ให้ค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระที่แตกต่าง

ความเข้มข้น (mg/ml)	สารสกัดชาดำ											
	1.000	0.500	0.250	0.125	0.062	0.031	0.016	0.008	0.004	0.002	0.001	1.000
1.000								*	*	*	*	
0.500								*	*	*	*	
0.250									*	*	*	
0.125									*	*	*	
0.062									*	*	*	
0.031									*	*	*	
0.016									*	*	*	
0.008	*	*							*	*	*	
0.004	*	*	*	*	*	*	*	*		*	*	
0.002	*	*	*	*	*	*	*	*	*		*	
0.001	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		

หมายเหตุ *คือคู่ของระดับความเข้มข้นที่มีค่าเฉลี่ยการยับยั้งอนุมูลอิสระที่แตกต่าง $p\text{-value} \leq 0.05$

จากความสัมพันธ์ระหว่างประเภตสารสกัดชา และระดับความเข้มข้นที่มีผลต่อค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระ พบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 1.000, 0.500 และ 0.250 mg/ml สารสกัดชาเขียวมีค่าการ

ยับยั้งอนุมูลอิสระสูงกว่าสารสกัดชาดำ และที่ระดับความเข้มข้น 0.125, 0.062, 0.031 และ 0.016 mg/ml พบว่า สารสกัดชาเขียวมีค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระใกล้เคียงกับสารสกัดชาดำ แต่ที่ระดับความเข้มข้น 0.008, 0.004, 0.002 และ 0.001 mg/ml พบว่าสารสกัดชาดำมีค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระสูงกว่าสารสกัดชาเขียว

4.2 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่า สารสกัดชาเขียวมีค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (% inhibition) เท่ากับ 38.29 ซึ่งต่ำกว่าสารสกัดชาดำที่มีค่าเท่ากับ 65.74 เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดชาเขียว และ สารสกัดชาดำ ในแต่ละระดับความเข้มข้น พบว่าค่า $p\text{-value} \leq 0.05$ แสดงว่าสารสกัดทั้งสองประเภทมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (% Inhibition) ของสารสกัดชาเขียว และสารสกัดชาดำแต่ละระดับความเข้มข้น

ระดับความ เข้มข้น	การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (% Inhibition)						
	สารสกัดชาเขียว			สารสกัดชาดำ			p-value
	จำนวน	$\bar{X}$	S.D.	จำนวน	$\bar{X}$	S.D.	
1.000 mg/ml	3	75.67	3.68	3	99.78	0.37	0.001
0.500 mg/ml	3	72.90	0.83	3	98.63	0.66	0.001
0.250 mg/ml	3	70.56	0.15	3	97.41	1.29	0.001
0.125 mg/ml	3	65.89	3.99	3	94.10	3.32	0.001
0.062 mg/ml	3	54.37	1.43	3	89.07	2.21	0.001
0.031 mg/ml	3	43.38	4.74	3	82.39	1.43	0.003
0.016 mg/ml	3	24.42	2.06	3	70.31	2.50	0.001
0.008 mg/ml	3	9.35	2.81	3	47.59	6.19	0.003
0.004 mg/ml	3	4.68	1.13	3	20.56	1.76	0.001
0.002 mg/ml	3	0.00	0.00	3	13.87	0.82	0.001
0.001 mg/ml	3	0.00	0.00	3	9.42	0.57	0.001
รวม	33	38.29		33	65.74		

หมายเหตุ $p\text{-value} \leq 0.05$

จากการวิเคราะห์ผลของประเภทสารสกัดชา และระดับความเข้มข้น ต่อค่าเฉลี่ยในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสพบว่า ประเภทสารสกัดชา มีผลต่อค่าเฉลี่ยในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p\text{-value} < 0.001$ ระดับความเข้มข้น มีผลต่อค่าเฉลี่ยในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p\text{-value} < 0.001$ และพบว่า ประเภทสารสกัดชา และระดับความเข้มข้น มีผลต่อค่าเฉลี่ยในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p\text{-value} < 0.001$ ดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 ประเภทสารสกัดชา และระดับความเข้มข้น กับค่าเฉลี่ยในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

แหล่งที่มา	dj	SS	MS	F	p-value
ประเภทสารสกัดชา	1	12431.70	1243.17	1997.39	0.001
ระดับความเข้มข้น	10	66745.17	6674.52	1072.39	0.001
ประเภทสารสกัดชา * ระดับความเข้มข้น	10	1951.55	195.16	31.36	0.001

หมายเหตุ $p\text{-value} \leq 0.05$

จากการเปรียบเทียบความแตกต่างรายคู่ของระดับความเข้มข้นต่อค่าเฉลี่ยการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดจำแนกด้วยวิธี Scheffe พบความแตกต่างกันอย่างน้อย 1 คู่ ของระดับความเข้มข้นต่อค่าเฉลี่ยการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ดังตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 การเปรียบเทียบคู่ของระดับความเข้มข้นที่ให้ค่าเฉลี่ยการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่แตกต่าง

ความเข้มข้น (mg/ml)	สารสกัดชาดำ											
	1.000	0.500	0.250	0.125	0.062	0.031	0.016	0.008	0.004	0.002	0.001	1.000
สารสกัดชาเขียว	1.000							*	*	*	*	1.000
	0.500							*	*	*	*	0.500
	0.250							*	*	*	*	0.250
	0.125							*	*	*	*	0.125
	0.062							*	*	*	*	0.062
	0.031								*	*	*	0.031
	0.016									*	*	0.016
	0.008	*	*	*	*	*						0.008
	0.004	*	*	*	*	*	*					0.004
	0.002	*	*	*	*	*	*	*				0.002
	0.001	*	*	*	*	*	*	*	*			0.001

หมายเหตุ *คือคู่ของระดับความเข้มข้นที่มีค่าเฉลี่ยการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่แตกต่าง $p\text{-value} \leq 0.05$

จากความสัมพันธ์ระหว่างประเภทสารสกัดชา และระดับความเข้มข้นที่มีผลต่อค่าการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่า ที่ทุกระดับความเข้มข้น สารสกัดชาดำมีค่าเฉลี่ยการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงกว่าสารสกัดชาเขียว

บทที่ 5

อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH (% inhibition) ระหว่างสารสกัดชาเขียวและสารสกัดชาดำพบว่า สารสกัดชาดำมีค่าเฉลี่ยการยับยั้งอนุมูลอิสระสูงกว่าสารสกัดชาเขียวเล็กน้อย 74.47% เทียบกับ 71.97% เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระระหว่างสารสกัดชาเขียวและสารสกัดชาดำในระดับความเข้มข้นที่เท่ากัน พบว่า ค่าเฉลี่ยการยับยั้งอนุมูลอิสระระหว่างสารสกัดชาเขียวและสารสกัดชาดำในแต่ละระดับความเข้มข้นที่ 1.000, 0.250, 0.008, 0.004, 0.002 และ 0.001 mg/ml มีความต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) โดยสารสกัดชาเขียวมีฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระสูงกว่าสารสกัดชาดำในระดับความเข้มข้นสูง 1.000 และ 0.250 mg/ml แต่ในระดับความเข้มข้นต่ำลงมา 0.008 – 0.002 mg/ml พบว่าสารสกัดชาดำมีฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระสูงกว่าสารสกัดชาเขียว

อย่างไรก็ตามฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระระหว่างสารสกัดชาเขียวและสารสกัดชาดำในงานวิจัยนี้ แตกต่างจากแนวโน้มที่รายงานไว้ในเอกสารอ้างอิงหลายฉบับ ซึ่งมีรายงานว่าชาเขียวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าชาดำ เช่น งานวิจัยของ Cabrera et al. (2006) ที่เน้นคุณสมบัติของ EGCG ซึ่งมีอยู่มากในชาเขียวและมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่า TF ที่พบในชาดำ อีกทั้งยังพบงานวิจัยของ Pintač et al. (2022) ที่รายงานว่า ชาเขียวจากการ infusion มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าชาดำ แต่พบงานวิจัยของ Leung et al. (2001) และ Zhong et al. (2019) ที่พบว่า ชาเขียวและชาดำจากวิธี infusion มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระที่ใกล้เคียงกัน และจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ทั้งชนิดของสารสกัดและระดับความเข้มข้นมีอิทธิพลร่วมกันต่อประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระ โดยชาเขียวและชาดำแสดงประสิทธิภาพที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับระดับความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบ

จากการศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส พบอิทธิพลร่วมระหว่างประเภทของสารสกัดและระดับความเข้มข้น มีผลต่อค่าเฉลี่ยการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) และพบว่า ค่าเฉลี่ยการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดชาดำมีค่าสูงกว่าสารสกัดชาเขียว 65.74% เทียบกับ 38.29% เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในแต่ละระดับความเข้มข้น พบว่า สารสกัดชาดำมีค่าเฉลี่ยการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงกว่าสารสกัดชาเขียวอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ในทุกระดับความเข้มข้นที่เท่ากัน

ผลการทดลองการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในครั้งนี้นี้ยังสอดคล้องกับผลงานวิจัยของ Young Chul Kim et al. (2015) ที่พบว่า TF ในชาดำสามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีกว่า EGCG

ในชาเขียว และยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Graham (1992) ที่ชี้ว่าความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ มีผลโดยตรงต่อระดับกิจกรรมทางชีวภาพ

จากข้อมูลทั้งหมดนี้สามารถสรุปได้ว่า แม้ผลการทดลองบางส่วนจะไม่สอดคล้องกับงานวิจัย ที่ผ่านมา แต่ก็สามารถอธิบายได้ด้วยองค์ประกอบของสารสกัดที่ใช้ ความเข้มข้น และวิธีการเตรียม ตัวอย่างที่อาจแตกต่างกัน สามารถศึกษาวิจัยเพิ่มเติมเพื่อเปรียบเทียบในเรื่องความเสถียร การดูดซึม และการตอบสนองของผู้ใช้งานผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป งานวิจัยนี้ยังสนับสนุนการใช้สารสกัดจาก ธรรมชาติแทนสารเคมี โดยเฉพาะในกลุ่ม Whitening และ Anti-aging เพื่อช่วยลดการเกิดริ้วรอย และยับยั้งการเกิดเม็ดสีผิวอันเป็นสาเหตุของความหมองคล้ำ การศึกษาวิจัยนี้จึงเป็นประโยชน์ต่อการ นำข้อมูลไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐาน เพื่อศึกษาวิจัยพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่มีประสิทธิภาพ สามารถเลือกใช้ ปริมาณสารสกัดตามระดับความเข้มข้นที่ให้ประสิทธิภาพสูงสุด ทั้งในด้านเครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์ เสริมอาหารตามคุณสมบัติที่โดดเด่นของสารสกัดแต่ละประเภท

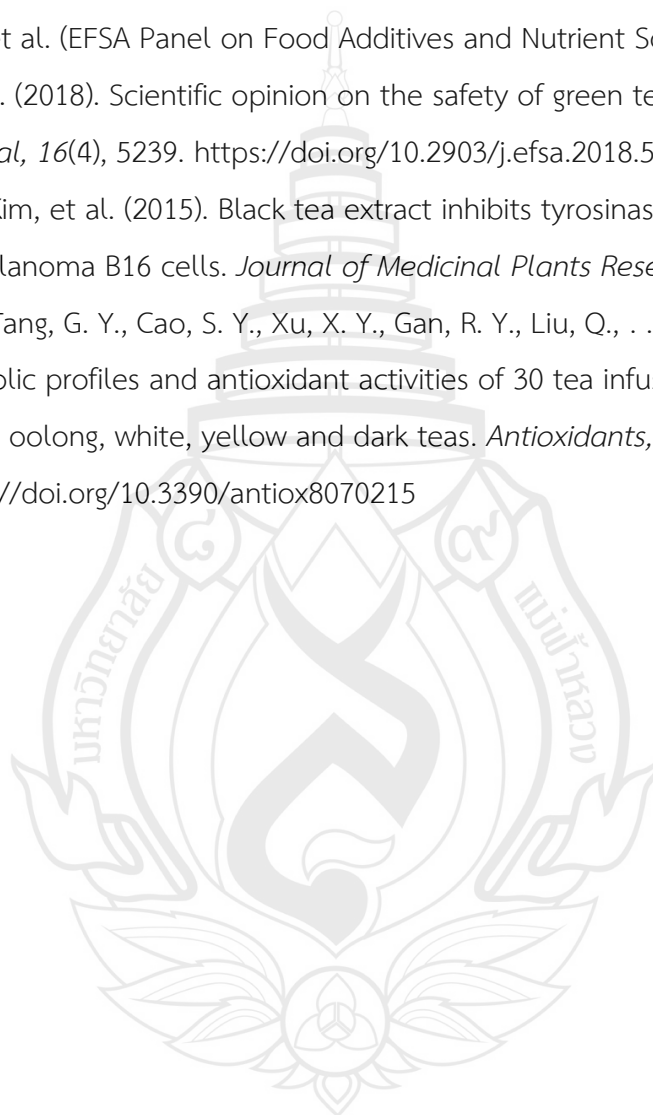


รายการอ้างอิง

- Bancirova, M. (2010). Comparison of the antioxidant capacity and the antimicrobial activity of black and green tea. *Food Research International*, 43(5), 1379–1382. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.04.020>
- Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70–76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Cabrera, C., Artacho, R., & Giménez, R. (2006). Beneficial effects of green tea—a review. *Journal of the American College of Nutrition*, 25(2), 79–99. <https://doi.org/10.1080/07315724.2006.10719518>
- Chang, T. S. (2009). An updated review of tyrosinase inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(6), 2440–2475. <https://doi.org/10.3390/ijms10062440>
- Graham, H. N. (1992). Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *Preventive Medicine*, 21(3), 334–350. [https://doi.org/10.1016/0091-7435\(92\)90041-F](https://doi.org/10.1016/0091-7435(92)90041-F)
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C., & Aruoma, O. I. (1987). The deoxyribose method: A simple “test-tube” assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Analytical Biochemistry*, 165(1), 215–219.
- Khatib, S., Nerya, O., Musa, R., Shmuel, M., Tamir, S., & Vaya, J. (2007). Chalcones as potent tyrosinase inhibitors: The importance of a 2,4-substituted resorcinol moiety. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15(2), 477–485. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2006.08.059>
- Kim, Y. J., & Uyama, H. (2005). Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: Structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62, 1707–1723.
- Kubo, I., Kinst-Hori, I., Chaudhuri, S. K., Kubo, Y., Sanchez, Y., & Ogura, T. (2000). Flavonols from *Houttuynia cordata* as tyrosinase inhibitors. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 64(4), 839–841.

- Larik, F.A., Saeed, A., Channar, P., Muqadar, U., Abbas, Q., Hassan, M., Seo, S.-Y., & Bolte, M. (2017). Design, synthesis, kinetic mechanism and molecular docking studies of novel 1-pentanoyl-3-arylthioureas as inhibitors of mushroom tyrosinase and free radical scavengers. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 141, 132–144. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.09.059>
- Leung, L. K., Su, Y., Chen, R., Zhang, Z., Huang, Y., & Chen, Z. Y. (2001). Theaflavins in black tea and catechins in green tea are equally effective antioxidants. *Journal of Nutrition*, 131(9), 2248–2251. <https://doi.org/10.1093/jn/131.9.2248>
- Liu, Y., Tang, D., Liu, H., Zhang, Y., & Yao, P. (2021). The profile and antioxidant activity of black tea polyphenols in a large set of commercial tea products. *Food Chemistry*, 339, 127923. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127923>
- McKay, D. L., & Blumberg, J. B. (2002). The role of tea in human health: An update. *Journal of the American College of Nutrition*, 21(1), 1–13. <https://doi.org/10.1080/07315724.2002.10719187>
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., & Prior, R. L. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4619–4626. <https://doi.org/10.1021/jf010586o>
- Pintać, D., Vulić, J., & Čanadanović-Brunet, J. (2022). Comparison study between popular brands of coffee, tea and red wine regarding polyphenols content and antioxidant activity. *Molecules*, 27(5), 1421.
- Ranković, B., Mišić, M., Sukdolak, S., & Puškaš, N. D. (2012). Antioxidant and antimicrobial activity of extracts obtained from lichens. *Journal of Food Science and Technology*, 49, 688–695.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9–10), 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Seo, S. Y., Sharma, V. K., & Sharma, N. (2003). Mushroom tyrosinase: Recent prospects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(10), 2837–2853. <https://doi.org/10.1021/jf020826f>

- Solano, F., Briganti, S., Picardo, M., & Ghanem, G. (2006). Hypopigmenting agents: An updated review on biological, chemical and clinical aspects. *Pigment Cell Research*, 19(6), 550–571. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0749.2006.00334.x>
- Stodt, U., & Engelhardt, U. H. (2013). Determination of catechins and theaflavins in tea. *In Tea: Cultivation to consumption* (pp. 296–319). Springer.
- Younes, M., et al. (EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food). (2018). Scientific opinion on the safety of green tea catechins. *EFSA Journal*, 16(4), 5239. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5239>
- Young Chul Kim, et al. (2015). Black tea extract inhibits tyrosinase activity in vitro and in melanoma B16 cells. *Journal of Medicinal Plants Research*, 9(22), 651–656.
- Zhao, C. N., Tang, G. Y., Cao, S. Y., Xu, X. Y., Gan, R. Y., Liu, Q., . . . Li, H. B. (2019). Phenolic profiles and antioxidant activities of 30 tea infusions from green, black, oolong, white, yellow and dark teas. *Antioxidants*, 8(7), 215. <https://doi.org/10.3390/antiox8070215>



ภาคผนวก ก

เอกสาร CERTIFICATE OF ANALYSIS GREEN TEA EXTRACT



BAOJI OASIER NUTRI-TECH CO., LTD

Add: Rm 1102, Building B, No.1 Chuangye Road, Baoji, 721006, China
 Tel: +86-917-3307828 Web: www.oasier.com & www.oasier-nutri.com

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Product Name: Green Tea Extract Origin of Material: China
 Botanical Source: Camellia sinensis (L.) Part Used: Leaf
 Date of Manufacture: Jun. 10th, 2022 Batch Number: OSM20220601
 Date of Expiry: Jun. 09th, 2024 Date of Analysis: Jun. 16th, 2022
 Quantity: 500kg

ANALYSIS	RESULT	SPECIFICATION	Remark
Appearance	Complies	Brown red fine powder	Visual
Odor	Complies	Characteristic	Organoleptic
Taste	Complies	Characteristic	Organoleptic
Assay			
Tea Polyphenols	47.06%	≥45%	UV
Catechins	36.04%	≥35%	HPLC
EGCG	26.01%	≥25%	HPLC
Loss on Drying	3.63%	≤5%	
Ash	<1%	≤5%	
Heavy Metals	Complies	≤20ppm	
As	Complies	≤2ppm	
Pb	Complies	≤3ppm	
Microbiological Test			
Total Plate Count	Complies	≤1000cfu/g	
Yeast & Mold	Complies	≤100cfu/g	
E.Coli	Complies	Negative	
Salmonella	Complies	Negative	

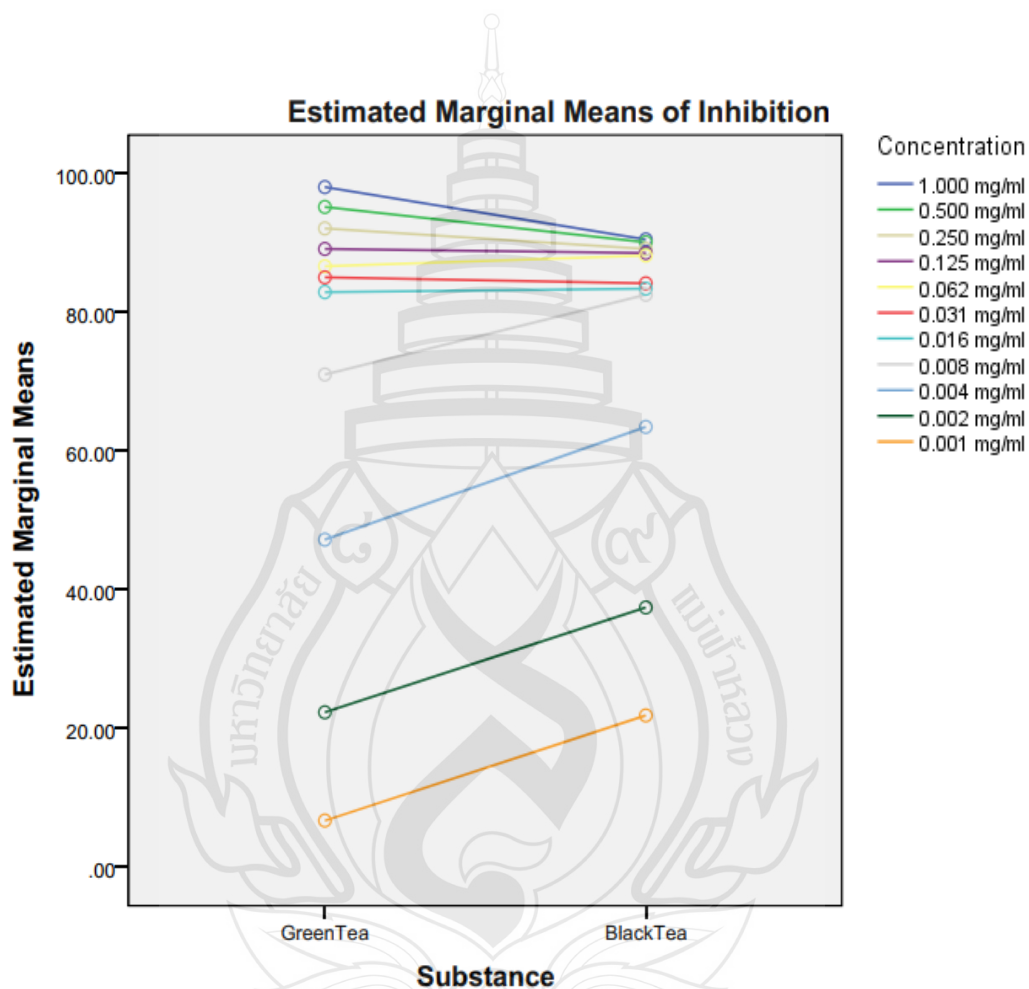
Conclusion: Conform with specification.
 Storage: In cool & dry place. Keep away from strong light and heat.
 Shelf Life: 2 years when properly stored.

Quality Control :

YSK70-11 100401

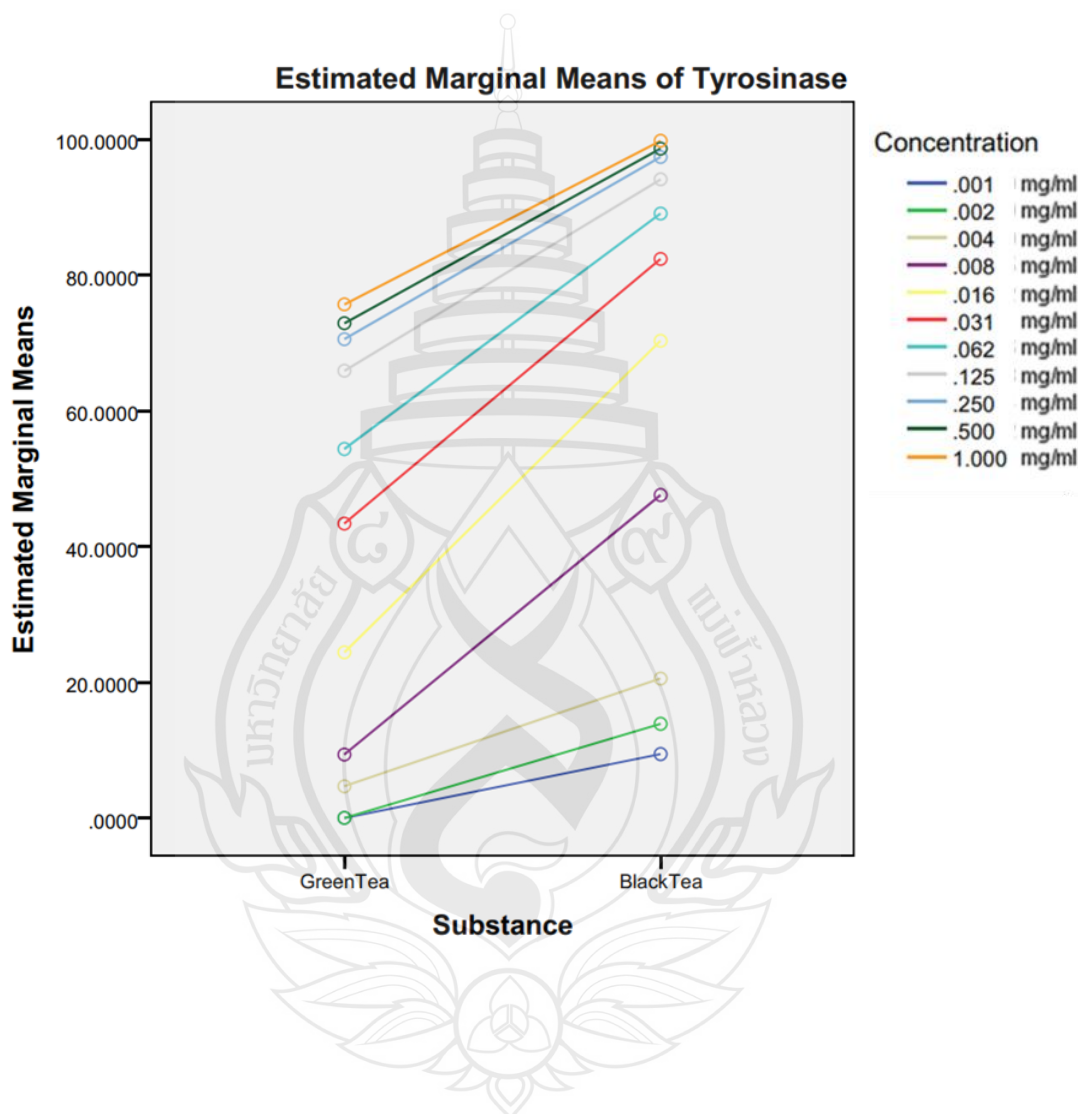
ภาคผนวก ค

กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างประเภทสารสกัดและระดับความเข้มข้นที่มีอิทธิพล
ต่อค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระ



ภาคผนวก ง

กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างประเภทสารสกัดและระดับความเข้มข้นที่มีอิทธิพล
ต่อค่าการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส



ประวัติผู้ประพันธ์

ชื่อ

สุจินต์ ด้านยุทธพลชัย

ประวัติการศึกษา

2547

วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาเคมี

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติการทำงาน

2558 – ปัจจุบัน

ผู้จัดการธุรกิจ

บริษัท วีเอส อินกรีเดียนส์ จำกัด

กรุงเทพมหานคร

