



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ผลของการดื่มชาเป็นระยะเวลาสั้นต่อกระบวนการก่อมะเร็งในสัตว์ทดลอง
In vivo study of the effect of short term tea drinking on carcinogenesis

โดย

ณัฐยา คนชื้อ

นลิน อารียา

ธีรพงษ์ เทพกรณ์

งานวิจัยนี้ได้รับเงินอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2554



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ผลของการดื่มชาเป็นระยะเวลาสั้นต่อกระบวนการก่อมะเร็งในสัตว์ทดลอง
In vivo study of the effect of short term tea drinking on carcinogenesis

โดย

ณัฐยา คนชื้อ
นลิน อารียา
ธีรพงษ์ เทพกรณ์

งานวิจัยนี้ได้รับเงินอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2554

บทสรุปผู้บริหาร

งานวิจัยนี้ต้องการศึกษาผลของชาชนิดต่างๆต่อประโยชน์ต่อสุขภาพ ซึ่งในขั้นต้นแรกเป็นการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของชาแต่ละชนิด ได้แก่ ชาเขียวที่ผลิตจากสายพันธุ์ชาอัสสัม (GTa) และสายพันธุ์ชาอู่หลงเบอร์ 12 (GTo) ชาอู่หลงที่ผลิตจากสายพันธุ์ชาอู่หลงเบอร์ 12 (OTo) ชาดำที่ผลิตจากสายพันธุ์ชาอัสสัม (BTa) และชาที่ไม่ได้ผลิตจาก *camellia sinensis* ได้แก่ ชาตะไคร้ (LGT) ผลการทดลองพบว่าสายพันธุ์และกรรมวิธีการผลิตชามีผลต่อปริมาณสารโพลีฟีนอลทั้งหมดในชา โดยชา GTa มีปริมาณสารโพลีฟีนอลสูงสุด และ GTo, OTo และ BTa มีค่ารองลงมา ส่วนชาตะไคร้มีค่าต่ำที่สุด โดยต่ำกว่าชาอื่นๆถึง 50 เท่า อย่างไรก็ตามปริมาณสารโพลีฟีนอลทั้งหมดเพียงอย่างเดียวไม่สามารถอธิบายความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของชาได้ เนื่องจากผลการทดลองชี้ว่าชนิดและปริมาณสารคาเทชินมีความสัมพันธ์กับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมากกว่า และยังพบว่า ชาอู่หลงและชาเขียวที่ผลิตจากชาสายพันธุ์อู่หลงเบอร์ 12 มีความสามารถในการจับอนุมูลอิสระสูงสุด จากผลการวิเคราะห์ปริมาณสารคาเทชินในชาทั้งสองชนิดนี้ แสดงให้เห็นว่าสารคาเทชินชนิด GC, GCG, EGC และ EGCG เป็นสารคาเทชินกลุ่มที่มีประสิทธิภาพสูงกว่าคาเทชินชนิดอื่นที่พบในชาสายพันธุ์อัสสัมที่มีปริมาณคาเทชินแตกต่างกันแม้จะผลิตด้วยกระบวนการเดียวกัน นอกจากนี้แม้ว่าชาตะไคร้จะไม่มีคาเทชินเป็นองค์ประกอบ แต่กลับมีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระใกล้เคียงกัน ดังนั้นคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของชาตะไคร้จึงน่าจะมาจากสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่แตกต่างกับชาทั่วไป เช่น สาร citral

เพื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งกระบวนการก่อกลายพันธุ์ หนูแต่ละกลุ่มจะได้รับน้ำชาแตกต่างกัน 5 ชนิด ที่ความเข้มข้น 2 ระดับ ได้แก่ 1.11 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน เทียบเท่าการดื่มชาโดยเฉลี่ยของคนอังกฤษ และ 1.11 กรัมต่อกิโลกรัมต่อวันเพื่อเป็นตัวแทนการกินเป็นสารเสริมเป็นเวลา 1 วัน จากนั้นเก็บตัวอย่างตับจากหนูเพื่อนำมาวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดสารพิษออกจากร่างกาย ได้แก่ เอนไซม์ Phase I (CYP1A1 และ CYP1A2) และเอนไซม์ Phase II (GST และ NQO1) ผลการทดลองพบว่า ชาที่ผลิตจากกระบวนการที่แตกต่างกันทั้งชาเขียว ชาอู่หลงและชาดำ ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Phase I และส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ Phase II ได้ใกล้เคียงกัน หมายความว่าช่วยลดการเกิดสารที่มีความไวต่อปฏิกิริยาสูง (เนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ Phase I) และส่งเสริมการขับสารออกจากร่างกาย (เนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ Phase II) และส่งผลให้ลดการทำลาย DNA

ได้เป็นอย่างดี และสายพันธุ์ชาทั้งชาพันธุ์อัสสัมและชาอุหลงเบอร์ 17 และชาตะไคร้ก็ให้ผลไม่แตกต่างกัน ซึ่งในชาตะไคร้นั้นอาจเกิดจากสารสำคัญชนิด citral ที่พบมากในตะไคร้ ส่วนชาค่านั้นสารสำคัญยับยั้งการก่อกลายพันธุ์น่าจะเกิดจาก caffeine ที่พบในปริมาณสูงกว่าชาเขียวและชาอุหลงอย่างมาก ดังนั้นการทดลองนี้จึงสามารถสรุปได้ว่าการดื่มชาทั้ง 5 ชนิดสามารถช่วยยับยั้งการก่อมะเร็งได้ ด้วยกลไกการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ phase I และส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ phase II โดยประสิทธิภาพของชาเกิดขึ้นได้เมื่อดื่มชาเพียงระยะสั้น (1 วัน) ซึ่งหมายความว่าชาช่วยยับยั้งการก่อมะเร็งเมื่อรับประทานร่วมกับอาหารที่มีสารก่อมะเร็ง เช่น อาหารปิ้งย่าง แม้จะในปริมาณต่ำเทียบเท่ากับการดื่มชาของคนทั่วไปในแต่ละวัน และกรรมวิธีการผลิตชารวมทั้งสายพันธุ์ชาไม่มีผลต่อสมบัติดังกล่าวแต่อย่างใด



บทคัดย่อ

การทดลองนี้ต้องการศึกษาความสามารถของชา 5 ชนิด ได้แก่ ชาเขียวที่ผลิตจากสายพันธุ์ชาอัสสัม (GTa) และสายพันธุ์ชาอู่หลงเบอร์ 12 (GT_o) ชาอู่หลงที่ผลิตจากสายพันธุ์ชาอู่หลงเบอร์ 12 (OT_o) ชาดำที่ผลิตจากสายพันธุ์ชาอัสสัม (BTa) และชาตะไคร้ (LGT) ต่อความสามารถในการยับยั้งการก่อมะเร็งในหนูทดลอง เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของชาทั้ง 5 ชนิด พบว่า GTa มีปริมาณสารโพลีฟีนอลสูงที่สุด (24.25 g/100g) ในขณะที่ชา GT_o, OT_o และ BTa มีค่ารองลงมา (13.74-15.30 g/100g) ส่วนชาตะไคร้ นั้นมีปริมาณสารโพลีฟีนอลต่ำมาก (0.59 g/100g) แต่กลับพบว่าความสามารถในการจับอนุมูลอิสระเมื่อวัดด้วย DPPH assay ของชาทั้ง 5 ชนิด มีความแตกต่างกันไม่มากนัก โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 219.991-323.524 mmol/100g ทั้งนี้เมื่อวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารคาเทชินในชาด้วยเครื่อง HPLC ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าสารคาเทชิน ชนิด GC, GCG, EGC และ EGCG เป็นสารคาเทชินกลุ่มที่มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าคาเทชินชนิดอื่น และเมื่อหนูทดลองได้รับชาที่ความเข้มข้น 2 ระดับ ได้แก่ 111 หรือ 1,111 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน เป็นเวลา 1 วัน พบว่าเมื่อรับประทานชาในระดับต่ำ จะทำให้เกิดกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ CYP1A1 และ CYP1A2 ลดต่ำลง ในขณะที่เอนไซม์ GST และ NQO1 มีค่าสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งหมายความว่าชาทุกชนิดมีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเมตาบอลิซึมสารพิษและกำจัดออกจากร่างกายได้เป็นอย่างดี แม้จะรับประทานในระดับต่ำเทียบเท่ากับการดื่มชาโดยทั่วไปและในระยะเวลาสั้นเพียง 1 วัน ส่วนการรับประทานชาในปริมาณสูงพบว่า ชาทุกชนิดจะทำให้ CYP1A2 ลดลงและ GST สูงขึ้น ส่วน NQO1 มีค่าสูงขึ้นเมื่อดื่มชาเขียวเท่านั้น ส่วนชาดำและชาตะไคร้กลับทำให้การทำงานของ NQO1 ลดลง จึงอาจกล่าวได้ว่าการรับประทานชาในปริมาณสูงมากๆ จะส่งผลทำให้การยับยั้งการก่อมะเร็งลดลงในชาบางชนิด ซึ่งอาจเกิดจากความเป็นพิษของสารบางตัวที่อยู่ในชาชนิดนั้นๆ ซึ่งควรต้องมีการศึกษาต่อไป

Abstract

The current study was aimed to investigate, in 5 different types of tea namely green tea from Assam tea (GTa), green tea from Oolong No.12 (GTo), oolong tea from Oolong No. 12, black tea from Assam tea (BTa) and lemongrass tea (LGT), for their ability to inhibit carcinogenesis. Chemical composition analysis showed that GTa contained the highest amount of total polyphenol content (24.25 g/100g) whereas that in GTo, OTo and BTa was in a second order (13.74-15.30 g/100g) and LGT depicted the lowest value being 0.59 g/100g. However, even though DPPH values of all samples were significantly different but the degree of alteration was minute (219.991-323.524 mmol/100g). HPLC analysis illustrated type and amount of each catechin in tea samples. The results demonstrated that GC, GCG, EGC and EGCG were responsible for antioxidant capacity of tea compared to other type of catechins. *In vivo* study was conducted where each group of rat received different type of tea extract at 2 different doses (111 or 1,111 mg/kg/day) for 1 day. At low dose consumption, hepatic CYP1A1 and CYP1A2 activities decreased whereas GST and NQO1 activities increased in all samples when compared with the control group. These results infer that tea samples could enhance xenobiotic metabolism and excretion at the dose as low as daily tea consumption level and at a short period of time for only 1 day. However, high dose administration of all types of tea led to reduction in CYP1A2 and induction of GST activities. NQO1 activity was enhanced only when green tea was given (GTa and GTo) whereas black tea and lemon grass tea inhibited NQO1 activity. It can be said that prevention of carcinogenesis in some teas can be diminished at high dose consumption which believed to be due to toxicity of some chemical components in tea. The actually chemical compounds that are responsible for this findings needed to be further studied.

สารบัญ

	หน้า
บทสรุปผู้บริหาร	1
บทคัดย่อ	3
Abstract	4
สารบัญ	5
สารบัญตาราง	6
สารบัญภาพ	7
บทที่ 1 บทนำ	10
1.1 หลักการและเหตุผล	9
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	9
1.3 ความสำคัญของการวิจัย	10
1.4 ขอบเขตของโครงการวิจัย	10
บทที่ 2 แนวคิด ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	11
2.1 กระบวนการก่อมะเร็ง	11
2.2 ชา	12
บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย	16
3.1 การวิเคราะห์ปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดและชนิดและปริมาณคาเทชินในตัวอย่างชา	16
3.2 การศึกษาความสามารถในการเปลี่ยนแปลงฤทธิ์ของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการก่อมะเร็ง	17
บทที่ 4 ผลการวิจัย	20
4.1 การวิเคราะห์ปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด และความสามารถในการจับอนุมูลอิสระของชาแต่ละชนิด	20
4.2 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณคาเทชินในตัวอย่างชา	21
4.3 การศึกษาความสามารถในการเปลี่ยนแปลงฤทธิ์ของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการก่อมะเร็ง	24
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	35
เอกสารอ้างอิง	35
ภาคผนวก ก.	39
ประวัตินักวิจัย	45

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 4-1 ปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดในตัวอย่างใบชาอบแห้ง	20
ตารางที่ 4-2 ความสามารถในการจับอนุมูลอิสระของตัวอย่างชาด้วยวิธี DPPH Radical Scavenging Activity	21
ตารางที่ 4-3 ปริมาณคาเทชินในตัวอย่างชาเมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC	22
ตารางที่ 4-4 แสดงกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ phase I และ phase II ในตับหนูที่ ได้รับชาชนิดต่างเป็นระยะเวลา 1 วัน	24



สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 4-1 หนู Wistar albino เพศผู้ น้ำหนักเริ่มต้น 200 ± 20 กรัม ก) การให้น้ำชา ข)	23
ภาพที่ 4-2 ภาพแสดง S9 (a) S9 ภายหลังการปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกชั้นของ microsomes และ cytosol (b) microsomes (c) และ cytosol (d)	23
ภาพที่ 4-3 กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ CYP1A1 ในตับหนู Wistar Albino เพศผู้ที่ ได้รับน้ำชาสกัดชนิดต่างๆ	25
ภาพที่ 4-4 กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ CYP1A2 ในตับหนู Wistar Albino เพศผู้ที่ ได้รับน้ำชาสกัดชนิดต่างๆ	26
ภาพที่ 4-5 กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ GST ในตับหนู Wistar Albino เพศผู้ที่ได้รับ น้ำชาสกัดชนิดต่างๆ	27
ภาพที่ 4-6 กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ NQO1 ในตับหนู Wistar Albino เพศผู้ที่ ได้รับน้ำชาสกัดชนิดต่างๆ	28
ภาพที่ ก-1 แสดงโครมาโตแกรมของคาเทชินในชาเขียวที่ผลิตจากชาสายพันธุ์อัสสัม	39
ภาพที่ ก-2 แสดงโครมาโตแกรมของคาเทชินในชาดำที่ผลิตจากชาสายพันธุ์อัสสัม	39
ภาพที่ ก-3 แสดงโครมาโตแกรมของคาเทชินในชาเขียวที่ผลิตจากชาสายพันธุ์อู่หลงเบอร์ 12	39
ภาพที่ ก-4 แสดงโครมาโตแกรมของคาเทชินในชาอู่หลงที่ผลิตจากชาสายพันธุ์อู่หลง เบอร์ 12	40
ภาพที่ ก-5 แสดงโครมาโตแกรมของคาเทชินในชาตะไคร้	40
ภาพที่ ก-6 กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการคำนวณปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดของตัวอย่างชา แต่ละชนิด	40
ภาพที่ ก-7 กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการคำนวณความสามารถในการจับอนุมูลอิสระของ ตัวอย่างชาแต่ละชนิด	41
ภาพที่ ก-8 กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการคำนวณปริมาณสาร (-) Gallocatechin ในตัวอย่าง ชาแต่ละ	41
ภาพที่ ก-9 กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการคำนวณปริมาณสาร (-)-Epigallocatechin ใน ตัวอย่างชาแต่ละชนิด	41

	หน้า
ภาพที่ ก-10 กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการคำนวณปริมาณสาร (+)-Catechin ในตัวอย่างชาแต่ละชนิด	42
ภาพที่ ก-11 กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการคำนวณปริมาณสาร (-)-Epicatechin ในตัวอย่างชาแต่ละชนิด	42
ภาพที่ ก-12 กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการคำนวณปริมาณสาร (-)-Epigallocatechin gallate ในตัวอย่างชาแต่ละชนิด	42
ภาพที่ ก-13 กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการคำนวณปริมาณสาร Caffeine ในตัวอย่างชาแต่ละชนิด	43
ภาพที่ ก-14 กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการคำนวณปริมาณสาร (-)-Epicatechin gallate ในตัวอย่างชาแต่ละชนิด	43
ภาพที่ ก-15 กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการคำนวณปริมาณสาร (-)-Catechin gallate ในตัวอย่างชาแต่ละชนิด	43



บทที่ 1

บทนำ

1.1 หลักการและเหตุผล

ชาจัดว่าเป็นเครื่องดื่มที่ได้รับความนิยมมากที่สุดในโลก (Macfarlane and Macfarlane, 2004) และเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญทางภาคเหนือของประเทศไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในจังหวัดเชียงราย ซึ่งมีพื้นที่ปลูกมากเป็นอันดับหนึ่งของประเทศ ในปี พ.ศ. 2553 นี้ไทยได้มีการเปิดเขตการค้าเสรีอาเซียน (AFTA) และยกเลิกภาษีนำเข้าชาใบและผลิตภัณฑ์ชา (ศูนย์วิจัยกสิกรไทย, 2552) การนำเข้าชาจากประเทศเวียดนามและอินโดนีเซีย ซึ่งเป็นแหล่งผลิตรายใหญ่ของโลกและมีต้นทุนการผลิตที่ต่ำกว่าประเทศไทยอาจมีมากขึ้น ดังนั้นการเตรียมความพร้อมเพื่อการแข่งขันจึงต้องมีสูงขึ้นเป็นลำดับ นอกเหนือจากการพัฒนาคุณภาพชาด้านประสาทสัมผัสแล้ว คุณประโยชน์ของชาต่อสุขภาพก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่ผู้บริโภคให้ความสำคัญ

แม้ว่าประโยชน์ของชาต่อสุขภาพจะมีรายงานอย่างกว้างขวาง แต่งานวิจัยโดยส่วนใหญ่เป็นการศึกษาสารสำคัญเดี่ยวๆ ที่สกัดจากชา จึงมีความเป็นไปได้ว่าน้ำชาซึ่งมีส่วนประกอบของสารหลากหลายชนิดอาจให้ผลที่แตกต่างกันต่อสุขภาพ นอกจากนี้การทดลองที่รายงานไว้มักเป็นการทดสอบในหลอดทดลอง ทำให้ไม่น่าแปลกใจว่าผลการวิจัยทางระบาดวิทยา ยังมีรายงานที่ไม่สอดคล้องกันเกี่ยวกับประโยชน์ของการดื่มชาต่อสุขภาพ กล่าวคือ มีทั้งที่พบและไม่พบว่าการดื่มชา มีประโยชน์ต่อการต่อต้านการเกิดโรค ดังนั้นการทดสอบในสัตว์ทดลองที่มีโครงสร้างทางสรีรวิทยาล้ำคนจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง นอกจากนี้สาเหตุสำคัญที่ทำให้ผลการวิจัยขัดแย้งกันนี้อาจเนื่องมาจากการที่ชามีหลากหลายชนิด และมีสารสำคัญต่อสุขภาพเป็นองค์ประกอบที่แตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับกระบวนการผลิตและสายพันธุ์ชาที่ใช้ การวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสำคัญต่างๆ ในชาเหล่านี้ ร่วมกับการศึกษาผลของมันต่อการต่อต้านกระบวนการก่อมะเร็งจะช่วยให้สามารถอธิบายประโยชน์ของชาและกลไกได้ชัดเจนยิ่งขึ้น

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. วิเคราะห์ชนิดและปริมาณของคาเทชินและปริมาณ โพลีฟีนอลทั้งหมดในตัวอย่างชาที่ผลิตจากสายพันธุ์ชาและกระบวนการที่แตกต่างกัน
2. ศึกษาและเปรียบเทียบผลของชาที่ผลิตด้วยกระบวนการแตกต่างกันต่อการเปลี่ยนแปลงฤทธิ์การก่อกลายพันธุ์ของสารก่อมะเร็งที่พบในอาหาร ในหนูทดลอง
3. ศึกษาและเปรียบเทียบผลของชาที่ผลิตจากชาต่างสายพันธุ์ในจังหวัดเชียงราย รวมถึงชาที่ไม่ได้ผลิตจากใบชาต่อการเปลี่ยนแปลงฤทธิ์การก่อกลายพันธุ์ของสารก่อมะเร็งที่พบในอาหาร ในหนูทดลอง

1.3 ความสำคัญของการวิจัย

จากผลการวิจัยคาดว่าจะสามารถทราบผลของการดื่มชาต่อการเปลี่ยนแปลงฤทธิ์การก่อกลายพันธุ์ของสารก่อมะเร็ง ในสัตว์ทดลองที่ได้รับน้ำชาที่ระดับความเข้มข้นเทียบเท่ากับการดื่มชาของคนทั่วไป หรือระดับสูงเทียบเท่ากับการกินเป็นสารอาหารเสริม (Supplementation) ชนิดชาเขียว ชาอู่หลง และชาดำ ที่ผลิตจากชาสายพันธุ์หลักๆ ในประเทศไทย เปรียบเทียบกับชาสมุนไพรรไทยชนิดที่มีรายงานว่ามีความสามารถในการเปลี่ยนแปลงเอนไซม์ในตับที่ทำหน้าที่เปลี่ยนแปลงสารเคมีในร่างกาย ได้แก่ ชาตะไคร้ และสามารถนำผลการวิจัยข้างต้นเป็นข้อมูลพื้นฐานในการให้ข้อเสนอแนะการดื่มชาเพื่อสุขภาพแก่ประชาชนต่อไป

1.4 ขอบเขตของโครงการวิจัย

ศึกษาความเป็นไปได้ในการจัดวางการก่อมะเร็งของชา ผ่านกลไกการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดสารพิษออกจากร่างกาย (phase I และ phase II) โดยชาตัวอย่างผลิตด้วยกระบวนการที่แตกต่างกัน ได้แก่ ชาเขียว ชาอู่หลงและชาดำ และผลิตด้วยใบชาต่างสายพันธุ์ในจังหวัดเชียงราย ได้แก่ พันธุ์อัสสัมและอู่หลงบอร์ 12 รวมทั้งชาสมุนไพรรไทยที่ไม่ได้ผลิตจากใบชา ได้แก่ ชาตะไคร้ ทั้งนี้เป็นการทดสอบในระดับสัตว์ทดลอง โดยให้สัตว์ดื่มชาเป็นเวลาสั้น (1 วัน) และเก็บตัวอย่างตับจากสัตว์มาวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ต่างๆดังกล่าวข้างต้น

บทที่ 2

แนวคิด ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 กระบวนการก่อมะเร็ง (Carcinogenesis)

กระบวนการก่อมะเร็งส่วนใหญ่เกิดขึ้นจากการเหนี่ยวนำด้วยสารเคมีที่ร่างกายได้รับ แหล่งของสารเคมีเหล่านี้มาจากการปนเปื้อนจากสิ่งแวดล้อม หรือการบริโภคเข้าไปในรูปของอาหารหรือยา กระบวนการก่อมะเร็งเป็นการเปลี่ยนแปลงที่มีความซับซ้อนมาก สามารถแบ่งออกได้ 3 ระยะ ได้แก่ ระยะเริ่มก่อตัว (Initiation) ระยะส่งเสริม (Promotion) และระยะก้าวหน้า (Progression) แต่ละระยะมีการเปลี่ยนแปลงที่แตกต่างกัน ในระยะเริ่มก่อตัว สารก่อมะเร็งที่ไม่มีฤทธิ์ (procarcinogen) มักถูกเปลี่ยนแปลงโดยเอนไซม์ในกลุ่มที่เรียกว่า Biotransformation enzymes ซึ่งแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ เอนไซม์ Phase I และ Phase II โดย เอนไซม์ Phase I เช่น cytochrome P450 (CYP450) ทำหน้าที่เปลี่ยน procarcinogen ให้อยู่ในรูปที่ว่องไวต่อปฏิกิริยา (reactive metabolite) ทำให้สามารถทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลในเซลล์ เช่น DNA ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดมะเร็ง อย่างไรก็ตามร่างกายมีกลไกการกำจัดสาร reactive metabolites เหล่านี้โดยปฏิกิริยาการเติมหมู่ฟังก์ชันนอลที่เร่งด้วย Phase II เอนไซม์ เพื่อเพิ่มความสามารถของการละลายน้ำของสารเหล่านี้และง่ายต่อการขับออกจากร่างกาย (Gsteiger and Morgenthaler, 2008) ซึ่งหากความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ทั้งสองกลุ่มไม่มีความสมดุลกัน เช่น ปฏิกิริยาของ Phase I เอนไซม์สูงกว่า Phase II เอนไซม์มากๆ สารเคมีที่มีความว่องไวเหล่านี้จะทำอันตรายต่อโปรตีนหรือ DNA แทนที่จะถูกขับออกจากร่างกายและนำไปสู่การเกิดมะเร็งในระยะก่อตัว จึงอาจกล่าวได้ว่าสารใดก็ตามที่มีคุณสมบัติส่งเสริมความสามารถในการทำงานของ Phase II เอนไซม์ และ/หรือ ยับยั้งการทำงานของ Phase I เอนไซม์ ถือว่าสารที่มีความสามารถในการเปลี่ยนแปลงฤทธิ์การก่อมะเร็งของสารก่อมะเร็งได้

เอนไซม์ cytochrome P450 (P450) หรือ Phase I เช่น CYP1A1, CYP1A2, CYP3A4 และ CYP2E1 ถูกค้นพบประมาณเมื่อ 50 กว่าปีที่แล้ว เป็นกลุ่มเอนไซม์ขนาดใหญ่ที่มีเหล็กเป็นองค์ประกอบภายใน โมเลกุล (heme-containing protein) สามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น แบคทีเรีย รา พืชและสัตว์ ในมนุษย์นั้นปัจจุบันพบว่ามียีน 57 ไอโซฟอร์ม (isoform) จาก 18 แฟมิลี (family) และ 43 แฟมิลีย่อย (subfamily) เอนไซม์ P450 มีบทบาทสำคัญหลายประการ เช่น เร่ง

กระบวนการสังเคราะห์และสลาย (biosynthesis and catalysis pathways) ของสารภายในร่างกาย (endogenous compounds) เช่น cholesterol, steroid hormones, bile acids, vitamins และ arachidonic acid และยังเกี่ยวข้องกับการเมตาบอลิซึม (metabolism) ของสารแปลกปลอมภายนอกในร่างกาย (exogenous compounds หรือ xenobiotics) เช่น ยา วัคซีน และสารก่อมะเร็ง ที่อาจพบปนเปื้อนในอาหารหรือสิ่งแวดล้อม โดยเอนไซม์ 450 ส่วนใหญ่พบในตับ แต่ก็สามารถพบได้ในอวัยวะอื่นๆ เช่นกัน เช่น ปอด ตับ ไต ลำไส้และเต้านม ส่วน Phase II จะเป็นกระบวนการสังเคราะห์การรวมตัวของสารกับ glucuronic acid และ sulfate, acetyl เป็นต้น เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับ conjugation phase ส่วนใหญ่จะอยู่ที่ cytosol ของตับ เช่น glutathione S-transferase (GST) และ quinone reductase (NQO1)

อาหารมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์เหล่านี้ อาทิ อาหารที่ประกอบด้วยสารที่มีฤทธิ์ยับยั้ง cytochrome P450 และส่งเสริมการทำงานของ phase II เช่น bioflavonoids ใน grape fruit juice สาร isothiocyanate ในผักตระกูลกะหล่ำ และ resveratrol ในองุ่น เป็นต้น ดังนั้นอาหารเหล่านี้จึงมีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งได้

2.2 ชา

ชาเป็นพืชกึ่งร้อน เจริญเติบโตได้ดีในพื้นที่สูง และอุ่นชื้น จังหวัดเชียงรายจึงเป็นแหล่งปลูกชาที่สำคัญอันดับหนึ่งของประเทศไทย (สำนักงานเกษตรจังหวัดเชียงราย, 2553) ซึ่งปัจจุบันผลิตชาอยู่ 3 ประเภท ได้แก่ ชาเขียว (ชาไม่หมัก) ชาอู่หลง (ชากึ่งหมัก) และชาดำ (ชาหมัก) องค์ประกอบที่สำคัญต่อสุขภาพที่พบในชาได้แก่สารโพลีฟีนอล ซึ่งพบว่ามีปริมาณสูงถึง 30-42% น้ำหนักแห้ง และส่วนใหญ่เป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) ที่พบมากถึง 60-70% ของโพลีฟีนอลทั้งหมด ได้แก่ กลุ่มของคาเทชิน (Catechin) เป็นสารไม่มีสี ละลายน้ำ มีรสขมและฝาด ได้แก่ (-)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG), (-)-Epigallocatechin (EGC), (-)-Epicatechin-3-gallate (ECG) และ (-)-Epicatechin (EC) สารกลุ่มนี้พบมากถึงร้อยละ 90 ของปริมาณคาเทชินทั้งหมด รองลงมาได้แก่ (-)-Gallocatechin (GC), (+)-catechin (C), (-)-Gallocatechin gallate (GCG) และ (-)-Catechin gallate (CG) คุณสมบัติการเป็นยาเคมีป้องกันมะเร็ง (Cancer chemoprevention) ของชาขึ้นอยู่กับกระบวนการผลิตเพราะมีผลต่อชนิดและปริมาณของสารโพลีฟีนอล ในการผลิตชาเขียว ใบชาสดจะถูกนำมาคั่วหรือหนึ่งทันทีเพื่อทำลายเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ออกซิไดซ์โพลีฟีนอล การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสนี้ส่งผลให้ชาเขียวยังคงมีปริมาณสารในกลุ่มคาเทชินสูง

เมื่อเปรียบเทียบกับชากิ่งหมัก (ชาอุ๋หลง) และชาหมัก (ชาดำ) ตามลำดับ ในจำนวน คาเทชินที่พบในชามีรายงานว่า สารที่ประสิทธิภาพสูงสุดในการต่อต้านกระบวนการก่อมะเร็งได้แก่ EGCG > ECG > EGC > EC (Paschka และคณะ, 1998; Uesato และคณะ, 2000 ; Ravindranath และคณะ, 2006) ขั้นตอนการหมักในกระบวนการผลิตชาดำจะเกิดออกซิเดชันของสารคาเทชินและทำให้เกิดสารประกอบใหม่จำพวกควิโนนที่สามารถเกิดปฏิกิริยาทางเคมีต่อไปและเกิดสารจำพวก theaflavins theasinensins และ thearubigins (Robertson, 1992) สารเหล่านี้เองที่ทำให้ชาดำมีสี กลิ่นและรสแตกต่างไปจากชาเขียว

นอกจากกระบวนการผลิตแล้วพันธุ์ชาที่ใช้ก็เป็นปัจจัยสำคัญในการกำหนดชนิดและปริมาณของสารโพลีฟีนอลในผลิตภัณฑ์ จากการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของสารโพลีฟีนอลในใบชาสดในจังหวัดเชียงราย พบว่าชาพันธุ์อัสสัมมีปริมาณ EGC สูงที่สุด ส่วนชาพันธุ์อุ๋หลงเบอร์ 12 และ 17 มี EGCG สูงสุด (ธีรพงษ์, 2550) และผลการสำรวจการผลิตชาเขียวในประเทศไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่งจังหวัดเชียงรายพบว่านิยมใช้ชาสองสายพันธุ์ได้แก่ อัสสัมและอุ๋หลงเบอร์ 12 ทำให้สารสำคัญในชาเขียวทั้งสองชนิดมีความแตกต่างกันไปและมีความเป็นไปได้ที่ชาเขียวทั้งสองจะมีคุณสมบัติแตกต่างกัน นอกจากนี้แม้จะมีรายงานว่า EGCG ในชาพันธุ์อุ๋หลงมีประโยชน์ในการต่อต้านมะเร็งสูงสุดเมื่อเทียบกับโพลีฟีนอลชนิดอื่น (Ravindranath และคณะ, 2006; Galati และคณะ, 2006) แต่สารโพลีฟีนอลที่พบในชาดำก็มีคุณสมบัติสามารถต่อต้านมะเร็งลำไส้ (Hong และคณะ 2001 ; Weisburger และคณะ, 1998) ผิวหนัง (Lu และคณะ, 1997) และปอด (Yang และคณะ, 1997) เป็นต้น นอกจากนี้ยังขัดขวางการสร้างหลอดเลือดฝอย (Angiogenesis) และขบวนการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (Lu และคณะ, 2000) ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบกับ EGC และ EGCG ที่พบในชาเขียว พบว่าสามารถยับยั้ง มะเร็งปอด (Liang และคณะ, 1999) และการเกิดออกซิเดชันของไขมัน LDL (Rietveld และ Wiseman, 2003) ได้เท่าเทียมกัน แต่มีประสิทธิภาพเหนือกว่าในการต่อต้านการเติบโตของเซลล์มะเร็งผิวหนังในคน (Lu และคณะ, 1997) จึงเห็นได้ว่าผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของโพลีฟีนอลในชาเขียวและชาดำยังมีความขัดแย้ง และยังชี้ให้เห็นว่ามีปัจจัยอื่นที่อาจมีความสำคัญต่อความสามารถในการต่อต้านมะเร็งของสารเหล่านี้ อย่างไรก็ตามผลทดลองเหล่านี้ไม่สามารถเปรียบเทียบคุณสมบัติที่แท้จริงของชาประเภทต่างๆ ได้ เพราะเป็นการทดลองในระดับหลอดทดลอง และการที่เครื่องดื่มชาประกอบด้วยสารโพลีฟีนอลหลายหลายชนิดอาจเป็นไปได้ว่าการบริโภคชาที่ประกอบด้วยสารหลากหลายชนิดอาจมีผลแตกต่างจากผลของสารโพลีฟีนอลเดี่ยวๆ

ทั้งโพลีฟีนอลและอนุพันธ์เป็นสารออกฤทธิ์ต่อสุขภาพ โดยสามารถต่อต้านออกซิเดชันโดยตรง เพราะสามารถจับกับอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกาย และยังทำหน้าที่เป็นสารต่อต้านออกซิเดชัน โดยทางอ้อม เช่น การยับยั้ง Redox-sensitive transcription factors, Nuclear factor-KB และ Activator protein-1 ยับยั้งเอนไซม์ประเภทที่ก่อให้เกิดปฏิกิริยา ออกซิเดชันในร่างกาย เช่น Phase I เอนไซม์, Nitric oxide synthase, Lipoxigenase และ Cyclooxygenase เร่งการสร้าง Phase II เอนไซม์ที่มีหน้าที่ในการหยุดการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยเป็นตัวเร่งให้เกิดการเติมหมู่ฟังก์ชัน นอลให้แก่สารอนุมูลอิสระ เช่น Glutathione-S transferase และ Superoxide dismutases (Balz and Higdon, 2003) นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบผลของการเลี้ยงหนูทดลองด้วยชาสกัดชนิดต่างๆต่อ Phase I เอนไซม์ พบว่าชาดำมีผลเร่ง CYP1A1 เอนไซม์สูงกว่าชาเขียวและชาอู่หลง (Niwattisaiwong และคณะ, 2004) ส่วนในชา peppermint, chamomile และ dandelion พบว่า ความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ CYP1A2 และ CYP2E ลดลง ในขณะที่ความสามารถในการทำงานของ Phase II เอนไซม์ กลับเพิ่มสูงขึ้นอย่างมาก (Maliakol และคณะ, 2001) สำหรับชาสมุนไพรของไทยมีรายงานว่าชาตะไคร้ซึ่งมีสาร isointermedeol มีความสามารถเร่งการทำงานของ Phase I และ Phase II เอนไซม์ (Thumvijit, 1999) เป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งที่ชาทั้งชนิดที่ผลิตจากใบชาและชาสมุนไพรสามารถเปลี่ยนแปลงเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงสารเคมีในร่างกาย จึงมีความเป็นไปได้สูงที่ชาจะสามารถขัดขวางการก่อมะเร็งในระยะก่อตัวได้

ในการทดสอบในหลอดทดลองพบว่าคุณสมบัติของชาต่อสุขภาพขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณของสารโพลีฟีนอล ซึ่งมีความแตกต่างกันไปตามกระบวนการผลิต โดยชนิดของสารโพลีฟีนอลที่พบในชาเขียว (ชาไม่หมัก) พบว่ามีประสิทธิภาพสูงกว่าชาอู่หลง (ชากึ่งหมัก) และชาดำ (ชาหมัก) ตามลำดับ อย่างไรก็ตามการที่สารโพลีฟีนอลถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือด (bioavailability) ต่ำ (Lambert และคณะ, 2003; Chen และคณะ, 1997) และมีความคงตัวในสภาวะที่ค่อนข้างเป็นกรด (pH 5) (Chen และคณะ, 2001) จึงอาจเป็นไปได้ว่าประสิทธิภาพของชาจากการดื่มเข้าไปในร่างกาย อาจลดลง นอกจากกระบวนการผลิตแล้ว ชนิดและปริมาณโพลีฟีนอลในผลิตภัณฑ์ชายังแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ชาที่ใช้ในการผลิต และในตลาดชาของประเทศไทยยังมีชาสมุนไพร (Herbal tea) ที่ไม่ได้ผลิตจากใบชาหรือเป็นชาที่ไม่มีสารโพลีฟีนอลจำหน่ายอย่างแพร่หลาย ซึ่งความสามารถของชาสมุนไพรเหล่านี้ในการต่อต้านการก่อมะเร็งยังไม่มียารายงานที่แน่ชัด

แม้ว่ากระบวนการก่อมะเร็งจะมีความซับซ้อน แต่อย่างไรก็ตามการขัดขวางกระบวนการก่อมะเร็ง ตั้งแต่ระยะก่อตัว (Initiation) ถือว่าเป็นการป้องกันที่มีประสิทธิภาพ และเนื่องจากคนไทยส่วนใหญ่นิยมดื่มชาระหว่างมื้ออาหาร ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าความสามารถในการขัดขวางการ

เปลี่ยนแปลงสารก่อมะเร็งที่ยังไม่มีฤทธิ์ (Procarcinogen) ที่พบในอาหารไม่ให้เกิดเปลี่ยนแปลงไปเป็นสารก่อมะเร็ง (Carcinogen) หรือเรียกว่าระยะก่อตัว น่าจะเป็นกลไกสำคัญของชาในการต่อต้านมะเร็ง



บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 การวิเคราะห์ปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดและชนิดและปริมาณคาเทชินในตัวอย่างชา

3.1.1 การวิเคราะห์ปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด

สกัดโพลีฟีนอลจากชาโดยชั่งตัวอย่างใบชาประมาณ 2 กรัม สกัดด้วยน้ำเดือดปริมาตร 250 ml เป็นเวลา 10 นาที นำไปกรองผ่านกระดาษกรอง ทำการเจือจางและวิเคราะห์หาปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดตามวิธี Colorimetric methods using Folin-Ciocalteu reagent (ISO 14502-1:2005) ผสมสารละลายตัวอย่าง 1.0 มล. กับ 5.0 มล. ของ Folin-Ciocalteu reagent (10%v/v) เติม 4.0 มล. ของ 7.5%w/v sodium carbonate ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 60 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 nm เทียบกับสารมาตรฐานกรดแกลลิกความเข้มข้น 0-100 µg/ml รายงานผลในรูปกรัมของ Gallic Acid Equivalent (GAE) ต่อ 100 กรัมตัวอย่างแห้ง

3.2.2 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณคาเทชิน

สกัดคาเทชินจากชาโดยชั่งตัวอย่างใบชาประมาณ 2 กรัม สกัดด้วยน้ำเดือดปริมาตร 250 ml เป็นเวลา 10 นาที นำไปกรองผ่านกระดาษกรอง เจือจางสารละลายชาสกัด นำไปกรองผ่าน PTFE Syringe filter นำไปฉีด (10 µl) เข้าเครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC) ตามวิธี ISO 14502-2:2005 ทำการวิเคราะห์ด้วยคอลัมน์ Platinum EPS C18 53x7 mm อุณหภูมิ 30°C อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 2.0 ml/min เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย 87:13 %v/v ของ 0.05%trifluoro acetic acid และ acetonitrile ตรวจวัดด้วย DAD ที่ความยาวคลื่น 210 nm หาปริมาณโดยเทียบกับสารมาตรฐาน 8 ชนิด ได้แก่ (-)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG), (-)-Epigallocatechin (EGC), (-)-Epicatechin-3-gallate (ECG), (-)-Epicatechin (EC) (-)-Gallocatechin (GC), (+)-Catechin (C), (-)-Gallocatechin gallate (GCG) และ (-)-Catechin gallate (CG)

3.2 การศึกษาความสามารถในการเปลี่ยนแปลงฤทธิ์ของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการก่อมะเร็ง

แบ่งหนูเป็น 11 กลุ่ม กลุ่มละ 4 ตัว ปังจ้ยที่ศึกษาได้แก่ชนิดของชาสกัด 5 ชนิด คือ ชาเขียวที่ผลิตจากชาพันธุ์อัสสัม ชาเขียวที่ผลิตจากชาพันธุ์อุหลงเบอร์ 12 ชาอุหลงที่ผลิตจากชาพันธุ์อุหลงเบอร์ 12 ชาดำที่ผลิตจากชาอัสสัม และชาตะไคร้ ระยะเวลาของการได้รับชาสกัด ได้แก่ 1 วัน ทั้งนี้เพื่อทดสอบว่าประสิทธิภาพของสารโพลีฟีนอลที่ได้รับเพียงระยะสั้นจะเพียงพอต่อการต่อต้านกระบวนการก่อมะเร็งหรือไม่ ปริมาณของชาที่ได้รับ 2 ระดับได้แก่ 111 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน เทียบเท่าการดื่มชาโดยเฉลี่ยของคนอังกฤษ (2.84 กิโลกรัมต่อคนต่อปี) (Robinson และ Owuor, 1992) และ 1.11 กรัมต่อกิโลกรัมต่อวันเพื่อเป็นตัวแทนการกินเป็นสารเสริม สำหรับกลุ่มสุดท้ายได้แก่กลุ่มควบคุม ซึ่งหนูจะได้รับน้ำดื่มปกติแทนน้ำชาสกัด หลังจากหนูได้รับน้ำชาตามระยะเวลาที่กำหนด จากนั้นเก็บตัวอย่างตับจากหนูเพื่อนำมาวิเคราะห์ความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่อกระบวนการ biotransformation ของสาร คือ Phase I เอนไซม์ ได้แก่ CYP1A1 (Burke และ Mayer, 1974) และ CYP1A2 (Nerukar และคณะ, 1993) โดยใช้ ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) และ methoxyresorufin O-demethylase (MROD) เป็นตัวชี้วัด ตามลำดับ นอกจากนี้ทำการวัดความสามารถในการทำงานของ Phase II เอนไซม์ ได้แก่ glutathione-S transferase (GST) โดยมี 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) เป็นสารตั้งต้น เฉพาะเจาะจงของเอนไซม์ชนิดนี้ (Habig และคณะ, 1974) และ quinone reductase (NQO1)

CYP1A1/CYP1A2

วิเคราะห์ความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ CYP1A1 ด้วย Ethoxyresorufin (EROD) และ CYP1A2 ด้วย Methoxyresorufin (MROD) เป็นสารตั้งต้น ปฏิกริยาประกอบด้วย Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 7.8, 5 μ M EROD หรือ MROD และ NADPH จากนั้นวัด slope ของกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับเวลาทุกๆ 5 วินาที จนกระทั่งสิ้นสุดปฏิกิริยา (1-2 นาที) โดยมีความยาวคลื่น excitation และ emission เป็น 530 and 590 nm ตามลำดับ (Burke and Mayer, 1974)

Glutathione-S-transferase (GST)

วัดความสามารถการทำงานของเอนไซม์ GST โดยใช้ 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของเอนไซม์ GST หลาย isoform (Habig et al., 1974) ปฏิกริยาประกอบด้วย 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 7.5, 25 mM CDNB ใน 70% ethanol, และ 5 mM Reduced

glutathione วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 340 nm เป็นเวลา 1 นาที นำค่า slope มาคำนวณความสามารถในการทำงาน โดยมี molar extinction coefficients เท่ากับ $9.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Habig et al., 1974)

Quinone reductase (NQO1)

ปฏิกิริยาประกอบด้วย สารละลายผสม (7.5 ml 0.5 M pH 7.4 Tris-HCl buffer; 100 mg human albumin serum; 1 ml 1.5% Tween-20 solution; 0.1 ml 7.5 mM FAD; 1 ml 150 mM glucose-6-phosphate; 90 μl 50 mM NADP; 300 U yeast glucose-6-phosphate dehydrogenase; 45 mg MTT; 150 μl 50 mM menadione ใน acetonitrile เตรียมแล้วใช้ทันที; และ 140.16 ml น้ำกลั่น ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 150 ml) ความสามารถในการทำงานของ quinone reductase วัดจากการรีดิวซ์ menadione ไปเป็น menadiol และขณะเดียวกันทำให้สาร MTT ถูกรีดิวซ์ไปเป็น formazan ที่มีสีฟ้า วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 590 nm วัดปริมาณโปรตีนทั้งหมดในเพลทโดยการย้อมสี crystal violet แล้วสแกนที่ความยาวคลื่น 490 nm (Prochaska et al., 1992) รายงานผลในรูป nmol/l MTT blue formazan reduced / min / per mg protein (Prochaska and Santamaria, 1998)

การเตรียมตัวอย่างจากตับและไตแช่แข็งเพื่อการวิเคราะห์ในขั้นตอนนี้ทำได้โดยละลายตัวอย่างที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นเตรียม microsomal supernatant (S9) ความเข้มข้น 25 % w/v ด้วยสารละลายเย็นจัด 0.154 M KCl ในบัฟเฟอร์ 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 โดยการบดตัวอย่างให้เป็นเนื้อเดียวกัน (Homogenize) และปั่นแยกส่วน (Differential centrifugation) ที่ความเร็ว 9000xg เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำส่วนใส (S9) มาปั่นแยกอีกครั้งด้วยความเร็วรอบ 105000xg เป็นเวลา 45 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ส่วนใสที่ได้จากการปั่นครั้งที่สองคือ cytosol ใช้สำหรับวิเคราะห์ Phase II เอนไซม์ และส่วนตะกอนที่ได้คือ microsome ใช้สำหรับวิเคราะห์ Phase I เอนไซม์ โดย microsome จะถูกนำมา homogenize ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกับที่ใช้เตรียม S9 ในปริมาณที่เท่ากับปริมาตร S9 เริ่มต้น

ทั้ง cytosol และ microsome จะถูกวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford (Bradford, 1976) โดยเจือจางตัวอย่าง cytosol และ microsome 80 และ 50 เท่าตามลำดับ ในสารละลายต่าง 0.5 M NaOH จากนั้นผสม 10 μl ตัวอย่างเจือจาง กับ 200 μl Bio-Rad dye ที่เจือจาง 5 เท่าในน้ำกลั่น ลงใน microplate ทั้งไว้ 5 นาทีแล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร คำนวณปริมาณโปรตีนจากค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้กราฟมาตรฐานที่ได้จาก bovine serum albumin (BSA) ความ

เข้มข้นระหว่าง 0-500 $\mu\text{g/ml}$ ปริมาณ โปรตีนที่ได้จะถูกนำไปใช้ในการคำนวณความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ข้างต้น



บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 การวิเคราะห์ปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดและความสามารถในการจับอนุมูลอิสระของชาแต่ละประเภท

ปริมาณ โพลีฟีนอลทั้งหมดและปริมาณสารคาเทชินชนิดต่างๆในชาตัวอย่างทั้ง 5 ชนิด ได้ถูกวิเคราะห์เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการอภิปรายผลการทดลองในลำดับต่อไป โดยวิเคราะห์ปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดด้วยวิธี Colorimetric methods using Folin-Ciocateu reagent ผลการทดลองพบว่าในตัวอย่างชาอบแห้งทั้ง 5 ชนิดมีปริมาณสารโพลีฟีนอลทั้งหมดใกล้เคียงกัน ยกเว้นชาเขียวที่ผลิตจากชาสายพันธุ์อัสสัมที่มีปริมาณสูงกว่าชาชนิดอื่นๆ และพบว่าชาตะไคร้มีปริมาณสารโพลีฟีนอลต่ำที่สุด ดังแสดงในตารางที่ 4-1

ตารางที่ 4-1 ปริมาณ โพลีฟีนอลทั้งหมดในตัวอย่างใบชาอบแห้ง

ชนิดของชาอบแห้ง	ปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด (gGAE /100g)
ชาเขียวที่ผลิตจากสายพันธุ์ชาอัสสัม	24.25±1.476 ^a
ชาเขียวที่ผลิตจากสายพันธุ์ชาอู่หลงเบอร์ 12	15.30±0.137 ^b
ชาอู่หลงที่ผลิตจากสายพันธุ์ชาอู่หลงเบอร์ 12	13.74±0.181 ^b
ชาดำที่ผลิตจากสายพันธุ์ชาอัสสัม	13.94±0.029 ^b
ชาตะไคร้	0.59±0.01 ^c

อักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

จากตารางที่ 4-1 เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกระบวนการผลิตชา ชาอบแห้งชนิดชาเขียวหรือชาที่ไม่ผ่านการหมักมีปริมาณโพลีฟีนอลสูงที่สุด แต่เมื่อเปรียบเทียบระหว่างชาเขียวที่ผลิตจากสายพันธุ์ต่างกัน ได้แก่ พันธุ์อัสสัมและพันธุ์อู่หลงเบอร์ 12 พบว่าชาพันธุ์อัสสัมที่เป็นสายพันธุ์พื้นเมืองที่ปลูกมากในประเทศไทย มีปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดสูงกว่า สำหรับชาสายพันธุ์อู่หลงเบอร์ 12 ที่ผ่านกระบวนการต่างกัน (ชาเขียวและชาอู่หลง) พบว่าปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนชาพันธุ์อัสสัมเมื่อแปรรูปเป็นชาดำซึ่งเป็นกระบวนการที่ชาต้องผ่าน

การหมักอย่างสมบูรณ์ มีปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดต่ำที่สุด แสดงให้เห็นว่ากระบวนการแปรรูปมีผลต่อปริมาณสารสำคัญอย่างสูงและสูงกว่าผลของสายพันธุ์ชาที่ใช้ ส่วนชาตะไคร้มี โพลีฟีนอลเป็นองค์ประกอบต่ำมาก อย่างไรก็ตามเมื่อวิเคราะห์ความสามารถในการจับอนุมูลอิสระของตัวอย่างทั้ง 5 ชนิดด้วยวิธี DPPH Radical Scavenging Activity ผลแสดงดังในตารางที่ 4-2

ตารางที่ 4-2 ความสามารถในการจับอนุมูลอิสระของตัวอย่างชาด้วยวิธี DPPH Radical Scavenging Activity

ชนิดของชา	ความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ ($\mu\text{mol Trolox}/100\text{g}$)
ชาเขียวที่ผลิตจากสายพันธุ์ชาอัสสัม	299,813 \pm 1331 ^b
ชาเขียวที่ผลิตจากสายพันธุ์ชาอู่หลงเบอร์ 12	321,844 \pm 2172 ^a
ชาอู่หลงที่ผลิตจากสายพันธุ์ชาอู่หลงเบอร์ 12	323,524 \pm 3562 ^a
ชาดำที่ผลิตจากสายพันธุ์ชาอัสสัม	290,622 \pm 2631 ^c
ชาตะไคร้	219,991 \pm 2083 ^d

อักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

จากตารางที่ 4-2 พบว่าความสามารถในการจับอนุมูลอิสระของชาชนิดต่างๆ ไม่เป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณสารโพลีฟีนอลทั้งหมดที่อยู่ในชา (ตารางที่ 4-1) โดยชาที่ผลิตจากชาสายพันธุ์อู่หลงเบอร์ 12 ทั้งชนิดชาเขียวและชาอู่หลงมีความสามารถในการจับอนุมูลอิสระสูงสุด เมื่อเปรียบเทียบกับชาสายพันธุ์อัสสัมที่ผลิตด้วยกระบวนการเดียวกัน แสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์ชาที่มีผลต่อความสามารถในการต่อต้านอนุมูลอิสระสูงกว่ากระบวนการ ทั้งนี้ความสามารถของการจับอนุมูลอิสระน่าจะมีผลมาจากชนิดของสารโพลีฟีนอลที่แตกต่างกันไป ใบชาสดแต่ละสายพันธุ์ ดังนั้นการวิเคราะห์ปริมาณสารคาเทชินแต่ละชนิดในตัวอย่างชาจึงน่าจะช่วยให้สามารถอธิบายได้อย่างถูกต้องยิ่งขึ้น ส่วนชาตะไคร้แม้ว่าจะไม่มีสารโพลีฟีนอล แต่ความสามารถในการจับอนุมูลอิสระมีค่าค่อนข้างสูง ซึ่งน่าจะเป็นผลจากสารสำคัญชนิดอื่นที่มีอยู่ในตะไคร้ เช่น citral (Thumvijit, 1999)

4.2 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณคาเทชินในตัวอย่างชา

ตารางที่ 4-3 ปริมาณคาเทชินในตัวอย่างชาเมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

คาเทชิน	ชาเขียว (อัสสัม)	ชาเขียว (อุ๋หลงเบอร์ 12)	ชาอุ๋หลง (อุ๋หลงเบอร์ 12)	ชาดำ (อัสสัม)	ชา ตะไคร้
(-) Galocatechin (GC)	1.08 ±0.0350 ^b	1.34±0.0098 ^a	1.02±0.0220 ^c	0.25±0.0175 ^d	ND
(-)-Epigallocatechin (EGC)	1.69±0.0504 ^c	2.54±0.0388 ^b	3.03±0.1785 ^a	0.20±0.0072 ^d	ND
(+)-Catechin (C)	2.17±.00846 ^a	1.04±0.0288 ^b	0.53±0.022 ^c	0.63±0.0460 ^c	ND
(-)-Epicatechin (EC)	3.52±0.0470 ^a	1.30±0.0376 ^b	0.83±0.0328 ^c	0.45±0.0206 ^d	ND
(-)-Epigallocatechin gallate (EGCG)	1.790±.0405 ^c	2.34±0.0690 ^b	3.38±0.0917 ^a	0.07±0.0053 ^d	ND
Caffeine	3.76±0.0380 ^b	2.90±0.060 ^c	2.28±0.0794 ^d	4.53±0.1467 ^a	ND
(-)-Galocatechin gallate (GCG)	0.31±0.0165 ^c	1.01±0.0287 ^a	0.54±0.0241 ^b	ND	ND
(-)-Epicatechin gallate (ECG)	3.88±0.0770 ^a	0.68±0.0093 ^b	0.52±0.0143 ^c	0.46± 0.0318 ^c	ND
(-)-Catechin gallate (CG)	0.19±0.0020	ND	ND	ND	ND

ND คือ ตรวจไม่พบ โดยวิธีทดสอบอ้างอิง

อักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันในแนวนอนหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารคาเทชินชนิดต่างๆในตัวอย่างชา ด้วยเครื่อง HPLC แสดงในตารางที่ 4-3 พบว่า ชาอัสสัมในรูปของชาดำมีปริมาณสาร Caffeine สูงที่สุด เมื่อพิจารณาชาเขียวอัสสัมที่ไม่ผ่านกระบวนการหมักเลย ปริมาณสารที่พบมากที่สุดเปลี่ยนไปเป็น catechin ทั้งหมด, EC และ ECG ส่วนชาเขียวที่ผลิตด้วยชาสายพันธุ์อื่น ได้แก่ อุ๋หลงเบอร์ 12 มีปริมาณสาร GC และ GCG สูงสุด ในขณะที่ ชาอุ๋หลงเบอร์ 12 เมื่อแปรรูปเป็นชากิ่งหมัก หรือชาอุ๋หลง ทำให้มีปริมาณสาร EGC และ EGCG สูงที่สุด มีรายงานว่าโดยทั่วไปสารคาเทชินที่พบในชาเขียวเป็นชนิดที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก (น้ำหนักโมเลกุลต่ำ) โดยมี flavanol (flavan-3-ol) เป็น monomer มีหลากหลาย isomer เช่น catechin, CG, GCG, ECG, และ EGCG โดยร้อยละ 10-20 ของคาเทชินในชาเขียวจะอยู่ในรูปของ EGCG (Graham, 1992) ซึ่งใกล้เคียงกับผลการทดลองในครั้งนี้ อย่างไรก็ตามในชาดำและชาอุ๋หลงที่ผ่านกระบวนการหมัก สารคาเทชินในชาจะเปลี่ยนรูปไปเนื่องจากปฏิกิริยา

ออกซิเดชันและเกิด dimer ทำให้ได้สารที่ทำให้สีของชาเปลี่ยนเป็นสีส้มแดง เช่น theaflavins นอกจากนี้ในชาดำยังมี caffeine มากกว่าชาเขียว ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับกระบวนการชง และวัตถุดิบที่ใช้ (Leung et al., 2001) จึงอาจกล่าวได้ว่า ทั้งสายพันธุ์ชาและกระบวนการมีผลต่อชนิดและปริมาณ สารคาเทชิน และหากพิจารณาความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ (ตารางที่ 4-2) ร่วมด้วยจะพบว่า สารที่มีความสำคัญเชิงหน้าที่ของชา ได้แก่ GC, GCG, EGC และEGCG ที่พบปริมาณสูงในชาเขียว (อุ๋หลงเบอร์ 12) และ ชาอู่หลง (อุ๋หลงเบอร์ 12) เนื่องจากชาทั้งสองชนิดมีความสามารถในการจับอนุมูลอิสระสูงสุด

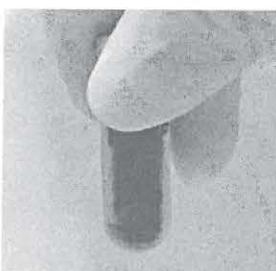


ก)

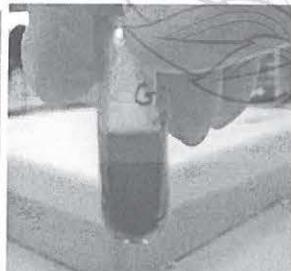


ข)

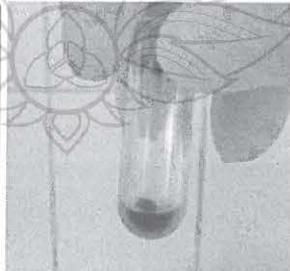
ภาพที่ 4-1 หนู Wistar albino เพศผู้ น้ำหนักเริ่มต้น 200 ± 20 กรัม ก) การให้น้ำชา ข)



(a)



(b)



(c)



(d)

ภาพที่ 4-2 ภาพแสดง S9 (a) S9 ภายหลังจากปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกชั้นของ microsomes และ cytosol (b) microsomes (c) และ cytosol (d)

4.3 การศึกษาความสามารถในการเปลี่ยนแปลงฤทธิ์ของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการก่อมะเร็ง

ตารางที่ 4-4 แสดงกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ phase I และ phase II ในตับหนูที่ได้รับชาชนิดต่างเป็นระยะเวลา 1 วัน

	ระยะเวลารับชา 1 วัน					
	Control	GTa	GTo	BTa	OTo	LGT
Low dose (111 mg/kg/day)						
<i>Phase I enzyme</i>						
Ethoxyresorufin O-deethylation (CYP1A1) (pmol/min/mg protein)	0.22±0.13	0.08±0.02	0.18±0.08	0.14±0.04	0.11±0.03	0.04±0.02
Methoxyresorufin O-demethylation (CYP1A2) (pmol/min/mg protein)	0.45±0.09	0.25±0.17	0.37±0.14	0.23±0.07*	0.30±0.05*	0.21±0.02**
<i>Phase II enzyme</i>						
Glutathione S-transferase (GST) (μmol/min/mg protein)	106.57±4.15	112.10±6.85	118.88±9.80	134.95±13.54**	127.27±14.10	220.68±6.66**
NADPH:quinone oxidoreductase (NQO1) (μmol/min/mg protein)	189.50±6.75	250.78±18.12**	232.79±12.76**	235.69±5.37**	245.68±4.10**	203.68±7.19*
High dose (1.11 g/kg/day)						
<i>Phase I enzyme</i>						
Ethoxyresorufin O-deethylation (CYP1A1) (pmol/min/mg protein)	0.4±0.10	0.09±0.01	NA	0.43±0.12	0.23±0.27	0.23±0.27
Methoxyresorufin O-demethylation (CYP1A2) (pmol/min/mg protein)	0.26±0.01*	0.28±0.07	NA	0.13±0.02**	0.35±0.05	0.35±0.05
<i>Phase II enzyme</i>						
Glutathione S-transferase (GST) (μmol/min/mg protein)	115.97±2.75**	140.78±1.59**	NA	106.55±2.75	218.34±11.55**	218.34±11.55**
NADPH:quinone oxidoreductase (NQO1) (μmol/min/mg protein)	221.01±0.88**	198.05±3.87*	NA	113.00±4.78**	96.20±3.50**	96.20±3.50**

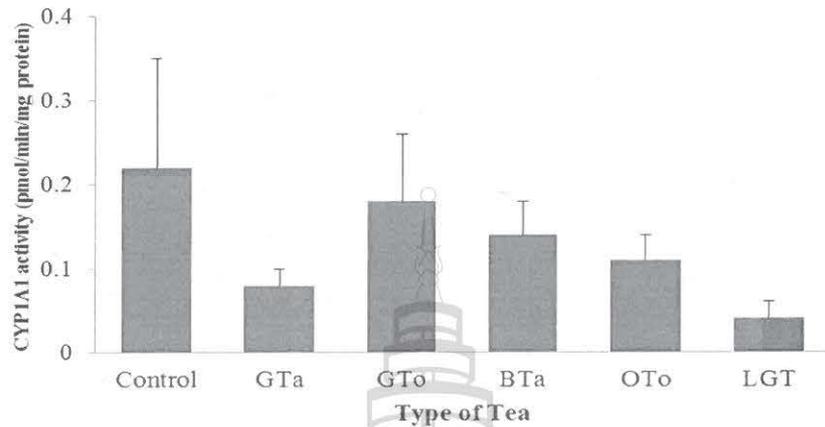
ตารางแสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากจำนวนหนู 4 ตัว/กลุ่ม

Control = หนูกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับน้ำชา, GTa = ชาเขียวจากชาอัสสัม, GTo = ชาเขียวจากชาอู่หลงเบอร์ 12, BTa = ชาดำจากชาอัสสัม, OTo = ชาอู่หลงจากชาอู่หลงเบอร์ 12 และ LGT = ชาตะไคร้

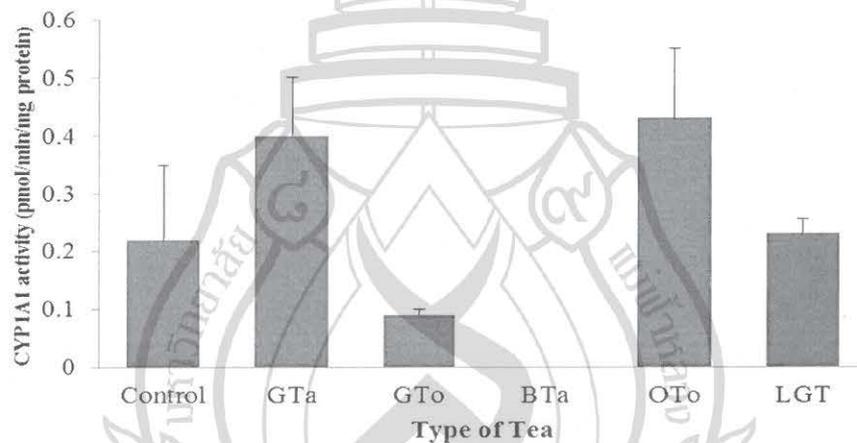
**, * หมายถึง ค่าเฉลี่ยตามเนวอนมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99 และ 95 ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

NA หมายถึง ไม่มีข้อมูลเนื่องจากตัวอย่างได้รับความเสียหายจากเหตุการณ์น้ำท่วม ไม่สามารถนำมาวิเคราะห์ได้

A (111 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน)



B (1.11 กรัม/กิโลกรัม/วัน)



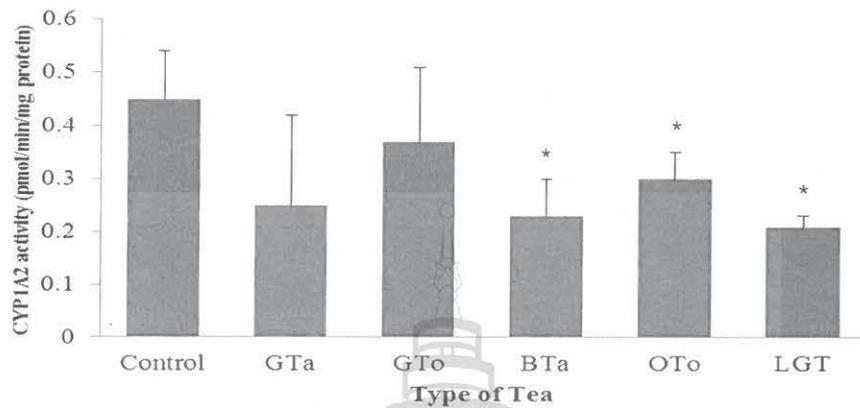
ภาพที่ 4-3 กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ CYP1A1 ในตับหนู Wistar Albino เพศผู้ที่ได้รับน้ำชาสกัดชนิดต่างๆ

Control = หนูกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับน้ำชา, GTa = ชาเขียวจากชาอัสสัม, GTo = ชาเขียวจากชาอู่หลงเบอร์ 12, BTa = ชาดำจากชาอัสสัม, OTo = ชาอู่หลงจากชาอู่หลงเบอร์ 12 และ LGT = ชาตะไคร้ ในปริมาณและระยะเวลาที่แตกต่างกัน กราฟแสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากจำนวนหนู 4 ตัว/กลุ่ม

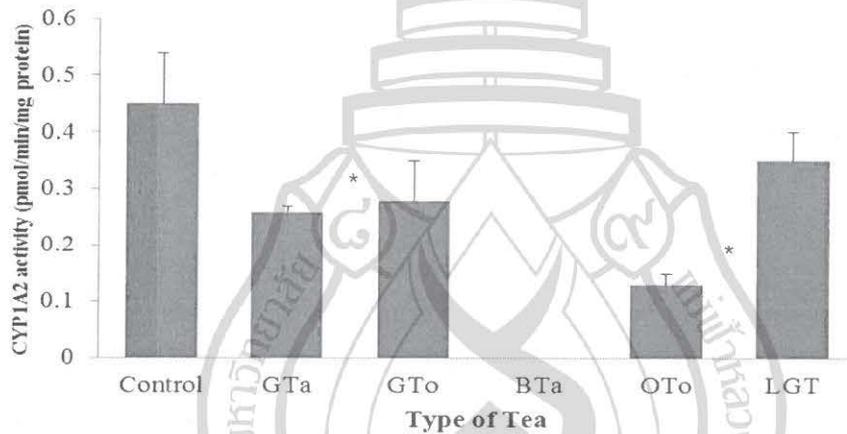
* หมายถึง ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

ตัวอย่างที่ไม่มีข้อมูล หมายถึง ตัวอย่างได้รับความเสียหายจากเหตุการณ์น้ำท่วม ไม่สามารถนำมาวิเคราะห์ได้

A (111 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน)



B (1.11 กรัม/กิโลกรัม/วัน)



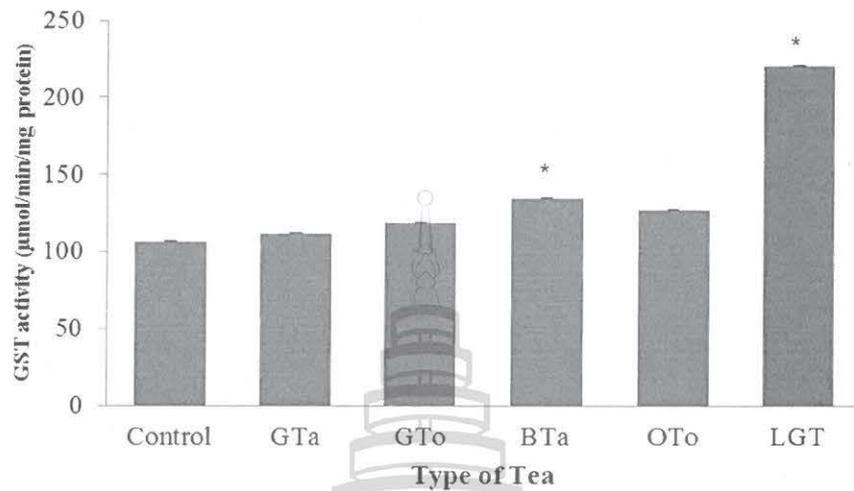
ภาพที่ 4-4 กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ CYP1A2 ในตับหนู Wistar Albino เพศผู้ที่ได้รับน้ำชา สกัดชนิดต่างๆ

Control = หนูกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับน้ำชา, GTa = ชาเขียวจากชาอัสสัม, GTo = ชาเขียวจากชาอู่หลงเบอร์ 12, BTa = ชาดำจากชาอัสสัม, OTo = ชาอู่หลงจากชาอู่หลงเบอร์ 12 และ LGT = ชาตะไคร้ ในปริมาณและระยะเวลา ที่แตกต่างกัน กราฟแสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากจำนวนหนู 4 ตัว/กลุ่ม

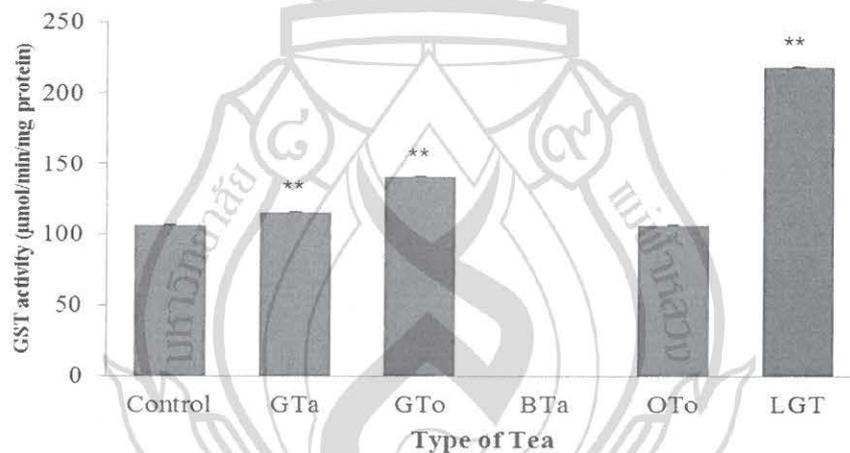
* หมายถึง ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เมื่อเปรียบเทียบกับ กลุ่มควบคุม

ตัวอย่างที่ไม่มีข้อมูล หมายถึง ตัวอย่างได้รับความเสียหายจากเหตุการณ์น้ำท่วม ไม่สามารถนำมาวิเคราะห์ได้

A (111 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน)



B (1.11 กรัม/กิโลกรัม/วัน)



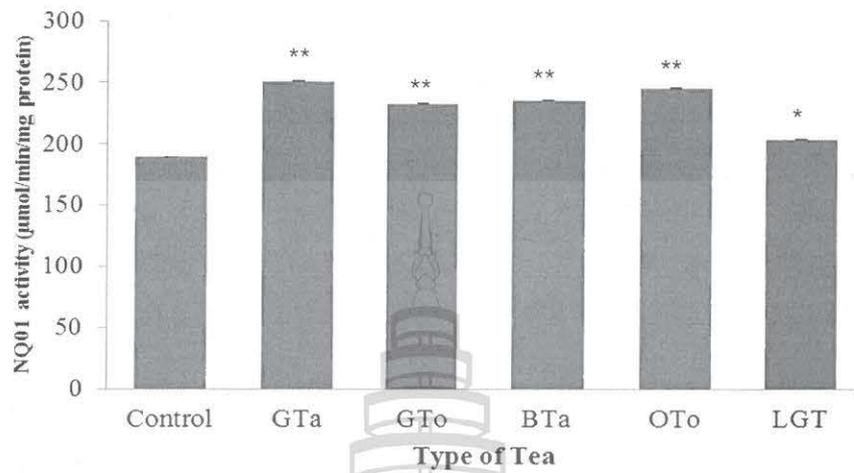
ภาพที่ 4-5 กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ GST ในตับหนู Wistar Albino เพศผู้ที่ได้รับน้ำชาสกัดชนิดต่างๆ

Control = หนูกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับน้ำชา, GTa = ชาเขียวจากชาอัสสัม, GTo = ชาเขียวจากชาอู่หลงเบอร์ 12, BTa = ชาดำจากชาอัสสัม, OTo = ชาอู่หลงจากชาอู่หลงเบอร์ 12 และ LGT = ชาตะไคร้ ในปริมาณและระยะเวลาที่แตกต่างกัน กราฟแสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากจำนวนหนู 4 ตัว/กลุ่ม

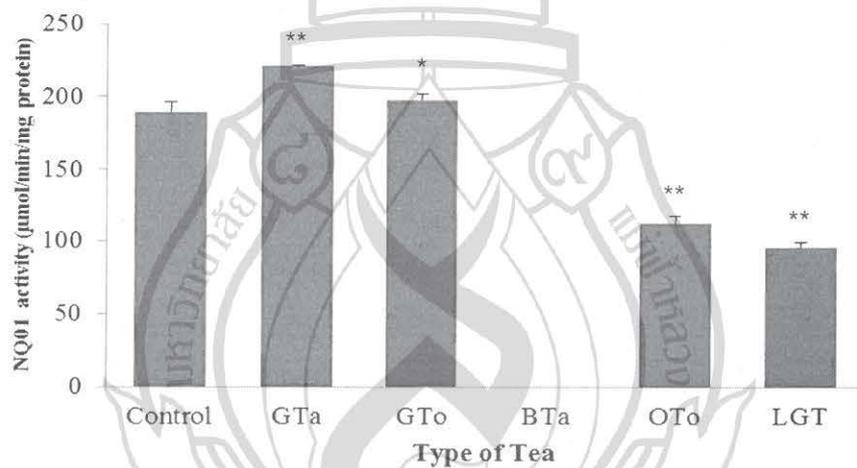
* หมายถึง ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

ตัวอย่างที่ไม่มีข้อมูล หมายถึง ตัวอย่างได้รับความเสียหายจากเหตุการณ์น้ำท่วม ไม่สามารถนำมาวิเคราะห์ได้

A (111 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน)



B (1.11 กรัม/กิโลกรัม/วัน)



ภาพที่ 4-6 กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ NQO1 ในตับหนู Wistar Albino เพศผู้ที่ได้รับน้ำชาสกัดชนิดต่างๆ

Control = หนูกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับน้ำชา, GTa = ชาเขียวจากชาอัสสัม, GTo = ชาเขียวจากชาอู่หลงเบอร์ 12, BTa = ชาดำจากชาอัสสัม, OTo = ชาอู่หลงจากชาอู่หลงเบอร์ 12 และ LGT = ชาตะไคร้ ในปริมาณและระยะเวลาที่แตกต่างกัน กราฟแสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากจำนวนหนู 4 ตัว/กลุ่ม

* หมายถึง ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

ตัวอย่างที่ไม่มีข้อมูล หมายถึง ตัวอย่างได้รับความเสียหายจากเหตุการณ์น้ำท่วม ไม่สามารถนำมาวิเคราะห์ได้

ภาพที่ 4-1 และ 4-2 แสดงการเลี้ยงสัตว์ทดลองและการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์เอนไซม์ Phase I และ II ตามลำดับ ตารางที่ 4-4 แสดงผลของชาสกัดต่อกิจกรรมของเอนไซม์ Phase I และ II ที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดสารต่างๆออกจากร่างกาย CYP450 เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม Phase I ที่ถูกค้นพบประมาณเมื่อ 50 กว่าปีที่ผ่านมานี้ เป็นกลุ่มเอนไซม์ขนาดใหญ่ที่มีเหล็กเป็นองค์ประกอบภายในโมเลกุล (heme-containing protein) สามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น แบคทีเรีย รา พืชและสัตว์ เอนไซม์เหล่านี้พบในตับเป็นส่วนใหญ่ เนื่องจากตับเป็นอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับการขับสารต่างๆออกจากร่างกาย แต่สามารถพบได้เช่นกันภายนอกตับ เช่น ไต ปอด เต้านม และลำไส้ใหญ่ เป็นต้น สารก่อมะเร็งบางชนิดไม่มีฤทธิ์โดยธรรมชาติ แต่เมื่อถูกเปลี่ยนแปลงด้วย CYP450 เช่น CYP1A1/CYP1A2 ด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชัน จะทำให้สารมีความไวต่อปฏิกิริยาสูง หากไม่เปลี่ยนรูปต่อไปเป็นสารที่ละลายน้ำได้ (โดย Phase II เอนไซม์) สารเหล่านี้จะไปจับกับ DNA ของเซลล์ทำให้เป็นสาเหตุให้เกิดมะเร็งได้ ดังนั้นเป้าหมายของการผลิตยา หรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดจากพืช เพื่อยับยั้งหรือรักษาการเกิดมะเร็งคือการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ CYP1A1 และ CYP1A2 และ/หรือส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์กลุ่ม Phase II เช่น Glutathione S-transferase (GST) และ quinone oxidoreductase (NQO1)

ในการทดลองครั้งนี้ต้องการทดสอบความสามารถของชาชนิดต่างๆ เช่นเดียวกับการทดลองก่อนหน้านี้ ได้แก่ หนูกุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับน้ำชา (control), ชาเขียวจากชาอัสสัม (GTa), ชาเขียวจากชาอู่หลงเบอร์ 12 (GTo), ชาดำจากชาอัสสัม (BTa), ชาอู่หลงจากชาอู่หลงเบอร์ 12 (OTo) และชาตะไคร้ (LGT) ต่อการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการก่อมะเร็ง CYP1A1/1A2, GST และ NQO1 ซึ่งชาที่ทดสอบ เป็นชาที่ผลิตด้วยกระบวนการแตกต่างกันและด้วยสายพันธุ์แตกต่างกัน จึงทำให้มีชนิดและปริมาณสารสำคัญแตกต่างกันไป (ตารางที่ 4-3) โดยหนู Wistar Albino เพศผู้ จะได้รับน้ำชาในระดับต่างกัน 2 ระดับ คือ 111 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน และ 1.11 กรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน ซึ่งระดับต่ำ (Low dose) เป็นระดับที่เทียบเท่ากับปริมาณการดื่มชาโดยเฉลี่ยของคนอังกฤษต่อวัน ส่วนระดับสูงเป็นระดับที่เป็นตัวแทนของการรับประทานผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ซึ่งมีความเข้มข้นสูงขึ้นถึง 10 เท่า (high dose) เป็นระยะเวลา 1 วัน (short term) เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของชาว่าสามารถออกฤทธิ์ได้เร็วเพียงใด และด้วยความเข้มข้นมากน้อยเพียงใดจึงเหมาะสม

จากผลการทดลองพบว่า CYP1A1 มีกิจกรรมลดลงในหนูที่ได้รับชาทุกชนิดรวมทั้งชาตะไคร้ เมื่อให้ชาในระดับต่ำกับหนู อย่างไรก็ตามเมื่อทดสอบทางสถิติโดย t-test เพื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม

ควบคุม ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ทั้งนี้เนื่องจากค่าความคลาดเคลื่อนของตัวอย่างควบคุมค่อนข้างสูง ซึ่งอาจเกิดจากการตอบสนองที่แตกต่างกันบ้างของหนูแต่ละตัว (ภาพที่ 4-3A) อย่างไรก็ตามความสามารถของ CYP1A1 ที่ลดลงเมื่อได้รับชาที่ใกล้เคียงกับที่เคยรายงานไว้ เมื่อมีผู้ทดสอบสารสกัดโพลีฟีนอลชนิดต่างๆจากชา ได้แก่ EGCG, ECG, EGC และ EC ในเชื้อจุลินทรีย์ *Salmonella typhimurium* พบว่า ECG และ EGCG มีความสามารถในการยับยั้ง CYP1A1/1A2 ซึ่ง EGCG สามารถยับยั้ง CYP450 ได้หลาย isoform ซึ่งหมายความว่า EGCG มีความจำเพาะต่ำ (Muto et al., 2001) ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่า EGCG สามารถยับยั้งสารพิษได้หลายชนิด สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของชาชนิดต่างๆที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้พบว่าในชาเขียวทั้งชนิดจากชาอัสสัมและอู่หลงเบอร์ 12 รวมทั้งชาอู่หลง มีปริมาณสาร EGCG สูง ต่างจากชาดำที่มี EGCG ต่ำมาก แต่ก็ยังมีฤทธิ์ในการยับยั้ง CYP1A1 ได้ ทั้งนี้อาจเกิดจากปริมาณสาร caffeine ปริมาณสูงที่พบในชาดำ (ตารางที่ 4-3) มีรายงานว่า caffeine เป็นสารตั้งต้นของ CYP1A1 (Eugster et al., 1993) ซึ่งหมายความว่าปริมาณสาร caffeine ในเลือดสูงจะทำให้เกิด competitive inhibition ของเอนไซม์ CYP1A1 และสามารถลดกิจกรรมของ CYP1A1 ได้ ส่วนชาตะไคร้นั้น แม้จะไม่มีโพลีฟีนอลเป็นองค์ประกอบ แต่น้ำมันหอมระเหยในตะไคร้ประกอบด้วยสารสำคัญมากมายที่ได้รับการพิสูจน์ว่าสามารถป้องกันและรักษาโรคต่างๆได้ สารสำคัญหลักๆในตะไคร้ได้แก่ α -citral หรือ geranial, β -citral หรือ neral, limonene, nerol, neryl acetate และ 6-methylhepten-2-one สารอื่นที่พบได้แก่ borneol, myrcene และ β -myrcene เป็นต้น (Khonsung, 2012) มีรายงานว่า β -myrcene มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2B1 ได้ดีและสามารถยับยั้ง CYP1A1 ได้แม้ในระดับที่ต่ำกว่า CYP2B1 (De-Oliveira et al., 1997) ทั้งนี้ผลการทดลองนี้ยังชี้ให้เห็นว่าสายพันธุ์ชาไม่มีผลต่อการยับยั้งการทำงานของ CYP1A1 เนื่องจากทั้งชาอัสสัมและอู่หลงเบอร์ 12 ยับยั้งเอนไซม์ได้ดีเช่นกัน อย่างไรก็ตามจะเห็นว่าในหนูกลุ่มที่ได้รับชาในปริมาณสูงกว่าปกติ 10 เท่า (ภาพที่ 4-3B) CYP1A1 กลับเพิ่มขึ้นอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) แต่ก็มีแนวโน้มว่าการดื่มชาในปริมาณสูงในเวลาสั้น จะกระตุ้นให้การทำงานของ CYP1A1 สูงขึ้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการขับสารออกจากร่างกาย เป็นที่ทราบกันดีถึงกลไกการเพิ่มปริมาณเอนไซม์ในกลุ่ม phase I เมื่อร่างกายได้รับสารเข้าสู่ร่างกาย เช่น การเพิ่มปริมาณ RNA polymerase isozymes, ribosomal RNA และ nuclear RNA precursors ของเอนไซม์ Phase I จนทำให้มีการสร้างเอนไซม์เพิ่มมากขึ้นและทำให้ปฏิกิริยาของเอนไซม์สูงขึ้นด้วย อย่างไรก็ตามสารแต่ละชนิดมีความสามารถในการเพิ่มปฏิกิริยาแตกต่างกันไป และด้วยกลไกที่แตกต่างกัน (Bresnick et al., 1984) ทั้งนี้เมื่อพิจารณากิจกรรมเอนไซม์ GST ของหนูกลุ่มนี้ (ภาพที่ 4-5) พบว่ามีค่าเพิ่มมากขึ้นเช่นกัน ซึ่งหมายความว่ากิจกรรมของ Phase I และ II จะยังมีความสมดุล และทำให้ชาสามารถขับสารพิษออกจากร่างกายได้ดีขึ้น

ภาพที่ 4-4 แสดงผลของชาต่อการทำงานของเอนไซม์ CYP1A2 ซึ่งพบว่ามีแนวโน้มใกล้เคียงกับ CYP1A1 กล่าวคือ เมื่อได้รับชาจะทำให้การทำงานของ CYP1A2 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง BTa, OTa และ LGT หากแต่ผลนี้เกิดขึ้นทั้ง 2 ระดับความเข้มข้น กลไกการยับยั้งเอนไซม์ Phase I อาจเกิดได้หลายทาง เช่น การที่สารสำคัญสามารถจับกับ heme ของ CYP450 จะทำให้เอนไซม์สูญเสียความสามารถในการทำงานไป หรือสารสำคัญอาจเป็นสารตั้งต้นของเอนไซม์ทำให้เกิดการแข่งขันกับสารตั้งต้นตัวอื่น (competitive inhibition) หรือจับที่ส่วนใดส่วนหนึ่งของโครงสร้างเอนไซม์ที่ไม่มีความจำเพาะ ทำให้รูปร่างของเอนไซม์เปลี่ยนและทำงานไม่ได้ในที่สุด (DeAnn, 1998)

GST และ NQO1 เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม Phase II ที่ทำหน้าที่ในการเติมหมู่ (เช่น กลูตาไธโอน) ให้กับสารที่มีความไวต่อปฏิกิริยาจากการถูกออกซิไดซ์ด้วย Phase I เอนไซม์ เพื่อให้สารเหล่านั้นมีความสามารถในการละลายน้ำเพิ่มขึ้นและถูกกำจัดออกจากร่างกายทางปัสสาวะหรือเหงื่อในที่สุด ดังนั้นจึงนับว่าเอนไซม์ในกลุ่มนี้เป็นเอนไซม์ที่ช่วยขจัดของเสียที่แท้จริง ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเมื่อได้รับชาในระดับต่ำ ชาดำและชาตะไคร้ทำให้การทำงานของเอนไซม์ GST สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ภาพที่ 4-5A) โดยเฉพาะอย่างยิ่งชาตะไคร้ ซึ่งการทำงานของ GST เพิ่มขึ้นสองเท่าของหนูกลุ่มควบคุม ส่วนชาชนิดอื่นๆ ค่าการทำงานของ GST เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย ในขณะที่เมื่อเพิ่มปริมาณการดื่มชาเป็นระดับสูง จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการขจัดของเสียของชาเขียวทั้งสองสายพันธุ์ได้เป็นอย่างดี (ภาพที่ 4-5B) เป็นที่น่าแปลกใจที่ชาดำมีความสามารถในการส่งเสริมการทำงานของ GST ได้ดีกว่าชาเขียวเล็กน้อย ทั้งที่มีปริมาณสาร flavonoid ต่ำมาก อาจเป็นเพราะสาร caffeine ในชาดำ ซึ่งในการทดลองที่มีการสกัดสาร caffeine ออกจากชาดำ (decaffeinated black tea) พบว่าชาดำไม่มีฤทธิ์ในการกระตุ้นการทำงานของ GST (Nakamura et al., 2003) อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานถึงกลไกการทำงานของ caffeine ในการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์เหล่านี้ นอกจากนี้เมื่อพิจารณาฤทธิ์การกระตุ้นการทำงานของ GST โดยชาตะไคร้นั้น เคยมีรายงานว่าสาร cirral ซึ่งเป็นสารสำคัญในน้ำมันหอมระเหยของตะไคร้ ทำให้การทำงานของ GST สูงขึ้นแบบ dose และ time dependent ทั้งในรูปแบบของ GST ทั้งหมดและ GST-pi (Nakamura et al., 2003)

เช่นเดียวกับ GST การทำงานของ NQO1 สูงขึ้นเมื่อหนูได้รับน้ำชาในระดับต่ำ (ภาพที่ 4-6A) และผลไปในทิศทางเดียวกันในชาทุกชนิด Lee และคณะ (1997) ได้รายงานความสามารถของชาเขียวในการส่งเสริมการทำงานของ GST และ NQO1 อย่างไรก็ตามเมื่อความเข้มข้นสูงขึ้นมีเฉพาะ

ชาเขียวทั้งสองสายพันธุ์เท่านั้นที่ทำให้การทำงานของ NQO1 สูงขึ้น ส่วนชาอู่หลงและชาตะไคร้ทำให้ NQO1 ลดลง โดยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่ม phase II นี้ มีกลไกหลายสาเหตุ อาทิ การที่มีสารจำนวนมากชนิดหรือมีสารบางชนิดที่ความเข้มข้นสูงเกินไปและต้องการการกำจัดออกจากร่างกาย หรืออาจกล่าวว่าเป็นสารตั้งต้นให้กับปฏิกิริยาของเอนไซม์นั่นเอง (DeAnn, 1998) นอกจากนี้สารสำคัญอาจไปยับยั้ง co-factor ของเอนไซม์ Phase II ได้ เช่น การลดปริมาณซัลเฟตในซีรัม ก็จะทำให้เอนไซม์ทำงานได้ลดลง เช่นกัน (Mulder, 1981) จึงอาจกล่าวได้ว่าการรับประทานในระดับสูงสาร caffeine และ สารหอมระเหยในชาทั้งสองชนิด อาจก่อความเป็นพิษได้

ผลการทดลองในครั้งนี้ทำให้สามารถสรุปได้ว่า ชาที่ผลิตจากกระบวนการที่แตกต่างกันทั้งชาเขียวชาอู่หลงและชาดำ สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Phase I และส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ phase II ได้แม้ในระดับที่แตกต่างกันเล็กน้อย รวมทั้งสายพันธุ์ชาทั้งชาพันธุ์อัสสัมและชาอู่หลงเบอร์ 17 นอกจากนี้ชาสมุนไพรรชนิดอื่นที่ไม่มีสารโพลีฟีนอล เช่น ชาตะไคร้ก็มีประสิทธิภาพเท่าเทียมกัน เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจากค่า DPPH ที่วัดได้ (ตารางที่ 4-2) จึงอาจกล่าวได้ว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระไม่มีความสัมพันธ์โดยตรงกับความสามารถในการเปลี่ยนแปลงเอนไซม์เหล่านี้ ซึ่งนับว่าเป็นกลไกการยับยั้งมะเร็งของชา นอกเหนือไปจากความสามารถในการต้านทานอนุมูลอิสระ และเมื่อเปรียบเทียบระดับความเข้มข้นของชาที่เหมาะสม พบว่า ที่ระดับต่ำเทียบเท่าการดื่มชาโดยทั่วไปต่อวันสามารถยับยั้งเอนไซม์ Phase I และส่งเสริมเอนไซม์ Phase II ได้ดีกว่าระดับสูง ซึ่งประสิทธิภาพที่ลดลงเมื่อความเข้มข้นสูงขึ้นอาจเกิดจากความเป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งยังไม่มีการรายงานกลไกดังกล่าว

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

งานวิจัยในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าเรามีความสามารถในการยับยั้งการก่อกลายพันธุ์ ซึ่งแม้ว่าสายพันธุ์และกรรมวิธีการผลิตชาจะมีผลต่อชนิดและปริมาณสารโพลีฟีนอล แต่กลับไม่มีผลต่อความสามารถในการยับยั้งการก่อกลายพันธุ์มากนัก จากผลการทดลอง พบว่า ชาอู่หลงและชาเขียวที่ผลิตจากชาสายพันธุ์อู่หลงเบอร์ 12 มีความสามารถในการจับอนุมูลอิสระสูงสุด จึงอาจกล่าวได้ว่า สารคาเทชิน ชนิด GC, GCG, EGC และ EGCG เป็นสารคาเทชินกลุ่มที่มีประสิทธิภาพสูงกว่าคาเทชินชนิดอื่นที่พบในชาสายพันธุ์อู่หลงที่ผลิตด้วยกระบวนการเดียวกัน นอกจากนี้แม้ว่าชาตะไคร้จะไม่มีคาเทชินเป็นองค์ประกอบเลย แต่พบว่ามีความสามารถในการจับอนุมูลอิสระในระดับที่ค่อนข้างสูง ดังนั้นประโยชน์ของชาตะไคร้จะมีผลมาจากสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่แตกต่างกับชาทั่วไป

ในการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการก่อมะเร็งของชาตัวอย่าง โดยการวัดการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดสารพิษออกจากร่างกาย ได้แก่ เอนไซม์ Phase I (CYP1A1 และ CYP1A2) และเอนไซม์ Phase II (GST และ NQO1) พบว่า ชาที่ผลิตจากกระบวนการที่แตกต่างกัน ทั้งชาเขียว ชาอู่หลงและชาดำ ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Phase I และส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ Phase II ได้ หมายความว่า จะช่วยลดการเกิดสารที่มีความไวต่อปฏิกิริยาสูง และป้องกันการทำลาย DNA ได้ และสายพันธุ์ชาทั้งชาพันธุ์อู่หลงและชาอู่หลงเบอร์ 17 ไม่มีความแตกต่างกัน นอกจากนี้ชาตะไคร้ยังให้ผลใกล้เคียงกัน ซึ่งอาจเกิดจากสารสำคัญชนิด citral ที่พบมากในตะไคร้ สำหรับชาดำนั้นสารสำคัญที่ช่วยยับยั้งเอนไซม์ Phase I น่าจะเกิดจาก caffeine ที่พบในปริมาณสูงกว่าชาเขียวและชาอู่หลง ส่วนการดื่มชาที่ความเข้มข้นสูง พบว่าประสิทธิภาพในการป้องกันการทำลาย DNA จะลดลง เนื่องจากมีผลทำให้ CYP1A2 เท่านั้นที่ลดลง ส่วน CYP1A1 แม้ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแต่การทำงานของเอนไซม์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น สำหรับเอนไซม์ Phase II นั้น ทุกตัวอย่างทำให้การทำงานของ GST เพิ่มขึ้น แต่ชาดำและชาตะไคร้กลับทำให้การทำงานของ NQO1 ลดลง ดังนั้นการทดลองนี้จึงสามารถสรุปได้ว่าการดื่มชาแต่ละชนิดในปริมาณต่ำเทียบเท่ากับการดื่มชาของคนทั่วไปในแต่ละวัน เป็นระยะเวลาสั้น (1 วัน) จะเพียงพอต่อการยับยั้งการก่อมะเร็ง ด้วยกลไกการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Phase I และส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ Phase II ส่วนการรับประทานชาในปริมาณ

สูงเกินไปอาจนำไปสู่การเกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ ดังนั้นควรมีการศึกษาผลต่างๆดังกล่าวนี้เมื่อ
ดื่มชาเป็นระยะยาว เนื่องจากคนที่มีความสามารถในการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์ที่
เกี่ยวข้องกับการกำจัดสารพิษออกจากร่างกายซึ่งรวมไปถึงยาต่างๆ จึงอาจส่งผลต่อการ
เกิดปฏิกิริยาร่วมระหว่างยา (drug interaction) และมีผลข้างเคียงต่อผู้บริโภค เช่น เกิดความเป็น
พิษของยา หรือทำให้ประสิทธิภาพของยารักษาโรคลดลง เนื่องจากการขับยาจากร่างกายเกิดขึ้นได้
รวดเร็วกว่าปกติ



เอกสารอ้างอิง

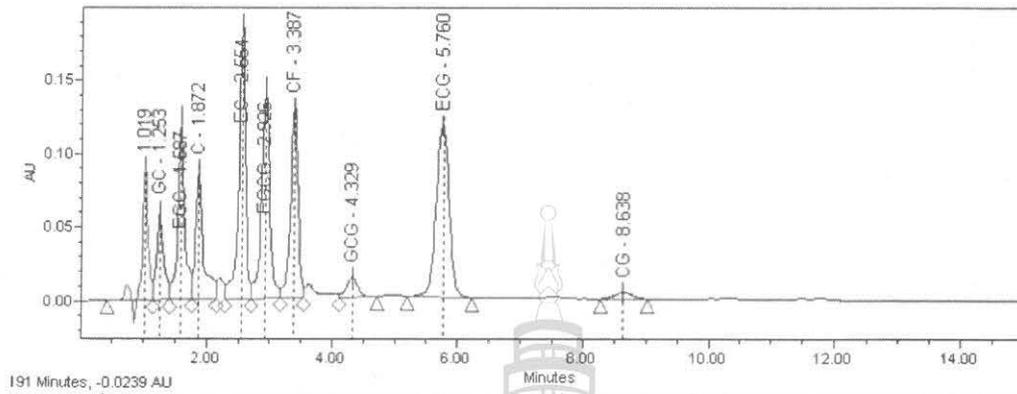
- ธีรพงษ์ เทพภรณ์ (2550) การศึกษาการเปลี่ยนแปลงชนิดและปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ (โพลีฟีนอล) ในระหว่างกระบวนการผลิตชาเขียวและชาอู่หลงของจังหวัดเชียงราย. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง จังหวัดเชียงราย. 49 หน้า.
- ศูนย์วิจัยกสิกรรมไทย (2552) *Econ Analysis, Businesss Brief*, ฉบับที่ 2715.
- สำนักงานเกษตรจังหวัดเชียงราย available online สืบค้นเมื่อ มีนาคม 2553 จาก <http://www.chiangrai.doae.go.th>.
- Balz, F. and Higdon, V.J. (2003) Antioxidant Activity of Tea Polyphenols In Vivo: Evidence from Animal Studies. *The American Society for Nutritional Sciences J. Nutr.* 133, p. 3275S-3284S.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, p. 248-254.
- Bresnick, E., Foldes, R. and Hines, R.N. 1984. Induction of cytochrome P450 by xenobiotics. *Pharmacol Rev.* 36(2 Suppl):43S-51S.
- Bu-Abbas, A., Clifford, M.N., Walker, R. and Ioannides, C. 1998. Contribution of caffeine and flavanols in the induction of hepatic Phase II activities by green tea. *Food Chem Toxicol.*36(8):617-21.
- Burke, M.D. and Mayer, R.T. (1974) Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. *Drug Metab Dispos* 2, p. 583-588.
- Chen, L., Lee, M. J., Li, H. and Yang, C. S. (1997) Absorption, distribution, elimination of tea polyphenols in rats. *Drug Metab. Dispos.* 25, p. 1045-1050.
- Chen, Z. Y., Zhu, Q. J., Tsang, D. and Huang, Y. (2001) Degradation of green tea catechins in tea drinks. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, p. 477-482.
- DeAnn, J. L. 1998. *Alternative Medicine Review.* 3 (3): 187-198.

- De-Oliveira A., Ribeiro-Pinto, L.F. and Paumgarten, F.J.R. 1997. In vitro inhibition of CYP2B1 monooxygenase by betamycene and other monoterpenoid compounds. *Toxicol Lett* 1997;92(1):39-46.
- Eugster, H.P., Probst, M., Würgler, F.E. and Sengstag, C. 1993. Caffeine, estradiol, and progesterone interact with human CYP1A1 and CYP1A2. Evidence from cDNA-directed expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Drug Metab Dispos.* 21(1):43-9.
- Galati, G., Lin, A., Sultan, A.M. and O'Brien, P. J. (2006) Cellular and in vivo hepatotoxicity caused by green tea phenolic acids and catechins. *Free Radical Biology and Medicine* 40(4), p. 570-580.
- Graham HN. 1992. Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *Prev Med* 21, p. 334–350.
- Gsteiger, S. and Morgenthaler, S. (2008) Heterogeneity in multistage carcinogenesis and mixture modeling. *Theoretical Biology and Medical Modelling* 5(13).
- Habig, W.H., Pabst, M.J., and Jakoby, W.B. (1974) Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249, p. 7130-7139.
- Hong, J., Smith, T.J., Ho, C-T., August, D.A. and Yang, C.S. (2001) Effects of purified green and black tea polyphenols on cyclooxygenase- and lipoxygenase-dependent metabolism of arachidonic acid in human colon mucosa and colon tumor tissues. *Biochem. Pharmacol.* 62, p. 1175-1183.
- Lambert, J. D. & Yang, C. S. (2003) Mechanisms of cancer prevention by tea constituents. *J. Nutr.* 133, p. 3262S–3267S.
- Lee, I.P., Kim, Y.H., Kang, M.H., Roberts, C., Shim, J.S. and Roh, J.K. 1997. Chemopreventive effect of green tea (*Camellia sinensis*) against cigarette smoke-induced mutations (SCE) in humans. *J Cell Biochem Suppl.* 27:68-75.
- Leung, L.K., Su, Y., Chen, R., Zhang, Z., Huang, Y. and Chen, Z.Y. 2001. Theaflavins in black tea and catechins in green tea are equally effective antioxidants. *J Nutr.* 131(9), p. 2248-251.

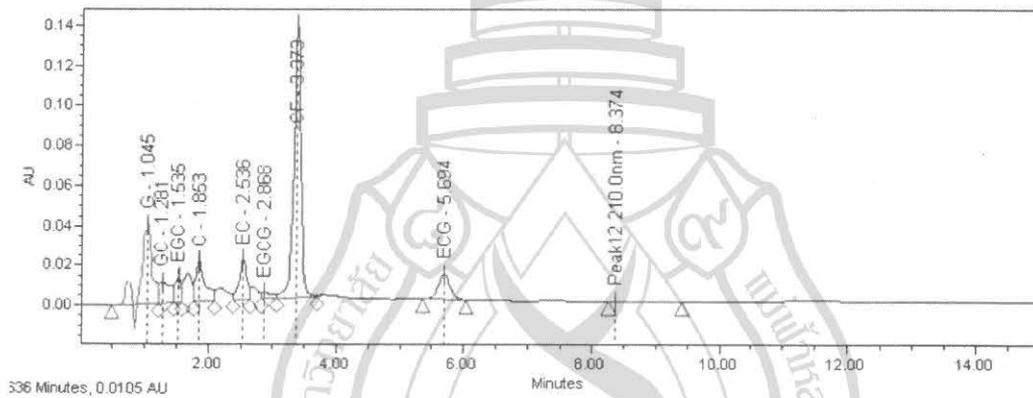
- Liang Y. C., Chen Y. C., Lin Y. L., Lin-Shiau S. Y., Ho C. T., Lin J. K. (1999) Suppression of extracellular signals and cell proliferation by the black tea polyphenol, theaflavin-3,3'-digallate. *Carcinogenesis (Lond.)*, 20, p. 733-776.
- Lu, Y.P., Lou, Y.R., Xie, J.G., Yen, P., Huang, M.T. and Conney, A.H. (1997) Inhibitory effects of black tea on the growth of established skin tumor size, apoptosis, mitosis and bromodeoxyuridine incorporation into DNA. *Carcinogenesis* 18, p. 2163-2169.
- Lu, J., Ho, C-T., Ghai, G. and Chen, K.Y. (2000) Differential Effects of Theaflavin Monogallates on Cell Growth, Apoptosis, and Cox-2 Gene Expression in Cancerous versus Normal Cell. *Cancer Research* 60, p. 6465-6471.
- Macfarlane, A. and Macfarlane, I. (2004) *The Empire of Tea*. The Overlook Press. p. 32.
- Mulder GJ. 1981. Sulfate availability in vivo. In: Mulder GJ, ed. *Sulfation Of Drugs And Related Compounds*. Boca Raton, FL: CRC Press, Inc;31-52.
- Muto, S., Fujita, K. and Yamazaki, Y. 2001. Inhibition by green tea catechins of metabolic activation of procarcinogens by human cytochrome P450. *Mutat Res.* 8;479(1-2):197-206.
- Nakamura, Y., Miyamoto, M., Murakami, A., Ohigashi, H., Osawa, T. and Uchida, K. 2003. A phase II detoxification enzyme inducer from lemongrass: identification of citral and involvement of electrophilic reaction in the enzyme induction. *Biochem Biophys Res Commun.* 14;302(3):593-600.
- Nerurkar, P.V., Park, S.S., Thomas, P.E., Nims, R.W., and Lubet, R.A. (1993) Methoxyresorufin and benzyloxyresorufin: substrates preferentially metabolized by cytochromes P4501A2 and 2B, respectively, in the rat and mouse. *Biochem Pharmacol* 46, p. 933-943.
- Niwattisaiwong, N., Luo, X. X., Coville, P. F., Wanwimolruk, S. (2004) Effects of Chinese, Japanese and Western tea on hepatic P450 enzyme activities in rats. *Drug metabolism and drug interactions* 20(1-2), p.43-56.

- Parirat Khonsung. 2012. ตะไคร้ (Cymbopogon citratus (DC) Stapf). Thai J Pharmacol; 34:2, 37.
- Paschka, A.G., Butler, R. and Young, C.Y.F. (1998) Induction of apoptosis in prostate cancer cell lines by the green tea component, (-)-epigallocatechin-3-gallate. Cancer Lett. 130, p. 1-7.
- Ravindranath, M. H., Saravanan, T.S., Monteclaro, C.C., Presser, N., Ye, X., Selvan S.R. and Brosman, S. (2006) Epicatechins Purified from Green Tea (Camellia sinensis) Differentially Suppress Growth of Gender-Dependent Human Cancer Cell Lines. Oxford journal 3(2), p.237-247.
- Rietveld, A. and Wiseman, S. (2003) Antioxidant Effects of Tea: Evidence from Human Clinical Trials. The American Society for Nutrition Science. J. Nutr. 133, p. 3285S-3292S.
- Robertson, A. (1992) The chemistry and biochemistry of black tea production, the non volatiles. In: K.C. Wilson and M.N. Clifford, Editors, Tea: Cultivation to consumption, Chapman and Hall, London, UK, p. 555–601.
- Robinson, J.M. and Owuor, P.O. (1992) Tea aroma. In K.G. Willson and M.N. Clifford (eds), tea: cultivation to consumption, Chapman and Hall, London, p. 603-647.
- Thumvijit, S. (1999) Effect of lemon grass extract on rat hepatic and intestinal xenobiotic-metabolizing enzymes. Master Thesis, Chiang Mai University, Chiang Mai.
- Uesato, S., Kitagawa, Y., Hara, Y., Tokuda, H., Okuda, M., Mou, M.O., Mou, X.Y., Mukainaka T. and Nishino, H. (2000) Antitumor Promoting Activities of 3-O-Acyl(-)-Epigallocatechins. Bioorg. Med. Chem. Lett. 10, p. 1673.
- Weisburger, J. H., Rivenson, A., Reinhardt, J., Aliaga, C., Braley, J., Pittman, B., and Zang, E. (1998) Effect of black tea on azoxymethane-induced colon cancer. Carcinogenesis (Lond.), 19, p. 229–232.
- Yang, G. Y., Liu, Z., Seril, D. N., Liao, J., Ding, W., Kim, S., Bondoc, F., and Yang, C. S. (1997) Black tea constituents, theaflavins, inhibit 4-methylnitrosamino-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK)-induced lung tumorigenesis in A/J mice. Carcinogenesis (Lond.), 18 p. 2361–2365.

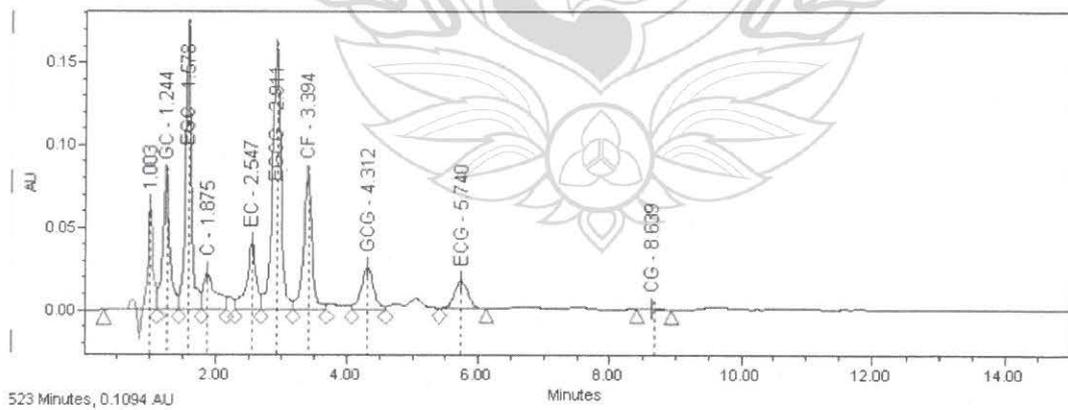
ภาคผนวก ก.



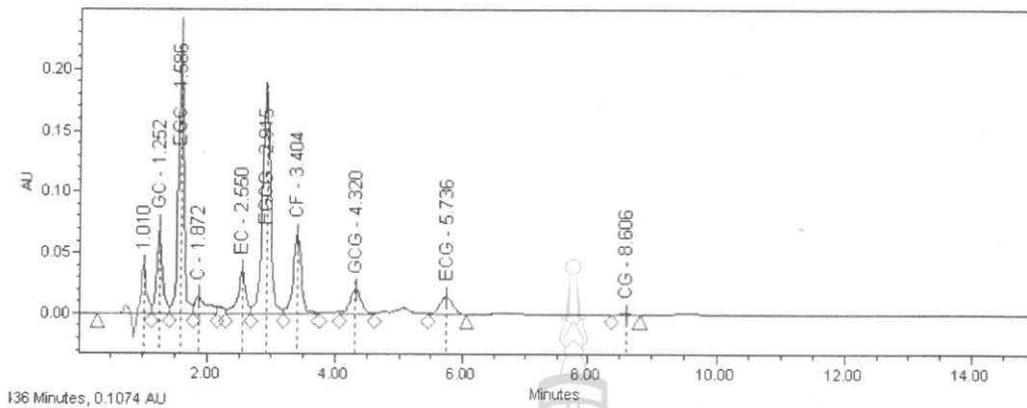
ภาพที่ ก-1 แสดงโครมาโตแกรมของคาเทชินในชาเขียวที่ผลิตจากชาสายพันธุ์อัสสัม



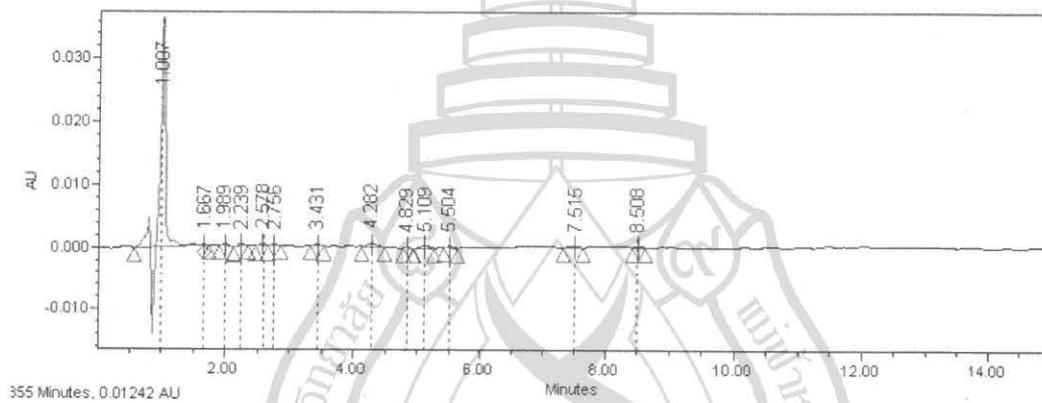
ภาพที่ ก-2 แสดงโครมาโตแกรมของคาเทชินในชาดำที่ผลิตจากชาสายพันธุ์อัสสัม



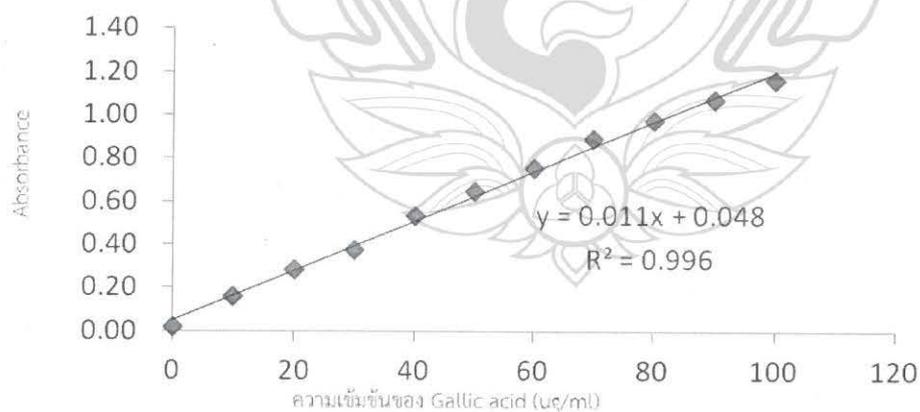
ภาพที่ ก-3 แสดงโครมาโตแกรมของคาเทชินในชาเขียวที่ผลิตจากชาสายพันธุ์อู่หลงเบอร์ 12



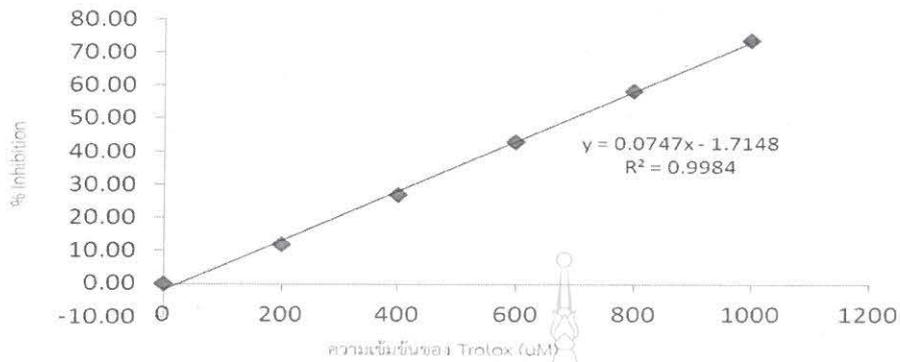
ภาพที่ ก-4 แสดงโครมาโตแกรมของคาเทชินในซอ้หลังที่ผลัดจากชาสายพันธุ์อู่หลงเบอร์ 12



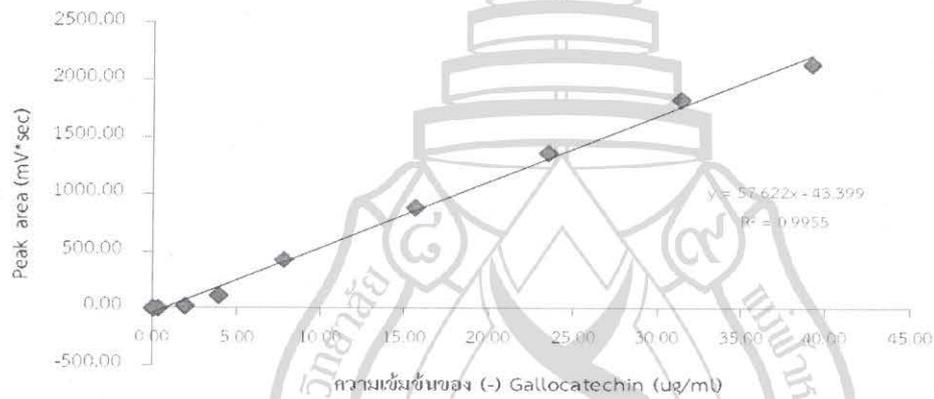
ภาพที่ ก-5 แสดงโครมาโตแกรมของคาเทชินในชาตะไคร้



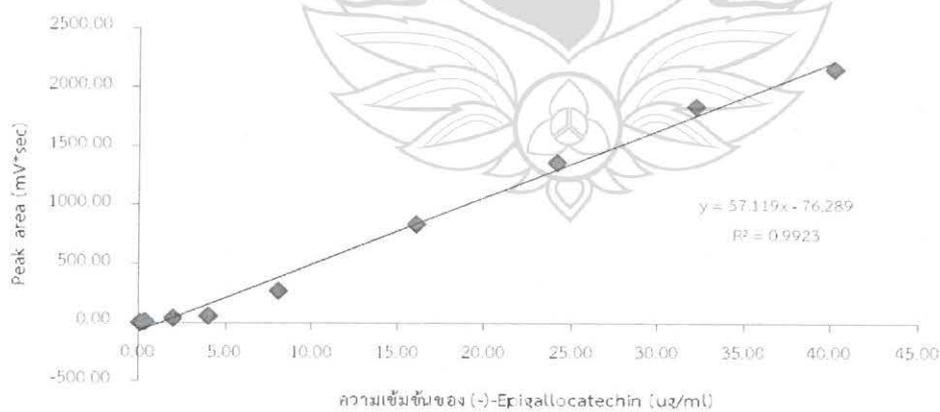
ภาพที่ ก-6 กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการคำนวณปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดของตัวอย่างชาแต่ละชนิด



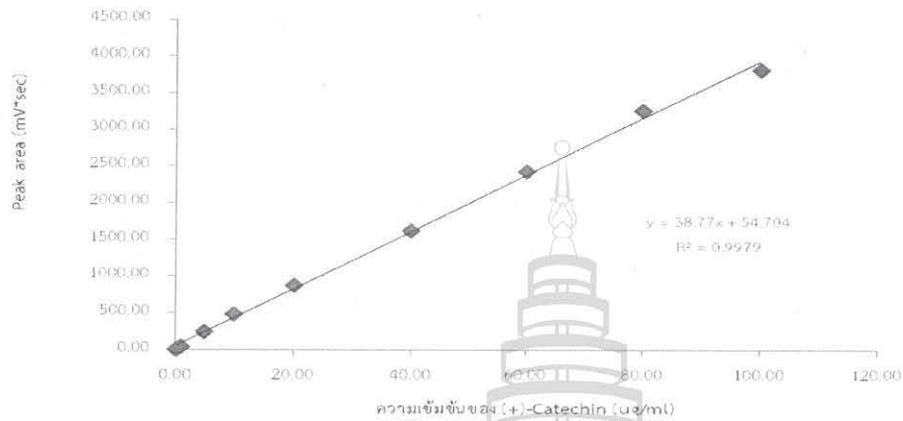
ภาพที่ ก-7 กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการคำนวณความสามารถในการจับอนุมูลอิสระของตัวอย่างชาแต่ละชนิด



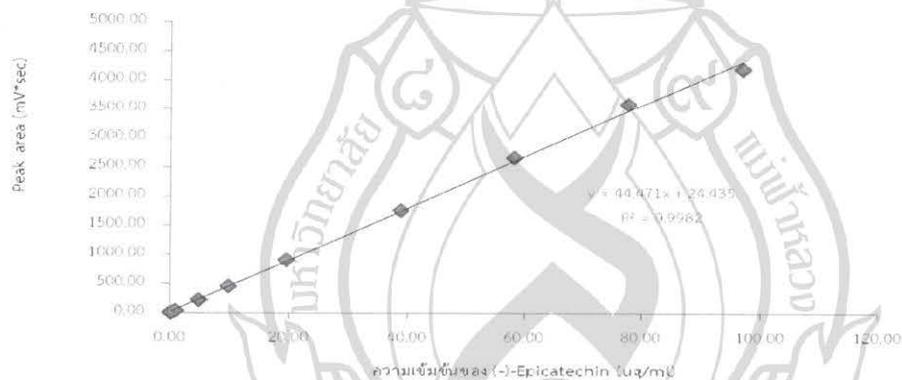
ภาพที่ ก-8 กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการคำนวณปริมาณสาร (-) Gallocatechin ในตัวอย่างชาแต่ละชนิด



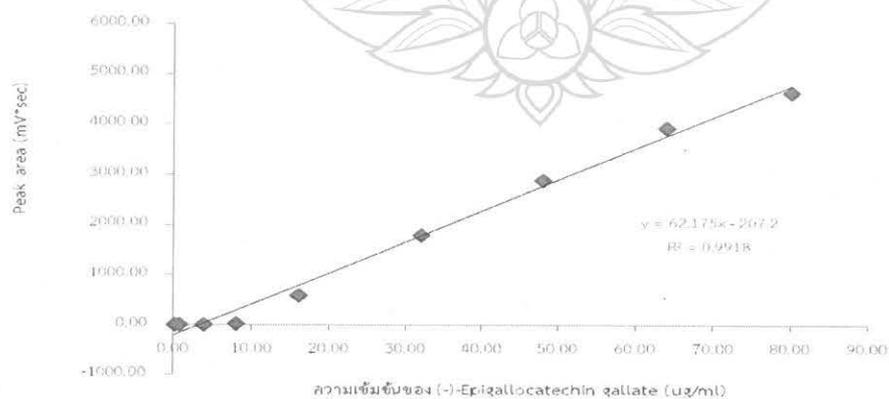
ภาพที่ ก-9 กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการคำนวณปริมาณสาร (-)-Epigallocatechin ในตัวอย่างชาแต่ละชนิด



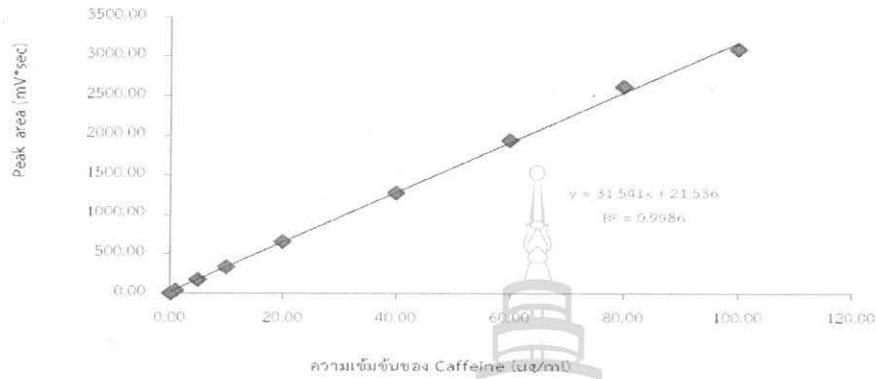
ภาพที่ ก-10 กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการคำนวณปริมาณสาร (+)-Catechin ในตัวอย่างชาแต่ละชนิด



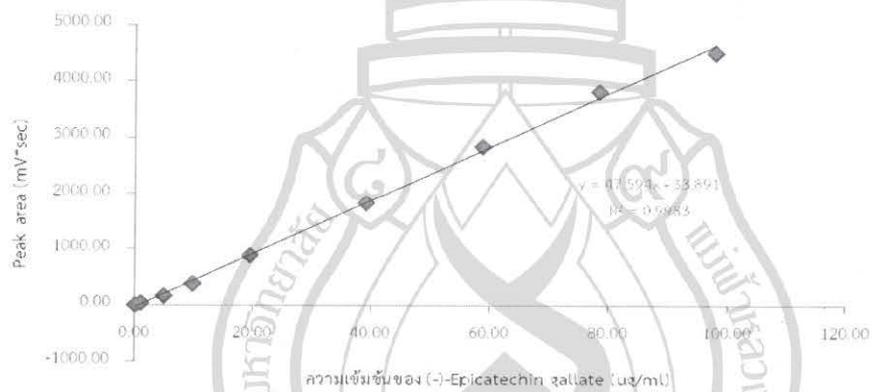
ภาพที่ ก-11 กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการคำนวณปริมาณสาร (-)-Epicatechin ในตัวอย่างชาแต่ละชนิด



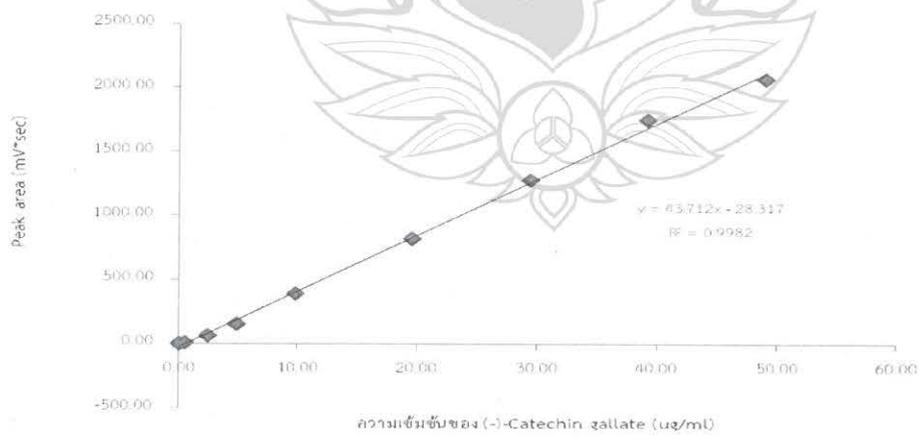
ภาพที่ ก-12 กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการคำนวณปริมาณสาร (-)-Epigallocatechin gallate



ภาพที่ ก-13 กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการคำนวณปริมาณสาร Caffeine ในตัวอย่างชาแต่ละชนิด



ภาพที่ ก-14 กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการคำนวณปริมาณสาร (-)-Epicatechin gallate ในตัวอย่างชา



ภาพที่ ก-15 กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการคำนวณปริมาณสาร (-)-Catechin gallate ในตัวอย่างชา

ประวัตินักวิจัย

หัวหน้าโครงการ

1. ชื่อ - สกุล นางสาวนัญญา คนชื้อ
Miss Nattaya Konsue
2. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ สาขาวิชาเทคโนโลยีการอาหาร
สำนักวิชาอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง
ที่อยู่ 333 ม. 1 ต. ท่าสูด อ. เมือง จ. เชียงราย 57100
โทรศัพท์ 053-916-751 โทรสาร 053-916-739
E-mail address nattaya.kon@mfu.ac.th
3. ประวัติการศึกษา
วท.บ. (เทคโนโลยีอาหาร) มหาวิทยาลัยขอนแก่น (2541)
วท.ม. (วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร) มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
(2545)
ปร.ด. (Food Toxicology) University of Surrey, England (2553)

ผู้ร่วมวิจัย

1. ชื่อ - สกุล นางสาวนลิน อารียา
Miss Nlin Arya
2. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
ที่อยู่ 999 ถนนพุทธมณฑลสาย4 ศาลา พุทธมณฑล นครปฐม
73170
โทรศัพท์ 02-441-5242 ต่อ 1523 โทรสาร 02-441-0937
E-mail address vsnlin@staff2.mahidol.ac.th
3. ประวัติการศึกษา
สพ.บ. (สัตวแพทยศาสตร์) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (2540)
วท.ม. (สรีรวิทยาการสัตว) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (2545)
ปร.ด. (Food Toxicology) University of Surrey, England
(2553)

ผู้ร่วมวิจัย

1. ชื่อ - สกุล นายธีรพงษ์ เทพกรณ์
Mr. Theerapong Theppakorn
2. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ สาขาวิชาเทคโนโลยีการอาหาร
สำนักวิชาอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง
- ที่อยู่ 333 ม. 1 ต. ท่าสุค อ. เมือง จ. เชียงราย 57100
- โทรศัพท์ 053-916-750 โทรสาร 053-916-739
- E-mail address theerapong@mfu.ac.th

3. ประวัติการศึกษา

Doctor of Philosophy in Biotechnology
Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand
Bachelor of Science in Industrial Chemistry (1st Class Honors)
Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand.

