

การสังเคราะห์อนุพันธ์ของพอลิฟีนอลจากสารสกัดใบชาเขียวด้วยปฏิกิริยาควบคู่
ระหว่างพอลิฟีนอลจากสารสกัดใบชาเขียวกับกรดพาราเมทอกซีซินนามิก

**Synthesis of Green Tea Polyphenols Derivatives by Coupling Reaction of
Green Tea Polyphenols with *p*-Methoxycinnamic Acid**



โดย

นายณัฐพล ตันติเมฆิน เลขประจำตัว 5333073023

นายกวินท์ วรพัฒนานุกูล เลขประจำตัว 5333055723

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2556

เรื่อง การสังเคราะห์อนุพันธ์ของพอลิฟินอลจากสารสกัดใบชาเขียวด้วย
ปฏิกิริยาควมคู่ระหว่างพอลิฟินอลจากสารสกัดใบชาเขียวกับกรดพารา
เมทอกซีซินนามิก

โดย นายณัฐพล

ตันติเมฆิน

นายกวินท์

วรวัฒนากุล

ได้รับการอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบโครงการ

..... ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พัชตรา สวัสดิ์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ ดร.ศุภศร วณิชเวชารุ่งเรือง)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุชาดา จุณวัฒน์กุล)

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยหัวหน้าภาควิชาเคมี

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร. วุฒิชัย พาราสุข)

หัวหน้าภาควิชาเคมี

วันที่เดือน.....พ.ศ.....

ชื่อโครงการ การสังเคราะห์อนุพันธ์ของพอลิฟีนอลจากสารสกัดใบชาเขียวด้วยปฏิกิริยาควบคู่
ระหว่างพอลิฟีนอลจากสารสกัดใบชาเขียวกับกรดพาราเมทอกซีซินนามิก

ชื่อนิสิตในโครงการ 1. นายณัฐพล ตันติเมฆิน เลขประจำตัว 5333073023
2. นายกวินท์ วรพัฒนานุกุล เลขประจำตัว 5333055723

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ. ดร. ศุภคร วณิชเวชารุ่งเรือง

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2556

บทคัดย่อ

สารพอลิฟีนอลที่พบในชาเขียวมีสมบัติต่าง ๆ มากมาย เช่น การต้านอนุมูลอิสระและการต้านการอักเสบ งานวิจัยนี้ทำการสกัดพอลิฟีนอลจากใบชา จากนั้นนำสารที่ได้มาทำปฏิกิริยาควบคู่กับกรดพาราเมทอกซีซินนามิก ได้ผลิตภัณฑ์เป็นอนุพันธ์ของพอลิฟีนอลพาราเมทอกซีซินนามิตพบว่ามีผลิตภัณฑ์ที่ได้มีการดูดกลืนรังสียูวีกว้าง โดยมีการดูดกลืนรังสีสูงสุดที่ 310 นาโนเมตร การทดสอบสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity พบว่าสารผลิตภัณฑ์มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี การทดสอบฤทธิ์ในการต้านการอักเสบพบว่าสารผลิตภัณฑ์มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบที่ดีด้วย

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำสำคัญ: พอลิฟีนอล, กรดพาราเมทอกซีซินนามิก, อนุพันธ์ของพอลิฟีนอล

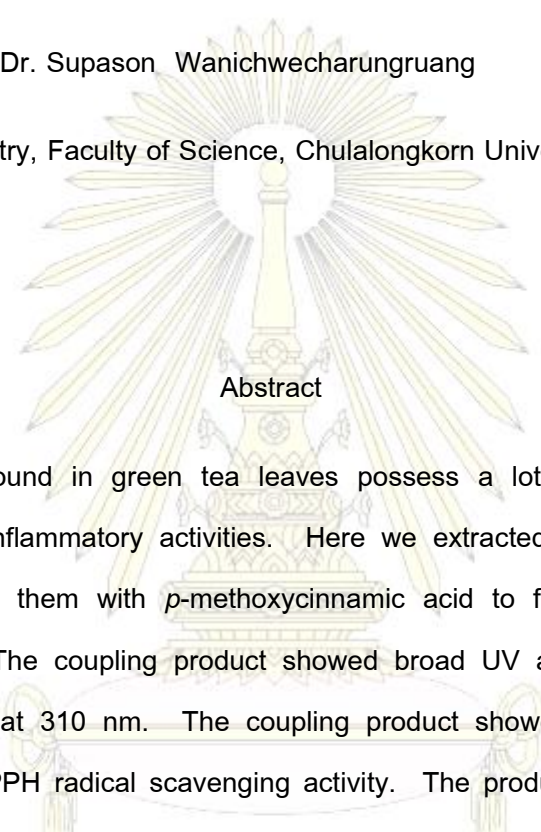
Title Synthesis of Green Tea Polyphenols Derivatives by Coupling Reaction of
Green Tea Polyphenols with *p*-Methoxycinnamic Acid

Student names 1. Mr. Natthapol Tantimekin ID 5333073023

2. Mr. Kwin Vorravattananukul ID 5333055723

Advisor Assoc. Prof. Dr. Supason Wanichwecharungruang

Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Academic year
2013



Abstract

Polyphenols found in green tea leaves possess a lot of benefits such as antioxidant and anti-inflammatory activities. Here we extracted polyphenol from tea leaves, then coupling them with *p*-methoxycinnamic acid to form polyphenol *para*-methoxycinnamate. The coupling product showed broad UV absorption profile with maximum absorption at 310 nm. The coupling product showed antioxidant activity when analysed by DPPH radical scavenging activity. The product also showed good anti-inflammatory activity.

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Keywords: polyphenol, *p*-methoxycinnamic acid, polyphenol derivative

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้บรรลุผลสำเร็จลุล่วงได้เป็นอย่างดี เนื่องจากได้รับความช่วยเหลือจากรศ. ดร. ศุภศร วณิชเวชารุ่งเรือง อาจารย์ที่ปรึกษาในโครงการวิจัยนี้ที่ให้ความรู้และคำแนะนำเกี่ยวกับวิธีการทดลอง การวิเคราะห์ผลการทดลอง รวมถึงช่วยแก้ปัญหาที่เกิดขึ้นขณะวิจัย ตลอดจนชี้แนะแนวทางในการปรับปรุงเพื่อพัฒนางานวิจัยในอนาคต ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งและขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ผู้วิจัยขอขอบคุณนางสาวนพพร วิรัตน์เกษม นิสิตบัณฑิตศึกษาที่ช่วยให้ความรู้คำแนะนำเรื่องการใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆ ในห้องทดลอง ตลอดจนให้ความช่วยเหลือในทุกๆ ด้าน จึงทำให้โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอขอบพระคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้อนุเคราะห์สถานที่ ซึ่งเป็นแหล่งให้ความรู้และฝึกทักษะอันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อผู้ทำการวิจัย รวมทั้งให้การสนับสนุนด้านเงินทุนการวิจัย และเครื่องมือ ในการทำวิจัยในครั้งนี้ ให้ประสบความสำเร็จลุล่วงไปได้อย่างดี

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	
สารบัญรูปภาพ แผนภาพ และตาราง	ช
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ญ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการดำเนินโครงการ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ	6
บทที่ 2 หลักการและทฤษฎี	7
2.1 การสกัดสารพอลิฟีนอลจากใบชาเขียว	7
2.2 การเกิดปฏิกิริยาควมคูโดยใช้ EDCI กับ HOBt	8
2.3 การทดสอบ MTT assay	9
2.4 การทดสอบ Nitric oxide assay	9
2.5 การทดสอบ DPPH radical scavenging activity	10
บทที่ 3 วิธีการทดลอง	11
3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์	11
3.2 สารเคมี	11
3.3 การสกัดสารพอลิฟีนอลจากใบชาเขียว	12
3.4 การสังเคราะห์ GTP- <i>p</i> -methoxycinnamate	12
3.5 การทำ GTP- <i>p</i> -methoxycinnamate ให้บริสุทธิ์	13
3.5.1 Liquid-liquid extraction	13
3.5.2 Dialysis	13
3.6 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของ GTP- <i>p</i> -methoxycinnamate	13

3.7 การทดสอบสมบัติของ GTP- <i>p</i> -methoxycinnamate	14
3.7.1 การทดสอบความเสถียรต่อความร้อน	14
3.7.2 การทดสอบการต้านการอักเสบ	14
3.7.2.1 MTT assay	14
3.7.2.2 Nitric oxide assay	14
3.7.3 การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระ	15
3.7.3.1 DPPH radical scavenging activity	15
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง	16
4.1 ผลการสกัดสารพอลิฟีนอลจากใบชาเขียว	16
4.2 ผลการสังเคราะห์ และการแยก GTP- <i>p</i> -methoxycinnamate	17
4.2.1 การสังเคราะห์และการแยกโดยใช้ GTP ที่ทำการสกัดเอง	17
4.2.2 การสังเคราะห์และการแยกโดยใช้ GTP ที่ได้จากบริษัทบุญรอดฯ	18
4.3 ผลการวิเคราะห์สารตั้งต้นและผลิตภัณฑ์ด้วย UV-Visible spectroscopy	19
4.4 ผลการทดลองวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ด้วย Thin- layer chromatography (TLC) และ Nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR)	22
4.4.1 การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ด้วย TLC	22
4.4.2 การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ด้วย NMR	23
4.5 ผลการทดสอบความเสถียรต่อความร้อน โดยการวิเคราะห์ด้วย NMR	27
4.6 ผลการทดสอบการต้านการอักเสบและการต้านอนุมูลอิสระ	30
4.6.1 การทดสอบการต้านการอักเสบ	30
4.6.2 การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระด้วย DPPH radical scavenging activity	31
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	33
5.1 สรุปผลการทดลอง	33
5.2 ข้อเสนอแนะ	33
เอกสารอ้างอิง	34
ประวัติผู้วิจัย	35
ภาคผนวก	36

สารบัญรูปลูกภาพ แผนภาพ และตาราง

	หน้า
รูปที่ 1.1 โครงสร้างของ catechins ที่พบในชา	2
รูปที่ 1.2 กลไกการเกิดโทษของรังสี UV-A ต่อผิวหนัง	3
รูปที่ 1.3 กลไกการเกิดโทษของรังสี UV-B ต่อผิวหนัง	4
รูปที่ 1.4 โครงสร้างของกรดพาราเมทอกซีซินนามิก	4
รูปที่ 1.5 ความสามารถในการดูดกลืนรังสีของ <i>p</i> -methoxycinnamic acid กับอนุพันธ์ ของ <i>p</i> -methoxycinnamic acid	5
รูปที่ 2.1 โครงสร้างของ catechins ที่พบมากในชา	7
รูปที่ 2.2 ปฏิกริยาการเกิด GTP- <i>p</i> -methoxycinnamate โดยใช้ EDCI กับ HOBt	8
รูปที่ 2.3 กลไกการเกิดปฏิกิริยาควบคู่โดยใช้ EDCI กับ HOBt	8
รูปที่ 2.4 ปฏิกริยาการเปลี่ยนสาร MTT เป็น formazan product	9
รูปที่ 2.5 Griess reaction	10
รูปที่ 2.6 ปฏิกริยาออกซิเดชันของ DPPH กับสารต้านอนุมูลอิสระ	10
รูปที่ 3.1 Well plate 96 หลุม	15
ตารางที่ 4.1 แสดงผลการสกัดสารพอลิฟีนอลจากใบชาเขียว	16
แผนภาพที่ 4.1 การสกัดสารพอลิฟีนอลจากใบชาเขียว	16
ตารางที่ 4.2 แสดงผลการสังเคราะห์และการแยกโดยใช้ GTP ที่ทำการสกัดเอง	17
แผนภาพที่ 4.2 การสังเคราะห์และการแยกโดยใช้ GTP ที่ทำการสกัดเอง	18
ตารางที่ 4.3 แสดงผลการสังเคราะห์และการแยกโดยใช้ GTP ที่ได้จากบริษัทบุญรอดฯ	18
แผนภาพที่ 4.3 การสังเคราะห์และการแยกโดยใช้ GTP ที่ได้จากบริษัทบุญรอดฯ	19
รูปที่ 4.1 UV spectrum ของ GTP ที่สกัดเองเทียบกับที่ได้จากบริษัทบุญรอดฯ	20
รูปที่ 4.2 UV spectrum ของผลิตภัณฑ์จาก GTP ที่สกัดเองเทียบกับที่ได้จาก บริษัทบุญรอดฯ (W2 และ W2-B)	20
รูปที่ 4.3 UV spectrum ของ <i>p</i> -methoxycinnamic acid และ GTP เทียบกับผลิตภัณฑ์ จาก GTP ที่สกัดเอง	21

รูปที่ 4.4	UV spectrum ของ <i>p</i> -methoxycinnamic acid และ GTP เทียบกับผลิตภัณฑ์จาก GTP ที่ได้จากบริษัทบุญรอดฯ	22
รูปที่ 4.5	ผล TLC ของการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์โดยใช้ GTP ที่สกัดเอง	22
รูปที่ 4.6	ผล TLC ของการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์โดยใช้ GTP ที่ได้จากบริษัทบุญรอดฯ	23
รูปที่ 4.7	¹ H-NMR ของผลิตภัณฑ์จาก GTP ที่สกัดเองในชั้นคลอโรฟอร์ม (C1)	24
รูปที่ 4.8	¹ H-NMR ของผลิตภัณฑ์จาก GTP ที่ได้จากบริษัทบุญรอดในชั้นคลอโรฟอร์ม (C1-B)	24
รูปที่ 4.9	¹ H-NMR ของผลิตภัณฑ์จาก GTP ที่สกัดเองในชั้นน้ำ (W1)	25
รูปที่ 4.10	¹ H-NMR ของผลิตภัณฑ์จาก GTP ที่ได้จากบริษัทบุญรอดในชั้นน้ำ (W1-B)	25
รูปที่ 4.11	¹ H-NMR ของผลิตภัณฑ์จาก GTP ที่สกัดเองในชั้นน้ำหลังทำไดอะไลซิส (W2)	26
รูปที่ 4.12	¹ H-NMR ของผลิตภัณฑ์จาก GTP ที่ได้จากบริษัทบุญรอดในชั้นน้ำหลังทำไดอะไลซิส (W2-B)	27
รูปที่ 4.13	¹ H-NMR ของผลิตภัณฑ์จาก GTP ที่สกัดเองในชั้นน้ำหลังทำไดอะไลซิส (W2) ก่อนการให้ความร้อน	28
รูปที่ 4.14	¹ H-NMR ของผลิตภัณฑ์จาก GTP ที่สกัดเองในชั้นน้ำหลังทำไดอะไลซิส (W2) ที่ผ่านการให้ความร้อนแล้ว	28
รูปที่ 4.15	¹ H-NMR ของผลิตภัณฑ์จาก GTP ที่ได้จากบริษัทบุญรอดฯในชั้นน้ำหลังทำไดอะไลซิส (W2-B) ก่อนการให้ความร้อน	29
รูปที่ 4.16	¹ H-NMR ของผลิตภัณฑ์จาก GTP ที่ได้จากบริษัทบุญรอดฯในชั้นน้ำหลังทำไดอะไลซิส (W2-B) ที่ผ่านการให้ความร้อนแล้ว	29
รูปที่ 4.17	ผล MTT ของ <i>p</i> -MCA, GTP, GTP-B, W2, และ W2-B	30
รูปที่ 4.18	ผล Nitric oxide assay ของ <i>p</i> -MCA, GTP, GTP-B, W2, และ W2-B	31
รูปที่ 4.19	แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง %Inhibition กับค่า log ของความเข้มข้นของ GTP เทียบกับผลิตภัณฑ์จาก GTP ที่สกัดเอง	31
รูปที่ 4.20	แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง %Inhibition กับค่า log ของความเข้มข้นของ GTP เทียบกับผลิตภัณฑ์จาก GTP ที่ได้จากบริษัทบุญรอด	32
ตารางที่ 4.4	ค่า IC ₅₀ ของสารต่างๆที่ใช้ในการทดลอง DPPH radical scavenging activity	32

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

$^1\text{H-NMR}$	=	proton nuclear magnetic resonance spectroscopy
$^{\circ}\text{C}$	=	degree Celsius
δ	=	chemical shift
λ_{max}	=	maximum wavelength
μL	=	microliter
<i>p</i> -MCA	=	<i>p</i> -methoxycinnamic acid
ATR-IR	=	attenuated total reflectance infrared
C	=	(+)-catechin
C1	=	ผลิตภัณฑ์จาก GTP ที่สกัดเองในชั้นคลอโรฟอร์ม
C1-B	=	ผลิตภัณฑ์จาก GTP ที่ได้จากบริษัทบุญรอดฯ ในชั้นคลอโรฟอร์ม
CG	=	(-)-catechin gallate
CHCl_3	=	chloroform
conc.	=	concentration
CPDs	=	cyclobutane pyrimidine dimers
D	=	dalton
DMF	=	dimethylformamide
DMSO-d_6	=	dimethyl sulfoxide- d_6
DNA	=	deoxyribonucleic acid
DPPH	=	di(phenyl)-(2,4,6-trinitrophenyl)iminoazanium
EC	=	(-)-epicatechin
ECG	=	(-)-epicatechin gallate
EDCI	=	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide
EGC	=	(-)-epigallocatechin
EGCG	=	(-)-epigallocatechin gallate
FT	=	Fourier transform
g	=	gram

GC	=	(+)-gallocatechin
GCG	=	(-)-gallocatechin gallate
GTP	=	green tea polyphenol
GTP	=	GTP ที่สกัดเอง
GTP-B	=	GTP ที่ได้จากบริษัทบุญรอดฯ
h	=	hour
H ₂ O	=	water
HOBt	=	hydroxybenzotriazole
IC ₅₀	=	half maximal inhibitory concentration
log	=	logarithm
MeOH	=	methanol
mg	=	milligram
mL	=	milliliter
mM	=	millimolar
mmol	=	millimole
mol	=	mole
MS	=	mass spectrometry
MTT	=	3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide
MW	=	molecular weight
MWCO	=	molecular weight cut-off
N/A	=	not applicable or not available
NED	=	<i>N</i> -1-naphthylethylenediamine dihydrochloride
NER	=	nucleotide excision repair
nm	=	nanometer
NMR	=	nuclear magnetic resonance spectroscopy
NOx	=	nitric oxide
OD	=	optical density
ppm	=	part per million

- TLC = thin-layer chromatography
- UV = ultraviolet
- W1 = ผลิตภัณฑ์จาก GTP ที่สกัดเองในชั้นน้ำ
- W1-B = ผลิตภัณฑ์จาก GTP ที่ได้จากบริษัทบุญรอดฯในชั้นน้ำ
- W2 = ผลิตภัณฑ์จาก GTP ที่สกัดเองในชั้นน้ำหลังทำไดอะไลซิส
- W2-B = ผลิตภัณฑ์จาก GTP ที่ได้จากบริษัทบุญรอดฯในชั้นน้ำหลังทำไดอะไลซิส



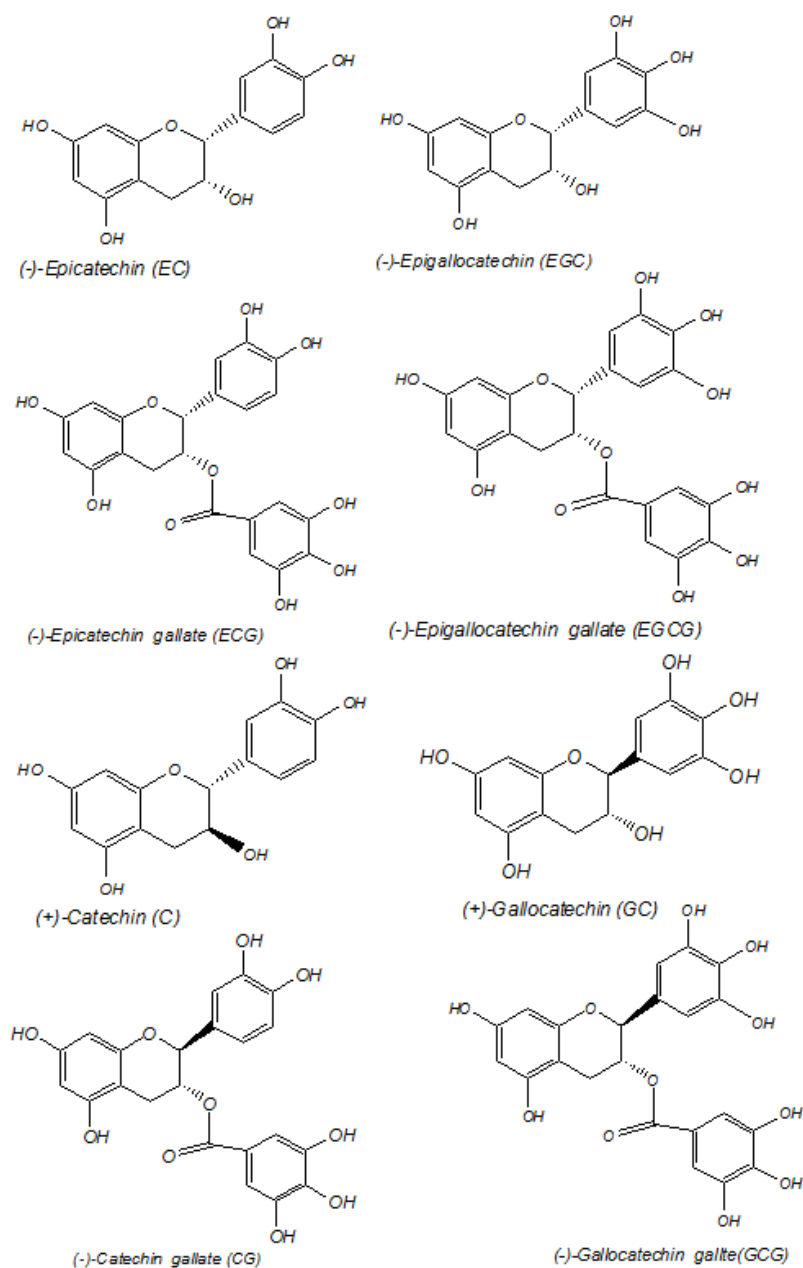
ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการดำเนินโครงการ

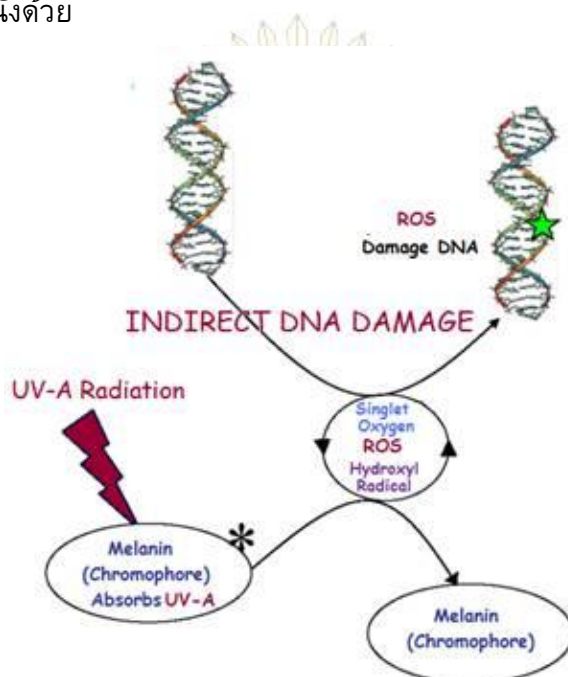
พอลิฟีนอลในชาเขียว (green tea polyphenol, GTP) ส่วนใหญ่เป็น catechins ซึ่งเป็นสารประกอบฟีนอล (phenolic compound) ประเภทพอลิฟีนอล (polyphenol) ในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ที่พบมากในใบชาเขียว (*Camellia sinensis*) เป็นสารโภชนเภสัช (nutraceutical) ที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพเนื่องจากมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และเป็น chelating agent ที่รวมตัวกับไอออนของโลหะหนักได้ catechins มีประมาณ 60-70% ของพอลิฟีนอลทั้งหมดในชา กลุ่มของ catechins ที่พบมากในชาได้แก่ (-)-epigallocatechin gallate (EGCG), (-)-epigallocatechin (EGC), (-)-epicatechin gallate (ECG) และ (-)-epicatechin (EC) โดย catechins เหล่านี้มีอยู่ประมาณ 90% ของ catechins ทั้งหมด กลุ่มของ catechins ที่พบในปริมาณน้อยลงมาได้แก่ (+)-gallocatechin (GC), (+)-catechin (C), (-)-gallocatechin gallate (GCG) และ (-)-catechin gallate (CG) catechins เป็นสารไม่มีสี ละลายได้ในน้ำ ให้รสขมและฝาด ปริมาณ catechins ในใบชามีผลต่อ สี กลิ่น และรสชาติของชา ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณ catechins ในชาได้แก่ พันธุ์ของชา ฤดูที่ทำการเพาะปลูก การเก็บเกี่ยว และระยะความอ่อน-แก่ของใบชา ชาในฤดูใบไม้ผลิ (รุ่นแรก) มี catechins ประมาณ 12-13% ขณะที่ชาในฤดูร้อน (รุ่นสองและสาม) มี catechins ประมาณ 13-14% ในชาอ่อนมีปริมาณ catechins มากกว่าใบชาแก่ ชาขาวและชาเขียวมีปริมาณ catechins มากกว่าชาที่ผ่านการคลั่งใบชาและการหมักเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาล (enzymatic browning reaction) เช่น ชาดำและชาอู่หลง



รูปที่ 1.1 โครงสร้างของ catechins ที่พบในชา

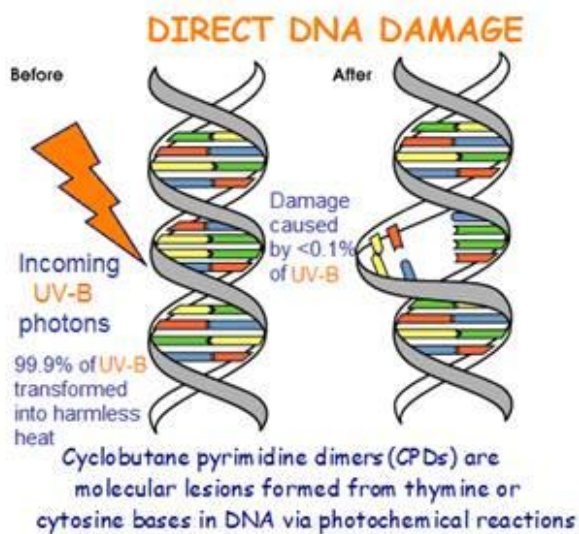
รังสียูวี (ultraviolet, UV) เป็นคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่มีความยาวคลื่นในช่วง 100-400 nm สามารถแบ่งออกเป็น 3 ชนิดคือ รังสี UV-A มีความยาวคลื่นในช่วง 315-400 nm รังสี UV-B มีความยาวคลื่นในช่วง 280-315 nm และรังสี UV-C มีความยาวคลื่นในช่วง 100-280 nm ซึ่ง รังสี UV-C มีพลังงานสูงสุดจึงเป็นอันตรายที่สุดแต่เนื่องจากมีความยาวคลื่นสั้นจึงถูกรองโดย

ชั้นบรรยากาศแต่อาจมีการปลดปล่อยรังสีนี้ออกมาจากเครื่องฆ่าเชื้อในน้ำดื่มและอื่นๆได้ ส่วนรังสี UV-A กับ UV-B สามารถผ่านชั้นบรรยากาศลงมาถึงพื้นผิวโลกได้ซึ่งส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตบนโลกที่ได้รับรังสีนี้ โดยรังสี UV-A สามารถทะลุทะลวงผ่านผิวหนังได้ลึกจึงไปกระตุ้นให้เกิดการสร้างเมลานิน (melanin) ทำให้ผิวหนังมีสีเข้มขึ้นและรังสี UV-A ยังมีความสามารถในการก่อให้เกิดอนุมูลอิสระได้ อนุมูลอิสระนี้จะไปทำลายดีเอ็นเอ (DNA) ทำให้มีโอกาสเป็นมะเร็งผิวหนังด้วย

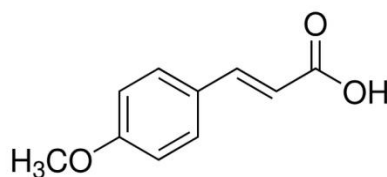


รูปที่ 1.2 กลไกการเกิดโทษของรังสี UV-A ต่อผิวหนัง

ส่วนรังสี UV-B มีความสามารถในการสามารถทะลุทะลวงผ่านผิวหนังน้อยกว่ารังสี UV-A แต่มีพลังงานสูงกว่าจึงสามารถเข้าไปทำลาย DNA ได้โดยตรงทำให้เกิด cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs) จากการแตกออกของเบสไทมีน (thymine) หรือไซโทซีน (cytosine) ใน DNA ผ่านปฏิกิริยาเคมีแสง (photochemical reaction) ซึ่งทำให้เกิดอาการไหม้แดด (sunburn) และก่อให้เกิดการแก่ก่อนวัย



รูปที่ 1.3 กลไกการเกิดโทษของรังสี UV-B ต่อผิวหนัง

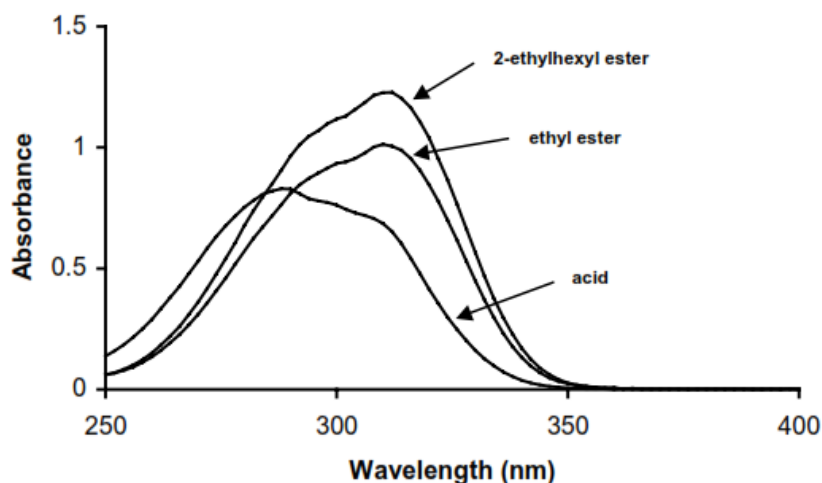


รูปที่ 1.4 โครงสร้างของกรดพาราเมทอกซีซินนามิก

กรดพาราเมทอกซีซินนามิก (*p*-methoxycinnamic acid) เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สารกรองรังสี เช่น octyl methoxycinnamate (ethylhexyl methoxycinnamate), Isoamyl *p*-methoxycinnamate เป็นต้น ซึ่งเป็นสารกรองรังสีที่มีการดูดกลืนรังสี UV ในช่วง UV-B สูงจึงมักถูกนำไปใช้เป็นส่วนผสมของครีมกันแดด ความสามารถในการดูดกลืนรังสีของ *p*-methoxycinnamic acid กับอนุพันธ์ของ *p*-methoxycinnamic acid ¹ แสดงดังรูปที่ 1.5

UV spectrum of ethyl *trans*-4-methoxycinnamate, 2-ethylhexyl *trans*-4-methoxycinnamate and *trans*-4-methoxycinnamic acid (95% C₂H₅OH, all 4.08 x 10⁻⁵ M, 1 cm path length)

Acid: $\lambda_{\max} = 288 \text{ nm}$, $\epsilon = 2.03 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
 Ethyl ester: $\lambda_{\max} = 310 \text{ nm}$, $\epsilon = 2.47 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
 2-Ethylhexyl ester: $\lambda_{\max} = 312 \text{ nm}$, $\epsilon = 3.01 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$



รูปที่ 1.5 ความสามารถในการดูดกลืนรังสีของ *p*-methoxycinnamic acid กับอนุพันธ์ของ *p*-methoxycinnamic acid

ในโครงการนี้มีความสนใจที่จะนำพอลิฟีนอลจากใบชาเขียวซึ่งมีองค์ประกอบหลักเป็น (-)-epigallocatechin gallate (EGCG) มาใช้ในการทำการวิจัยเนื่องจาก EGCG มีสรรพคุณทางยา เช่น มีฤทธิ์ในการป้องกันมะเร็งผิวหนังโดยยับยั้งการเกิดผื่นแดงเนื่องจากรังสี UV-B ตลอดจนลดการเกิด cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs) ที่เกิดจาก DNA ถูกทำลายด้วยรังสี UV-B ได้² แล้วยังมีฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบ ต้านอนุมูลอิสระและสามารถรักษา DNA ที่ถูกทำลายจากรังสี UV-B ผ่านกลไก nucleotide excision repair (NER) นอกจากนี้พอลิฟีนอลในชาเขียว (ประกอบด้วย EGCG เป็นหลัก) ยังมีสมบัติในการดูดกลืนรังสี UV-B ได้ทั้งหมดและดูดรังสี UV-A กับ UV-C ได้บางส่วน³ (มีค่าการดูดกลืนรังสีสูงสุดที่ประมาณ 280 nm⁴)

จากคุณสมบัติที่น่าสนใจของ GTP ดังกล่าว ทั้งในด้านการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและด้านการดูดกลืนรังสีในช่วง UV ได้ ทำให้ GTP มีความน่าสนใจในการนำมาใช้ในการป้องกันรังสี UV และเพื่อเพิ่มความสามารถในการป้องกันรังสี UV ของ GTP จึงสนใจที่จะนำ *p*-methoxycinnamic acid ต่อเข้ากับโมเลกุลของ GTP ซึ่งคาดหวังว่าจะสามารถสร้างโมเลกุลที่มีค่าคงที่ของการดูดกลืนแสงในช่วง UV ที่สูงได้ ทั้งนี้เพราะ *p*-methoxycinnamic acid เป็นโคร

โมฟอร์ (chromophore) ที่สามารถดูดกลืนรังสี UV-B ได้ดีอยู่แล้วด้วย ดังนั้นการนำไปเชื่อมต่อกับ GTP น่าจะทำให้ได้สารที่มีฤทธิ์ทั้งการดูดกลืนรังสี UV ที่สูงขึ้น และสามารถต้านอนุมูลอิสระที่เกิดจากรังสี UV-A ได้อีกด้วย แล้วยังมีงานวิจัยที่บ่งชี้ว่าอนุพันธ์ของ EGCG ที่ถูกเพิ่มสมบัติความชอบละลายในไขมัน (lipophilized EGCG derivatives) โดย EGCG ไปทำปฏิกิริยากับกรดไขมันหลายชนิดพบว่า lipophilized EGCG derivatives มีสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น⁵ ซึ่ง *p*-methoxycinnamic acid ก็มีสมบัติไม่ละลายในน้ำ (ค่าการละลายน้ำที่ 25°C = 0.712 mg/mL) เหมือนกับกรดไขมันที่ถูกนำมาใช้ในการทดลองดังกล่าวจึงมีแนวโน้มว่าจะได้สารที่มีสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นเช่นกัน นอกจากนี้สารที่ได้น่าจะยังคงมีฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วยเพราะ GTP มีฤทธิ์นี้ การเชื่อม *p*-methoxycinnamic acid เข้ากับ GTP นั้นสามารถทำได้ผ่านการสร้างพันธะเอสเทอร์ระหว่างหมู่คาร์บอกซิลของ *p*-methoxycinnamic acid และหมู่ phenolic ของ GTP โดยในที่นี้จะใช้ปฏิกิริยาควบคู่ (coupling reaction) โดยใช้ 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDCI) กับ hydroxybenzotriazole (HOBt) เป็น coupling reagents ซึ่งมีข้อดีคือสามารถเกิดปฏิกิริยาได้โดยไม่ต้องอาศัยสภาวะที่รุนแรง

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ

สังเคราะห์ GTP-*p*-methoxycinnamate และทดสอบสมบัติการดูดกลืนรังสียูวี การต้านอนุมูลอิสระ การต้านการอักเสบ และความเสถียรของผลิตภัณฑ์

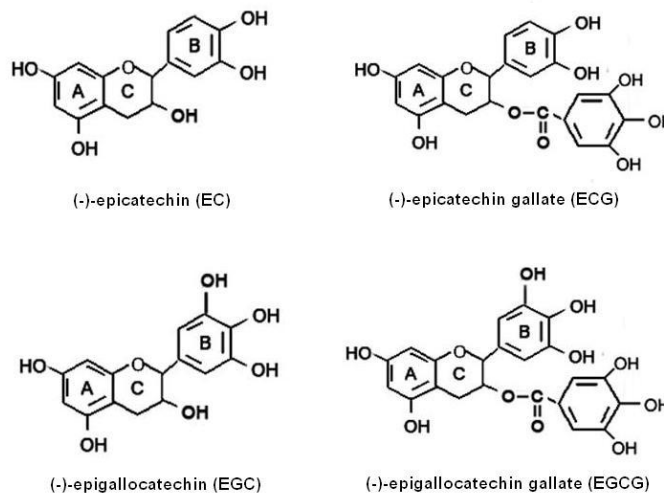
บทที่ 2

หลักการและทฤษฎี

2.1 การสกัดสารพอลิฟีนอลจากใบชาเขียว

การสกัดสารพอลิฟีนอลจากใบชาเขียวสามารถสกัดด้วยสารละลาย เช่น acetone, ethanol, methanol, acetonitrile และน้ำ โดยใช้เป็นตัวทำละลายบริสุทธิ์หรือตัวทำละลายผสมก็ได้ และสามารถสกัดได้ที่อุณหภูมิต่างๆ จะได้เป็นสารสกัดที่ประกอบไปด้วย สารกลุ่ม catechins (EC, EGC, ECG และ EGCG), caffeine, proanthocyanidins และสารกลุ่ม flavonols (myricetin, caempherol และ quercetin) ซึ่งสัดส่วนขององค์ประกอบต่างๆ ในสารสกัดจากใบชาที่ได้จะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของตัวทำละลาย และอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด⁶

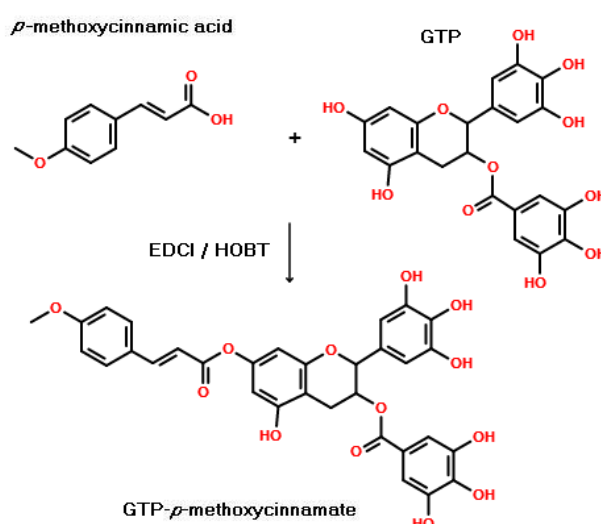
ในโครงการนี้เลือก methanol และใช้อุณหภูมิที่จุดเดือด (64.7 °C) ในการสกัดเพราะได้สารสกัดที่มีสัดส่วนของสารกลุ่ม catechins สูง และสามารถระเหย methanol ออกได้ง่ายอีกด้วย



รูปที่ 2.1 โครงสร้างของ catechins ที่พบมากในชา

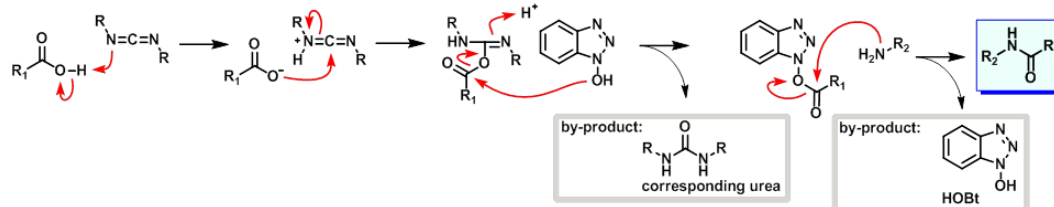
2.2 การเกิดปฏิกิริยาควมคู่โดยใช้ EDCI กับ HOBt

EDCI กับ HOBt เป็นสารที่นิยมใช้สร้างพันธะเอไมด์และพันธะเอสเทอร์ ซึ่งมักถูกนำไปใช้ในการสังเคราะห์เปปไทด์ (peptide) จากหมู่คาร์บอกซิลจากการดอะมิโน โดยเกิดผ่านสารประกอบเอสเทอร์ที่ไวต่อปฏิกิริยาและไม่ต้องการอุณหภูมิสูงในการทำปฏิกิริยา ในโครงการนี้จึงเลือกปฏิกิริยาควมคู่โดยใช้ EDCI กับ HOBt มาใช้ในการเชื่อม GTP เข้ากับ *p*-methoxycinnamic acid เพราะ GTP มีการสลายตัวที่อุณหภูมิสูง จึงต้องใช้ปฏิกิริยาที่ไม่รุนแรงในการทำปฏิกิริยา



รูปที่ 2.2 ปฏิกิริยาการเกิด GTP-*p*-methoxycinnamate โดยใช้ EDCI กับ HOBt

กลไกการเกิดปฏิกิริยาควมคู่โดยใช้ EDCI กับ HOBt จะเกิดผ่านสารมัธยันตร์ (intermediate) ต่างๆ ดังรูปที่ 2.3

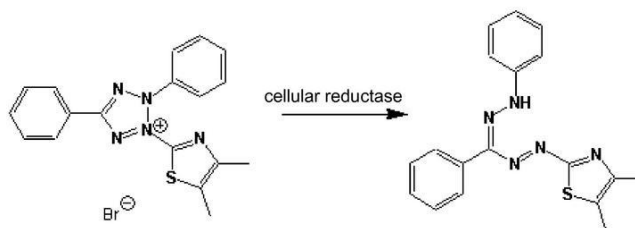


รูปที่ 2.3 กลไกการเกิดปฏิกิริยาควมคู่โดยใช้ EDCI กับ HOBt

จากรูปที่ 2.3 สามารถนำมาปรับใช้เพื่ออธิบายกลไกการเกิดปฏิกิริยาควคู่ระหว่าง GTP กับ *p*-methoxycinnamic acid ได้โดยเปลี่ยนจากการใช้หมู่เอมีนเป็นหมู่ phenolic ของ GTP เข้าชนที่คาร์บอนตำแหน่งคาร์บอนิล (carbonyl) ของสารประกอบเอสเทอร์ที่ไวต่อปฏิกิริยา (activated ester) ของ *p*-methoxycinnamic acid ที่ถูกกระตุ้นโดย EDCI กับ HOBt ได้เป็น GTP-*p*-methoxycinnamate

2.3 การทดสอบ MTT assay

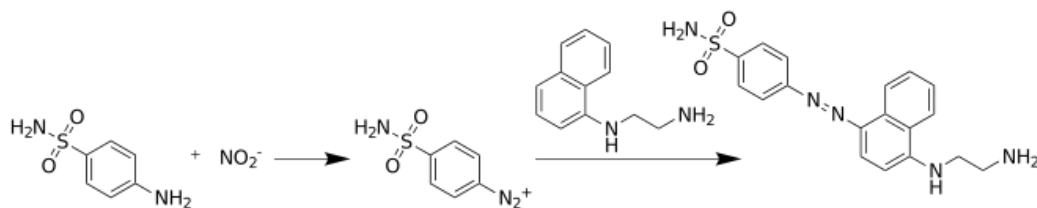
เป็นการวิเคราะห์ผลเชิงปริมาณ โดยทดสอบหาการอยู่รอดของเซลล์ (cell viability) โดยเซลล์ที่มีชีวิตจะสามารถใช้เอนไซม์ succinate dehydrogenase ใน mitochondria ทำปฏิกิริยากับสาร MTT ที่มีสีเหลืองให้เปลี่ยนเป็น formazan product ซึ่งมีสีม่วงน้ำเงิน หลังจากละลายสีภายในเซลล์ด้วยตัวทำละลายแล้วจึงทำการวัดหาปริมาณ formazan product ที่เกิดขึ้น โดยวัดค่า optical density (OD) ที่ความยาวคลื่น 500-600 nm



รูปที่ 2.4 ปฏิกิริยาการเปลี่ยนสาร MTT เป็น formazan product

2.4 การทดสอบ Nitric oxide assay

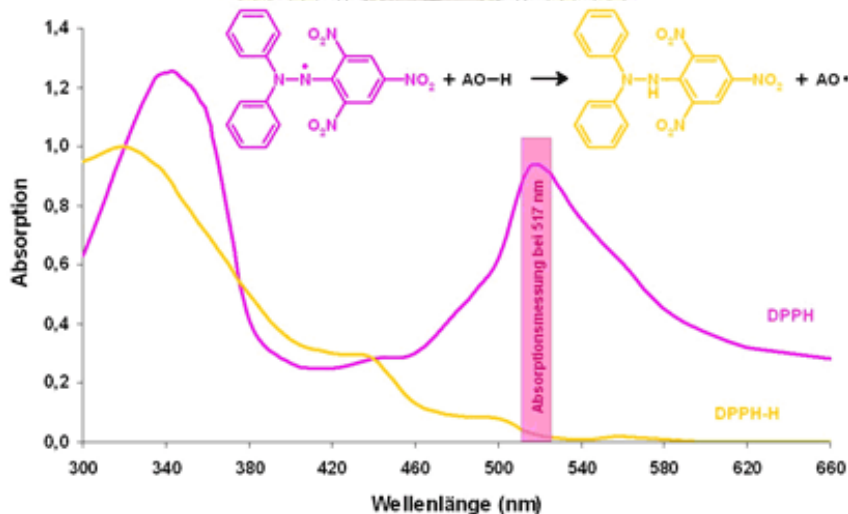
เป็นการวิเคราะห์เชิงปริมาณเพื่อหาปริมาณ nitrate และ nitrite ทั้งหมดในสารตัวอย่าง โดยใช้กระบวนการ 2 ขั้นตอน คือ ขั้นแรกเป็นการเปลี่ยน nitrate เป็น nitrite โดยใช้ nitrate reductase และขั้นที่ 2 เป็นการหาปริมาณ nitrite ทั้งหมด โดยใช้ Griess reagents เพื่อเปลี่ยน nitrite เป็น azo compound สีม่วงเข้ม แล้วจึงทำการวัดหาปริมาณ azo compound ที่เกิดขึ้น โดยวัดค่า optical density (OD) ที่ความยาวคลื่น 540 nm ในโครงการนี้นำ nitric oxide assay มาใช้ในการหาปริมาณ nitric oxide ที่เกิดขึ้นเมื่อเซลล์เกิดการอักเสบ โดยผสมสารตัวอย่างเข้ากับเซลล์ที่มีการอักเสบ ถ้าหากสารตัวอย่างมีฤทธิ์ต้านการอักเสบก็จะพบว่าปริมาณ nitric oxide ลดลงเมื่อเทียบกับเซลล์ที่มีการอักเสบแต่ไม่มีการผสมสารตัวอย่าง



รูปที่ 2.5 Griess reaction

2.5 การทดสอบ DPPH radical scavenging activity

เป็นวิธีวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้ di(phenyl)-(2,4,6-trinitrophenyl)iminoazanium (DPPH) ในการทดสอบเพราะ DPPH เป็นสารอนุมูลอิสระที่เสถียรใน methanol สารละลายนี้มีสีม่วงซึ่งดูดกลืนรังสีได้ดีที่มีความยาวคลื่น 517 nm เมื่อ DPPH ทำปฏิกิริยากับสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สีของสารละลายจะเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลืองซึ่งทำให้การดูดกลืนรังสีที่ 517 nm ลดลง แล้วสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารตัวอย่างกับค่าการดูดกลืนรังสีเพื่อหา half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) ที่แสดงความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่สามารถทำให้ความเข้มข้นของ DPPH ลดลง 50%



รูปที่ 2.6 ปฏิกิริยาออกซิเดชันของ DPPH กับสารต้านอนุมูลอิสระ

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. Nuclear magnetic resonance spectrometer (Varian Mercury 400 MHz NMR)
2. Nuclear magnetic resonance spectrometer (Bruker 400 MHz NMR)
3. Attenuated total reflectance infrared (Nicolet รุ่น 6007 ATR-IR)
4. Well plate 96 หลุม
5. TLC plate
6. Cuvette
7. Dialysis membrane (MWCO 100-500 D)
8. Separatory funnel

3.2 สารเคมี

1. ใบชาเขียว (*Camellia sinensis*)
2. สารสกัดพอลิฟีนอลจากใบชาเขียว จากบริษัท บุญรอดบริวเวอรี่ จำกัด
3. Methanol
4. Acetone
5. Hexane
6. Chloroform
7. Dimethylformamide
8. *p*-methoxycinnamic acid
9. *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDCI)

10. Hydroxybenzotroazole (HOBt)
11. di(phenyl)-(2,4,6-trinitrophenyl)iminoazanium (DPPH)
12. Ascorbic acid
13. Isopropanol
14. 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT)
15. Sulfanilamide
16. *N*-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride (NED)
17. Dimethyl sulfoxide- d_6 (DMSO- d_6)

3.3 การสกัดสารพอลิฟีนอลจากใบชาเขียว

ตั้งชุดกลั่นแบบรีฟลักซ์ (reflux) ซึ่งใบชาเขียวประมาณ 20 g แล้วนำมาทำให้ละเอียด เติมน้ำที่ได้อุ่นในขวดก้นกลมแล้วเติมเมทานอลลงไป 250 mL จึงนำไปรีฟลักซ์ที่อุณหภูมิ ประมาณ 70 °C พร้อมกับคนอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 2.5 ชม. จากนั้นนำของผสมไปกรองแล้ว นำของเหลวที่กรองได้ไประเหยแห้งได้เป็นของเหลวหนืดข้น (crude) แล้วจึงสกัดแยกโดยนำ ของเหลวหนืดข้นนี้ไปละลายด้วยคลอโรฟอร์ม 60 mL เเทลงในกรวยแยก (separatory funnel) เติมน้ำเมทานอลลงไป 20 mL และเติมน้ำกลั่นลงไป 2 mL เพื่อให้เกิดการแยก แล้วเขย่าแรงๆ และรอให้ของผสมแยกชั้นกันอย่างชัดเจน จากนั้นไซของผสมชั้นคลอโรฟอร์ม (ชั้นล่าง) ออกมาเก็บไว้และเก็บของผสมชั้นเมทานอล (ชั้นบน) โดยเทออกทางปากกรวยแยก แล้วจึงนำ ของผสมชั้นคลอโรฟอร์มมาสกัดแยกซ้ำอีกครั้งด้วยวิธีเดิม สุดท้ายนำของผสมชั้นเมทานอล จากการสกัดแยกทั้งสองครั้งมารวมกันแล้วนำไประเหยแห้ง ได้เป็นสารสกัดพอลิฟีนอลจากใบ ชาเขียว หรือ GTP

3.4 การสังเคราะห์ GTP- *p*-methoxycinnamate

ซึ่ง *p*-methoxycinnamic acid, GTP, EDCI และ HOBt โดยมีสัดส่วนโมล 1 : 1 : 2 : 2 ตามลำดับ (โมลของ GTP คัดจาก MW ของ EGCG คือ 458.37 g/mol) แล้วนำสารแต่ละชนิด ไปละลายใน DMF โดยใช้ตัวทำละลายน้อยที่สุด จากนั้นนำสารละลาย *p*-methoxycinnamic acid เเทลงในขวดก้นกลมที่แช่อยู่ในอ่างน้ำแข็ง (0 °C) เติมน้ำละลาย EDCI ลงไป คน 30 นาที

แล้วจึงเติมสารละลาย HOBt ลงและคน 15 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลาย GTP ลงไปและคนทิ้งไว้ข้ามคืน จะได้เป็นของผสมที่มี GTP- *p*-methoxycinnamate เกิดขึ้น

3.5 การทำ GTP- *p*-methoxycinnamate ให้บริสุทธิ์

3.5.1 Liquid-liquid extraction

นำของผสมที่ได้จาก 3.4 มาสกัดแยก *p*-methoxycinnamic acid และ HOBt ออก โดยเทของผสมลงในกรวยแยก เติมคลอโรฟอร์ม 20 mL และเติมน้ำกลั่นลงไป 3-5 mL เพื่อให้เกิดการแยก แล้วเขย่าแรงๆ และรอให้ของผสมแยกชั้นกันอย่างชัดเจน จากนั้นไซของผสมชั้นคลอโรฟอร์ม (ชั้นล่าง) ออกมาเก็บไว้ และสกัดแยกของผสมชั้นน้ำ (ชั้นบน) ซ้ำอีกครั้งด้วยวิธีเดิม จากนั้นไซของผสมชั้นคลอโรฟอร์มออกมารวมกับของผสมชั้นคลอโรฟอร์มที่สกัดครั้งแรก แล้วนำของผสมทั้งชั้นคลอโรฟอร์มและชั้นน้ำไประเหยแห้ง จะสามารถแยก *p*-methoxycinnamic acid และ HOBt ให้มาอยู่ในชั้นคลอโรฟอร์มได้

3.5.2 Dialysis

นำของผสมที่สกัดแยกจาก 3.5.1 ในชั้นน้ำมาใส่ใน dialysis membrane ที่มี MWCO = 100-500 D แล้วนำไปใส่ไว้ในน้ำกลั่น คนอย่างต่อเนื่อง 3 วัน (มีการเปลี่ยนน้ำกลั่นบ่อยๆ) แล้วจึงนำของผสมออกจาก dialysis membrane ไปทำให้แห้งด้วยการแช่เยือกแข็ง (freeze drying) ได้เป็นผลิตภัณฑ์ที่ถูกกำจัด EDCI ออก

3.6 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของ GTP- *p*-methoxycinnamate

วิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์สารต่างๆในโครงการนี้มีดังนี้

- Thin-layer chromatography (TLC)
- Nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR)
- UV-Visible spectroscopy
- FT-IR spectroscopy : Attenuated total reflectance (ATR)
- Mass spectrometry (MS)

3.7 การทดสอบสมบัติของ GTP- *p*-methoxycinnamate

3.7.1 การทดสอบความเสถียรต่อความร้อน

นำสารผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วไปวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ ใช้ตัวทำละลายเป็น DMSO-d_6 แล้วจึงนำหลอด NMR ที่มีสารผลิตภัณฑ์ไปแช่ในน้ำเดือด ($100\text{ }^\circ\text{C}$) เป็นเวลา 3 ชม. แล้วเอามาทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ อีกครั้ง เพื่อเปรียบเทียบการเปลี่ยนของผลิตภัณฑ์ก่อนและหลังให้ความร้อน

3.7.2 การทดสอบการต้านการอักเสบ

3.7.2.1 MTT assay

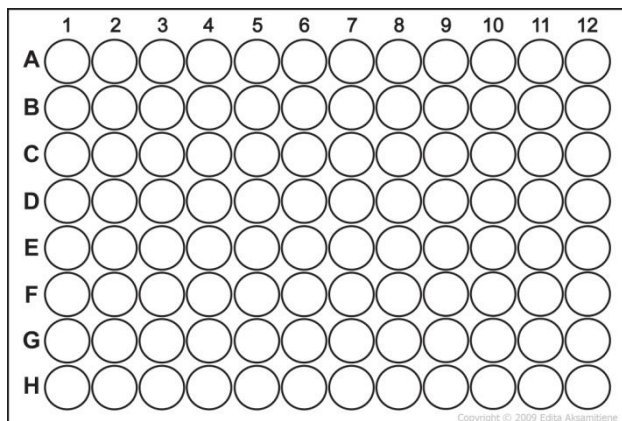
ใส่ 10,000 เซลล์ ในตัวกลางลงในทุกหลุมของ well plate 96 หลุม ควบคุมอุณหภูมิไว้ 24 ชม. จากนั้นดูดตัวกลางทิ้งไปแล้วใส่สารตัวอย่างที่ละลายในตัวกลาง $100\text{ }\mu\text{L}$ ควบคุมอุณหภูมิไว้อีก 24 ชม. แล้วจึงเติมสาร MTT ลงไป $10\text{ }\mu\text{L}$ และควบคุมอุณหภูมิที่ $37\text{ }^\circ\text{C}$ นาน 4 ชม. หลังจากนั้นก็ดูดตัวกลางทิ้งแล้วเติม isopropanol $100\text{ }\mu\text{L}$ ลงไปแล้วนำไปวัดการดูดกลืนรังสีที่ 540 nm

3.7.2.2 Nitric oxide assay

ผสมเซลล์ที่ถูกทำให้เกิดการอักเสบด้วย nitric oxide แล้วกับสารตัวอย่างลงใน well plate 96 หลุม จากนั้นเติมสารละลาย 1% sulfanilamide $50\text{ }\mu\text{L}$ ลงในแต่ละหลุม ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5-10 นาที ในที่มืด แล้วเติมสารละลาย NED $50\text{ }\mu\text{L}$ ลงไป ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5-10 นาที ในที่มืด แล้วจึงนำไปวัดการดูดกลืนรังสีที่ 540 nm

3.7.3 การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระ

3.7.3.1 DPPH radical scavenging activity



รูปที่ 3.1 Well plate 96 หลุม

ใส่ DMF 50 μL ลงใน well plate 96 หลุม ยกเว้นคอลัมน์ที่ 2 จากนั้นเติมสารตัวอย่างที่ละลายใน DMF ความเข้มข้น 1000 ppm ลงไป 100 μL ในคอลัมน์ที่ 2 แล้วทำการเจือจางสารตัวอย่างโดยดูดสารละลายตัวอย่าง 50 μL จากคอลัมน์ที่ 2 ไปผสมกับ DMF ที่มีในคอลัมน์ที่ 3 แล้วดูดสารละลายตัวอย่าง 50 μL จากคอลัมน์ที่ 3 ไปผสมกับ DMF ที่มีในคอลัมน์ที่ 4 ทำแบบนี้ต่อไปจนถึงคอลัมน์ที่ 12 (คอลัมน์ที่ 12 จะมีสารละลายรวม 100 μL จากนั้นเติม DMF 200 μL ลงในแถว A (หรือ E) ทุกหลุม หลังจากนั้นเติม 0.3 mM DPPH 200 μL ลงในทุกหลุมที่เหลือ ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที ในที่มืด แล้วนำไปวัดการดูดกลืนรังสีที่ 517 nm

บทที่ 4

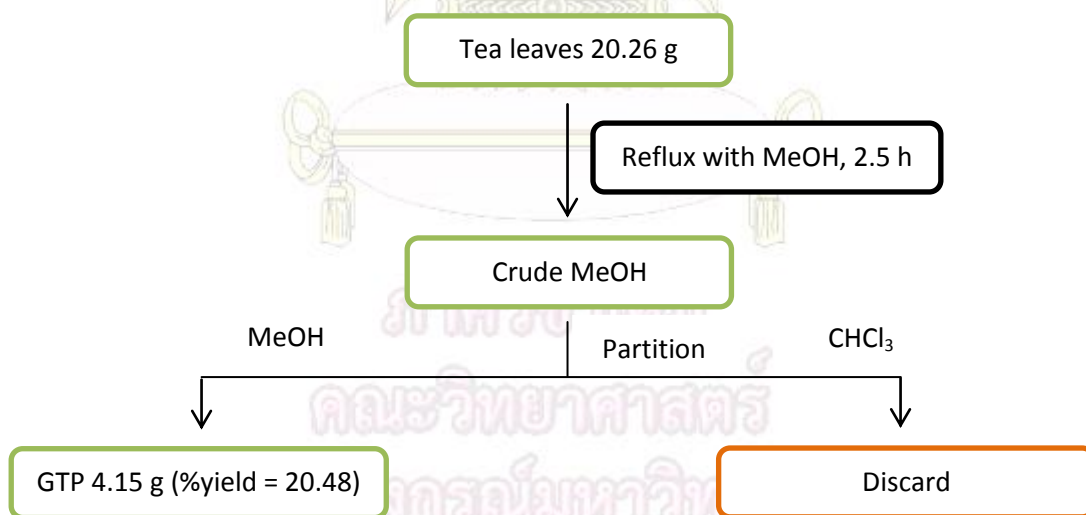
ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง

4.1 ผลการสกัดสารพอลิฟีนอลจากใบชาเขียว

ตารางที่ 4.1 แสดงผลการสกัดสารพอลิฟีนอลจากใบชาเขียว

สารเคมี	ลักษณะทางกายภาพ	น้ำหนัก (g)	%yield
ใบชาเขียว	ใบชาสีเขียวคล้ำแห้ง	20.26	-
GTP	ของแข็งกิ่งเกลวสีเขียวอมน้ำตาล	4.15	20.48

หมายเหตุ - %yield คัดจากน้ำหนัก GTP ที่ได้เทียบกับน้ำหนักใบชาที่ใช้



แผนภาพที่ 4.1 การสกัดสารพอลิฟีนอลจากใบชาเขียว

4.2 ผลการสังเคราะห์ และการแยก GTP- *p*-methoxycinnamate

ในที่นี้สังเคราะห์ GTP- *p*-methoxycinnamate โดยใช้สารตั้งต้น GTP สองแหล่งด้วยกัน คือ GTP ที่ได้จากการสกัดเอง (ข้อ 4.1) และที่ได้รับมอบให้จากการจากบริษัทบุญรอดฯ (GTP-B)

4.2.1 การสังเคราะห์และการแยกโดยใช้ GTP ที่ทำการสกัดเอง

ตารางที่ 4.2 แสดงผลการสังเคราะห์และการแยกโดยใช้ GTP ที่ทำการสกัดเอง

สารเคมี	ลักษณะทางกายภาพ	น้ำหนัก (g)	DMF ที่ใช้ทำละลาย (mL)	%yield
<i>p</i> -MCA	ผงละเอียดสีขาว	0.19	3	-
EDCI	ผงละเอียดสีขาว	0.34	2	-
HOBt	ผงละเอียดสีขาว	0.30	1	-
GTP	ของแข็งกึ่งเหลวสีเขียวยอมน้ำตาล	0.51	10	-
C1	ของเหลวหนืดข้นสีเขียวยอมน้ำตาล	0.89	-	-
W1	ของเหลวหนืดข้นสีน้ำตาลอ่อน	0.80	-	-
W2	ของแข็งกึ่งเหลวสีน้ำตาล	0.08	-	N/A

หมายเหตุ - %yield ไม่สามารถคำนวณได้เพราะเกิดความผิดพลาดจากสารมีการหกไป

ระหว่างการเก็บจาก dialysis membrane

- ความหมายของสัญลักษณ์ที่ใช้ในตาราง

p-MCA = *p*-methoxycinnamic acid

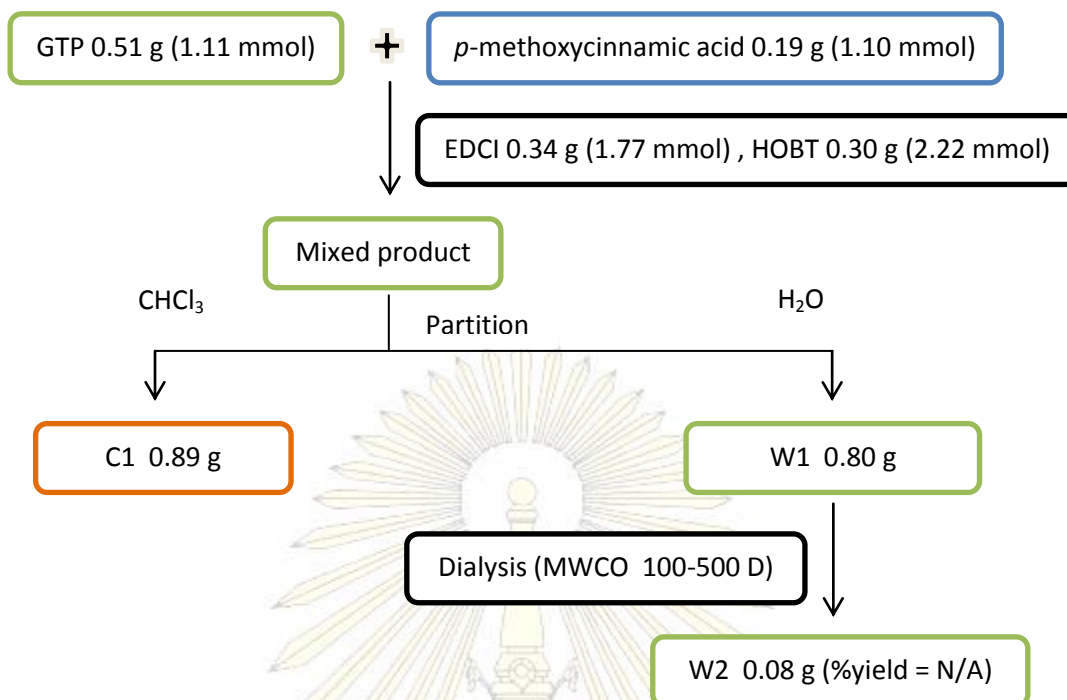
GTP = GTP ที่สกัดเอง

C1 = ผลิตภัณฑ์จาก GTP ที่สกัดเองในชั้นคลอโรฟอร์ม

W1 = ผลิตภัณฑ์จาก GTP ที่สกัดเองในชั้นน้ำ

W2 = ผลิตภัณฑ์จาก GTP ที่สกัดเองในชั้นน้ำหลังทำไดอะไลซิส

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



แผนภาพที่ 4.2 การสังเคราะห์และการแยกโดยใช้ GTP ที่ทำการสกัดเอง

4.2.2 การสังเคราะห์และการแยกโดยใช้ GTP ที่ได้จากบริษัทบุญรอดฯ

ตารางที่ 4.3 แสดงผลการสังเคราะห์และการแยกโดยใช้ GTP ที่ได้จากบริษัทบุญรอดฯ

สารเคมี	ลักษณะทางกายภาพ	น้ำหนัก (g)	DMF ที่ใช้ทำละลาย (mL)	%yield
<i>p</i> -MCA	ผงละเอียดสีขาว	0.29	2	-
EDCI	ผงละเอียดสีขาว	0.50	4	-
HOBT	ผงละเอียดสีขาว	0.44	1	-
GTP-B	ของเหลวหนืดข้นสีเขียวยอมน้ำตาล	0.74	15	-
C1-B	ของเหลวหนืดข้นสีเขียวยอมน้ำตาล	1.03	-	-
W1-B	ของแข็งสีน้ำตาลอ่อน	0.18	-	-
W2-B	ของแข็งสีน้ำตาล	0.13	-	12.91

หมายเหตุ - %yield คำนวณจากโมลของ EGCG-*p*-methoxycinnamate ที่ได้เทียบกับโมลของ *p*-methoxycinnamic acid ที่ใช้

- ความหมายของสัญลักษณ์ที่ใช้ในตาราง

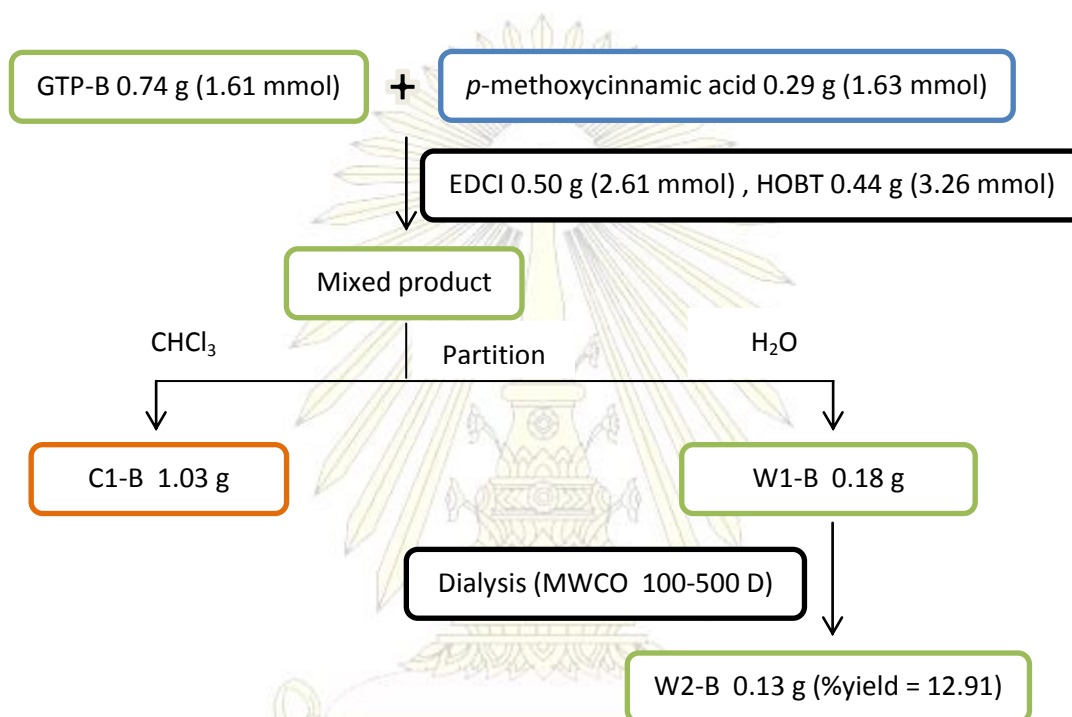
p-MCA = *p*-methoxycinnamic acid

GTP-B = GTP ที่ได้จากบริษัทบุญรอดฯ

C1-B = ผลิตภัณฑ์จาก GTP ที่ได้จากบริษัทบุญรอดฯ ในชั้นคลอโรฟอร์ม

W1-B = ผลิตภัณฑ์จาก GTP ที่ได้จากบริษัทบุญรอดฯ ในชั้นน้ำ

W2-B = ผลิตภัณฑ์จาก GTP ที่ได้จากบริษัทบุญรอดฯ ในชั้นน้ำหลังทำ
ไดอะไลซิส



แผนภาพที่ 4.3 การสังเคราะห์และการแยกโดยใช้ GTP ที่ได้จากบริษัทบุญรอดฯ

4.3 ผลการวิเคราะห์สารตั้งต้นและผลิตภัณฑ์ด้วย UV-Visible spectroscopy

ช่วงความยาวคลื่นที่ทดลอง = 200-500 nm

Scan step = 1 nm

Path length = 1 cm

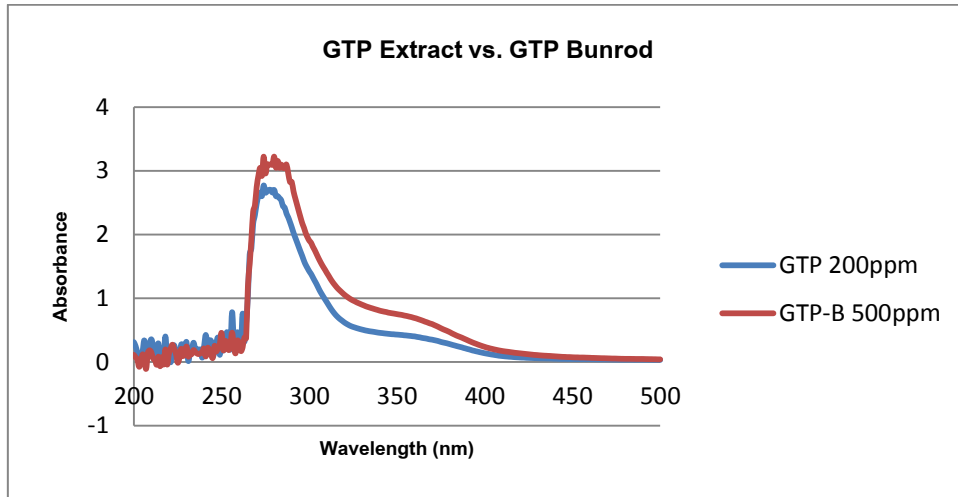
ตัวทำละลายที่ใช้ = DMF

หมายเหตุ - UV-A มีความยาวคลื่นอยู่ในช่วง 315-400 nm

- UV-B มีความยาวคลื่นอยู่ในช่วง 280-315 nm

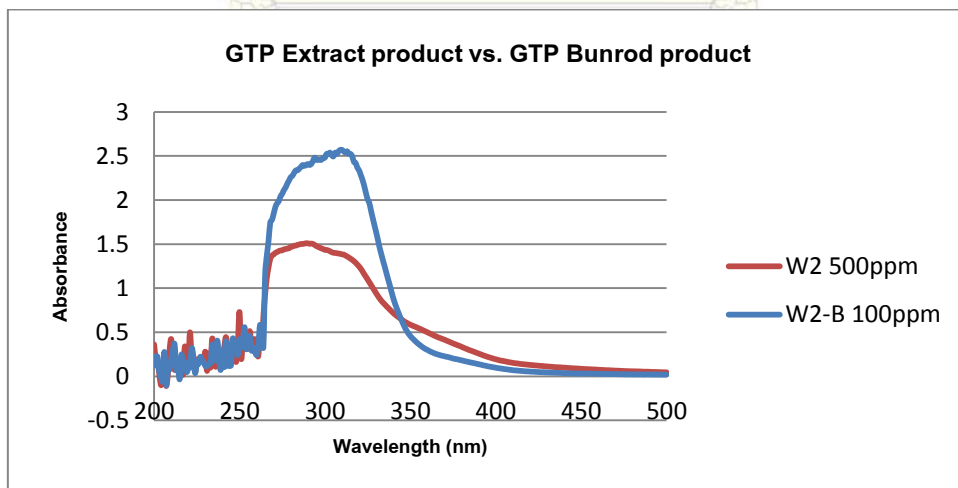
- UV-C มีความยาวคลื่นอยู่ในช่วง 100-280 nm

เมื่อนำ UV spectrum ของสารต่างๆ ที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมมาเทียบกันจะได้ผลดังต่อไปนี้



รูปที่ 4.1 UV spectrum ของ GTP ที่สกัดเองเทียบกับที่ได้จากบริษัทบุญรอดฯ

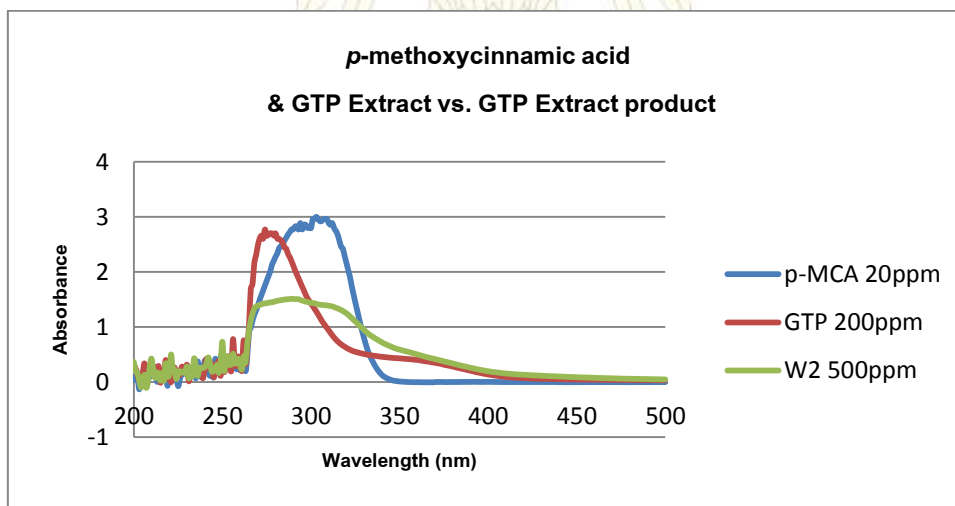
จากรูปที่ 4.1 จะเห็นว่า UV spectrum ของ GTP ที่สกัดเองกับที่ได้จากบริษัทบุญรอดฯ มีความคล้ายกันมาก และมีค่า λ_{\max} เท่ากับ 280 nm เท่ากัน และสามารถดูดกลืนรังสีได้ทั้งช่วง UV-A และ UV-B (ดูดกลืนรังสี UV-B ได้มากกว่า UV-A) จึงมีความเป็นไปได้ว่าสารทั้งสองมีองค์ประกอบและปริมาณของแต่ละองค์ประกอบใกล้เคียงกัน



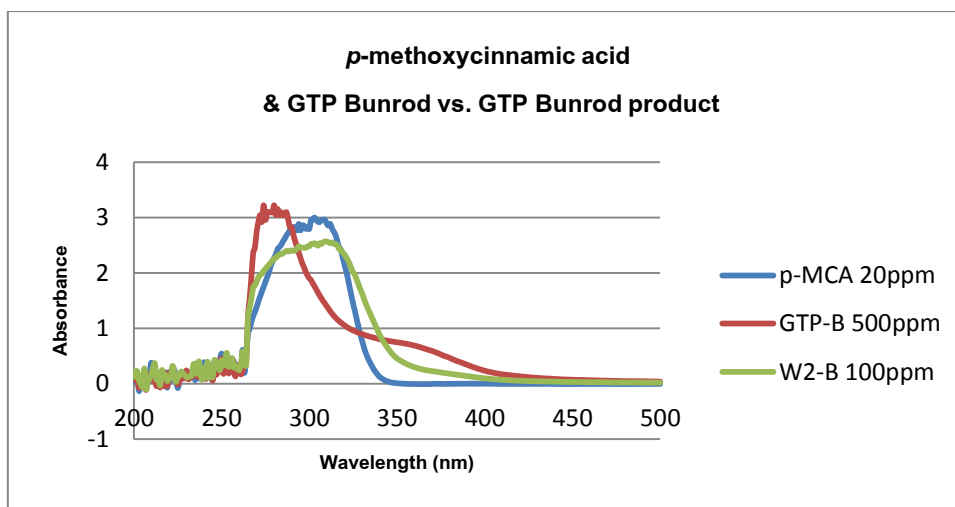
รูปที่ 4.2 UV spectrum ของผลิตภัณฑ์จาก GTP ที่สกัดเองเทียบกับที่ได้จากบริษัทบุญรอดฯ

(W2 และ W2-B)

จากรูปที่ 4.2 จะเห็นว่า UV spectrum ของผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์โดยใช้ GTP ที่สกัดเองเทียบกับที่ได้จากบริษัทบุญรอดฯมีความแตกต่างกันในช่วงความยาวคลื่น 265-350 nm ซึ่งเมื่อพิจารณาที่ความยาวคลื่น 280 กับ 310 nm พบว่าผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์จาก GTP ที่สกัดเองดูดกลืนรังสีที่ 280 nm มากกว่าที่ 310 nm ส่วนผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์จาก GTP-B ดูดกลืนรังสีที่ 310 nm มากกว่าที่ 280 nm จากรูปที่ 4.1 จะพบว่าความยาวคลื่นที่ 280 nm เป็นลักษณะการดูดกลืนรังสี UV ของสารตั้งต้น GTP และเมื่อให้ความยาวคลื่นที่ 310 nm เป็นตัวแทนของการดูดกลืนรังสี UV ของผลิตภัณฑ์ก็สามารถสรุปได้ว่าผลิตภัณฑ์จาก GTP ที่ได้จากบริษัทบุญรอดมีปริมาณ GTP-*p*-methoxycinnamate ที่เกิดขึ้นมากกว่าผลิตภัณฑ์จาก GTP ที่สกัดเองเมื่อเทียบกับปริมาณ GTP ที่ผสมอยู่ และถ้าพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารกับค่า absorbance พบว่าผลิตภัณฑ์จาก GTP ที่ได้จากบริษัทบุญรอดที่ใช้มีความเข้มข้นต่ำกว่าผลิตภัณฑ์จาก GTP ที่สกัดเองถึง 5 เท่า แต่กลับได้ค่า absorbance สูงกว่าของผลิตภัณฑ์จาก GTP ที่สกัดเองเกือบ 2 เท่า แสดงว่า GTP-*p*-methoxycinnamate มีความสามารถในการดูดกลืนรังสีในช่วง UV-B สูงกว่า GTP



รูปที่ 4.3 UV spectrum ของ *p*-methoxycinnamic acid และ GTP เทียบกับผลิตภัณฑ์จาก GTP ที่สกัดเอง



รูปที่ 4.4 UV spectrum ของ *p*-methoxycinnamic acid และ GTP เทียบกับผลิตภัณฑ์จาก GTP ที่ได้จากบริษัทบุญรอดฯ

จากรูปที่ 4.3 และ 4.4 เมื่อพิจารณาค่า λ_{\max} ของผลิตภัณฑ์ในส่วน GTP-*p*-methoxycinnamate (310 nm) พบว่ามีค่าสูงกว่าค่า λ_{\max} ของทั้ง *p*-methoxycinnamic acid ($\lambda_{\max} = 303$ nm) และ GTP ($\lambda_{\max} = 280$ nm) ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าเกิด red shift ขึ้น เนื่องจากเกิดผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้ให้การดูดกลืนรังสีที่มีความยาวคลื่นมากกว่าสารตั้งต้น GTP กล่าวคือมีการดูดกลืนกว้างเพิ่มเข้าไปในช่วง UV-A ด้วย

4.4 ผลการทดลองวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ด้วย Thin-layer chromatography (TLC) และ Nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR)

4.4.1 การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ด้วย TLC

Mobile phase = acetone (45) : hexane (55)



รูปที่ 4.5 ผล TLC ของการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์โดยใช้ GTP ที่สกัดเอง

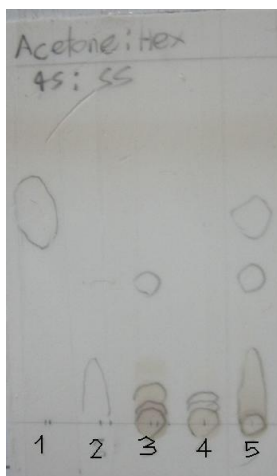
1 = *p*-methoxycinnamic acid

2 = HOBt

3 = GTP

4 = W1

5 = C1



รูปที่ 4.6 ผล TLC ของการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์โดยใช้ GTP ที่ได้จากบริษัทบุญรอดฯ

1 = *p*-methoxycinnamic acid

2 = HOBt

3 = GTP-B

4 = W1-B

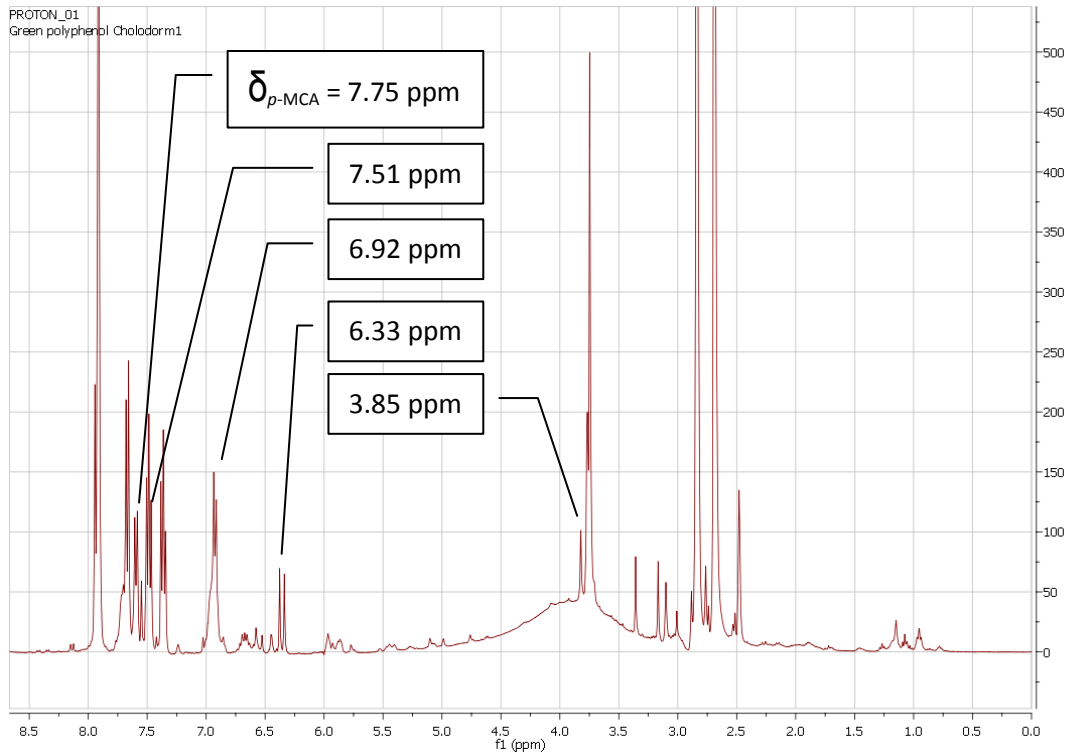
5 = C1-B

จากการนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสกัดแบบของเหลว-ของเหลวทั้งจาก GTP ที่สกัดเอง และที่ได้จากบริษัทบุญรอดมาวิเคราะห์ด้วย TLC พบว่าทั้งสารตั้งต้นและผลิตภัณฑ์ของ GTP ที่สกัดเองและที่ได้จากบริษัทบุญรอดมีองค์ประกอบที่คล้ายคลึงกัน ซึ่งเมื่อพิจารณาผลิตภัณฑ์ในชั้นน้ำ (W1 และ W1-B) จะพบบางองค์ประกอบของ GTP ส่วนผลิตภัณฑ์ในชั้นคลอโรฟอร์ม (C1 และ C1-B) มีองค์ประกอบของ *p*-methoxycinnamic acid, HOBt, และบางองค์ประกอบของ GTP อย่างไรก็ตามสรุปได้ค่อนข้างชัดเจนว่า W1 ไม่มีการปนเปื้อนของ *p*-methoxycinnamic acid

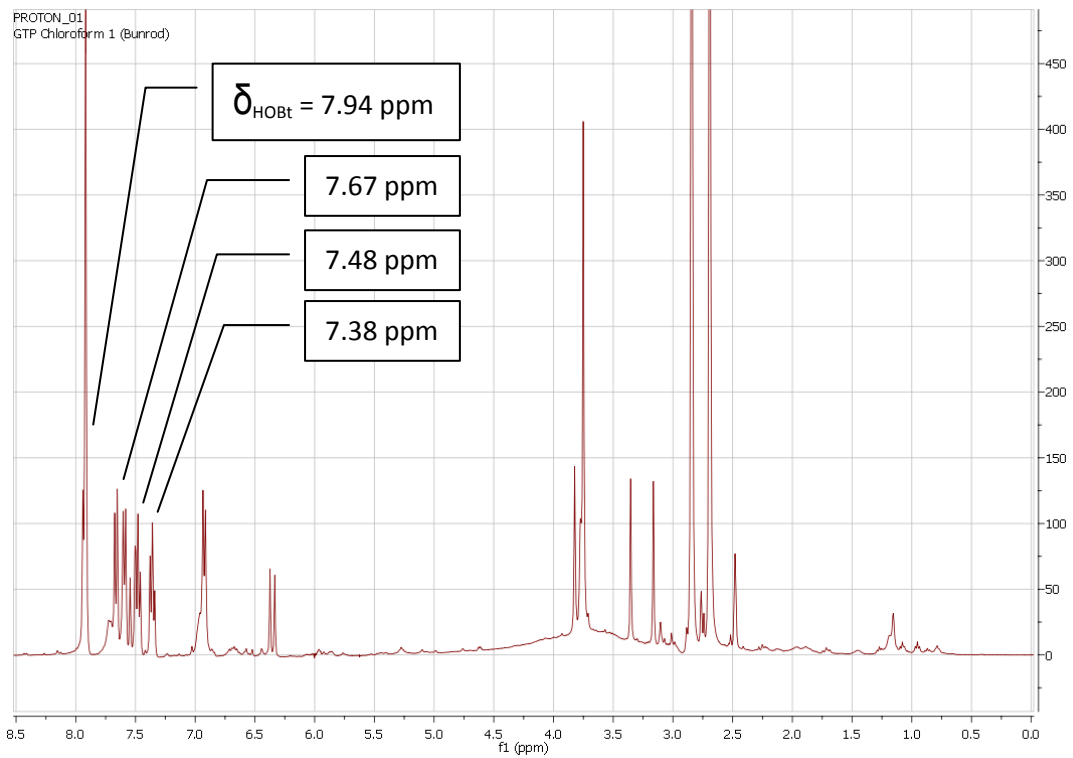
เมื่อนำข้อมูลนี้ประกอบเข้ากับ UV-Visible absorption spectra ของผลิตภัณฑ์ W2 และ W2-B (ซึ่งได้จากทำ W1 และ W1-B ให้สะอาด) จึงเชื่อได้ว่าการสังเคราะห์น่าจะประสบความสำเร็จ กล่าวคือมีการเชื่อมต่อของ *p*-methoxycinnamoyl group เข้ากับ GTP ทำให้มีการดูดกลืนรังสีที่ 310 nm ทั้งๆ ที่ไม่มีการปนเปื้อนของ *p*-methoxycinnamic acid

4.4.2 การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ด้วย NMR

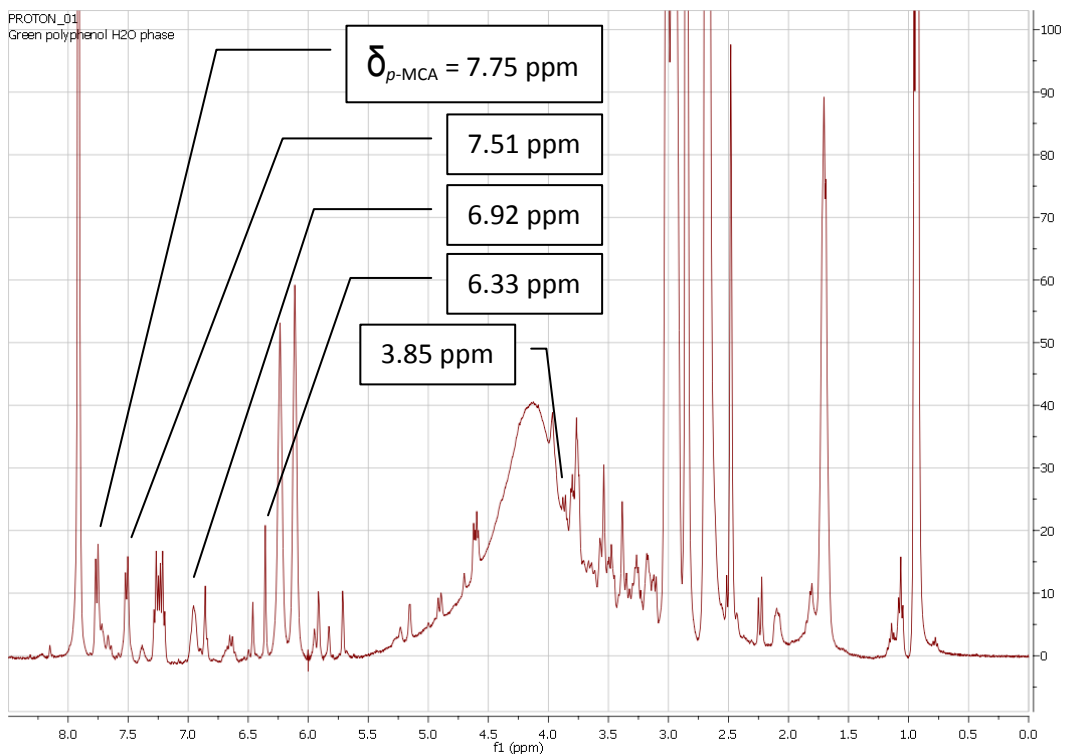
Solvent = DMSO-d₆



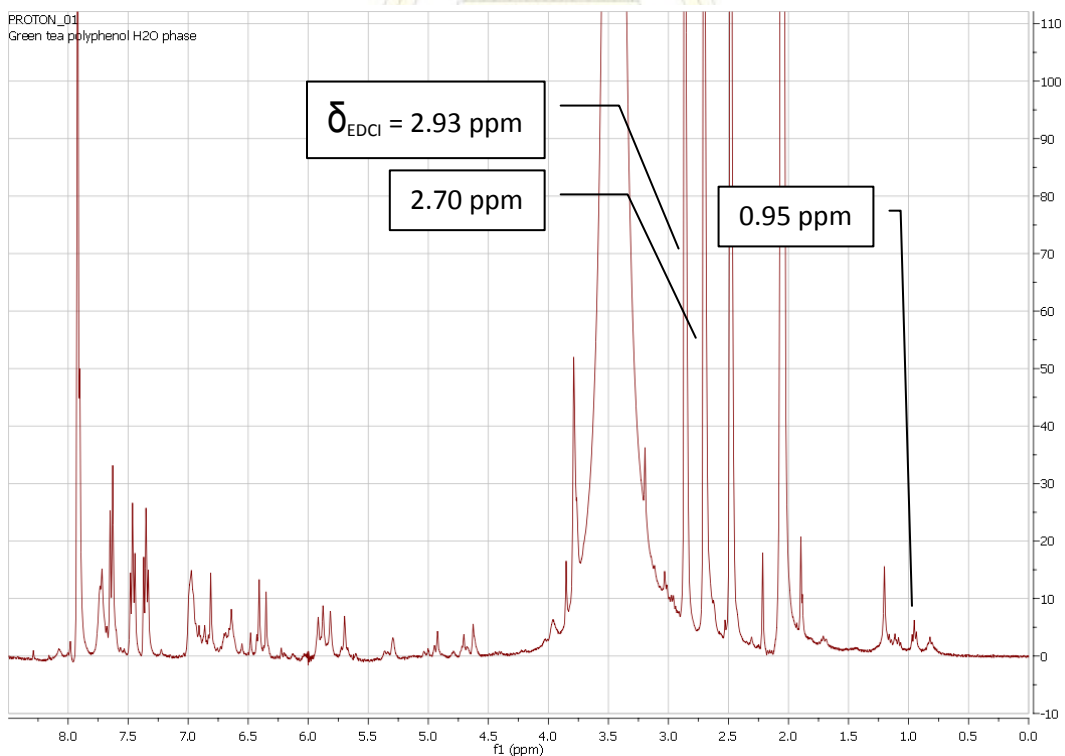
รูปที่ 4.7 $^1\text{H-NMR}$ ของผลิตภัณฑ์จาก GTP ที่สกัดเองในชั้นคลอโรฟอร์ม (C1)



รูปที่ 4.8 $^1\text{H-NMR}$ ของผลิตภัณฑ์จาก GTP ที่ได้จากบริษัทบุญรอดในชั้นคลอโรฟอร์ม (C1-B)

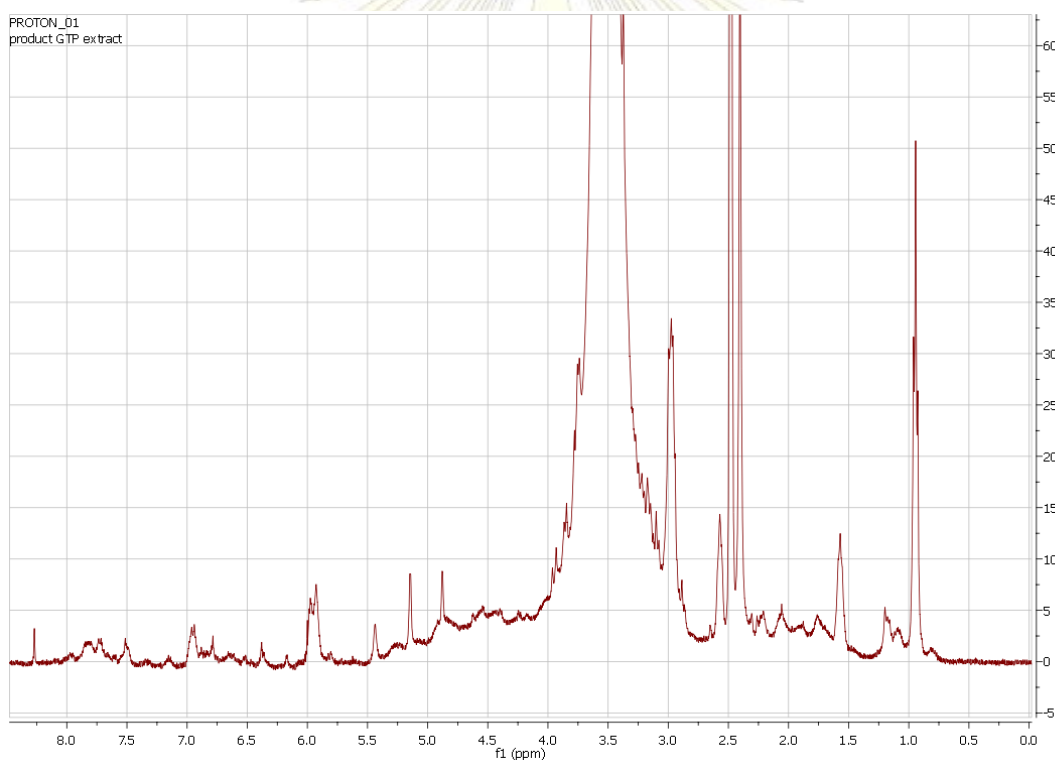


รูปที่ 4.9 $^1\text{H-NMR}$ ของผลิตภัณฑ์จาก GTP ที่สกัดเองในชั้นน้ำ (W1)

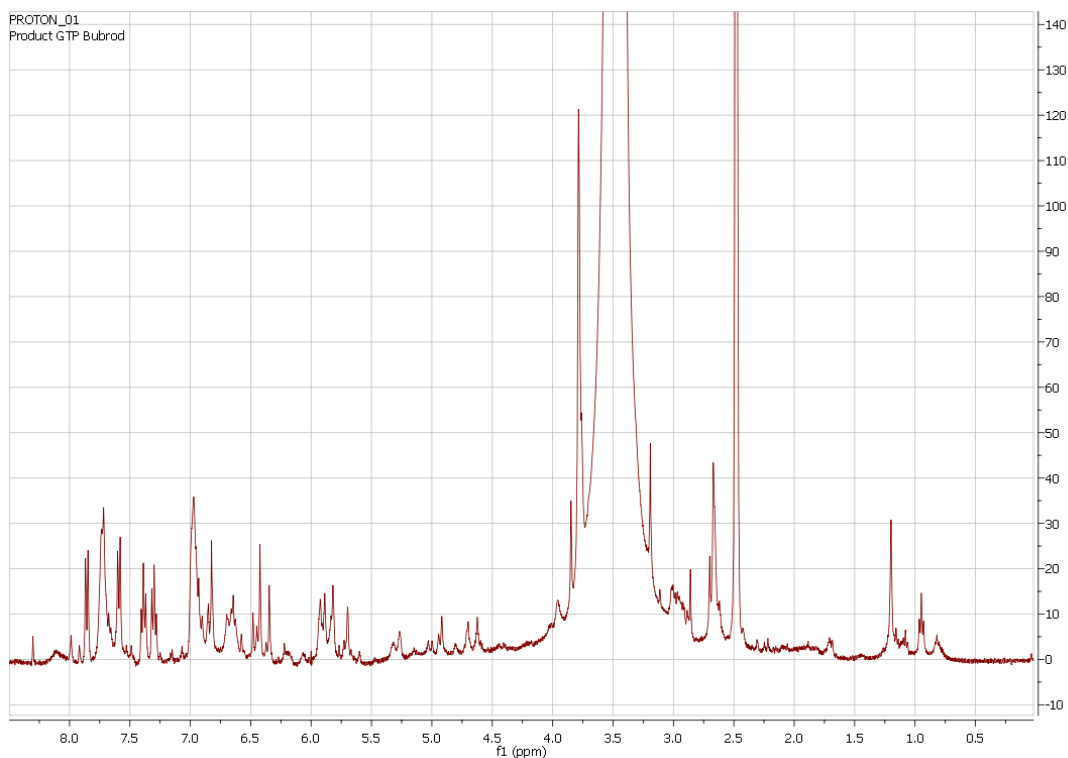


รูปที่ 4.10 $^1\text{H-NMR}$ ของผลิตภัณฑ์จาก GTP ที่ได้จากบริษัทบุญรอดในชั้นน้ำ (W1-B)

จากการนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสกัดแบบของเหลว-ของเหลวทั้งจาก GTP ที่สกัดเอง และที่ได้จากบริษัทบุญรอดมาวิเคราะห์ด้วย NMR พบว่า สามารถแยก HOBt กับ *p*-methoxycinnamic acid ให้ไปอยู่ในชั้นคลอโรฟอร์ม (C1 และ C1-B) ได้ (chemical shift (δ) ของ *p*-methoxycinnamic acid คือ 3.85, 6.33, 6.92, 7.51, และ 7.75 ppm และ chemical shift ของ HOBt คือ 7.38, 7.48, 7.67, และ 7.94 ppm) ดังนั้นในชั้นน้ำ (W1 และ W1-B) จึงควรมีแต่ GTP กับ EDCI แต่เมื่อพิจารณารูปที่ 4.9 และ 4.10 พบว่ามีพีคของ *p*-methoxycinnamic acid อยู่ด้วยซึ่ง *p*-methoxycinnamic acid ไม่ละลายในน้ำ (ค่าการละลายน้ำ ที่ 25°C = 0.712 mg/mL) แปลว่า พีคที่พบมีโอกาสเป็นของ GTP-*p*-methoxycinnamate และที่สำคัญผล TLC ยืนยันว่าไม่มี *p*-methoxycinnamic acid ปนอยู่



รูปที่ 4.11 $^1\text{H-NMR}$ ของผลิตภัณฑ์จาก GTP ที่สกัดเองในชั้นน้ำหลังทำไดอะไลซิส (W2)

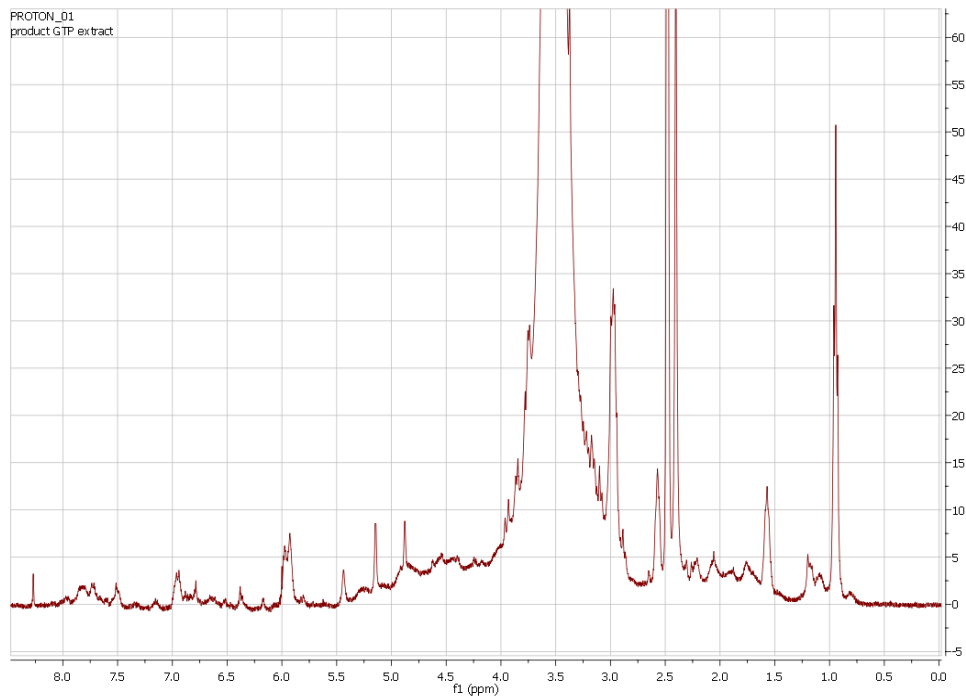


รูปที่ 4.12 $^1\text{H-NMR}$ ของผลิตภัณฑ์จาก GTP ที่ได้จากบริษัทบุญรอดในชั้นน้ำ
หลังทำไดอะไลซิส (W2-B)

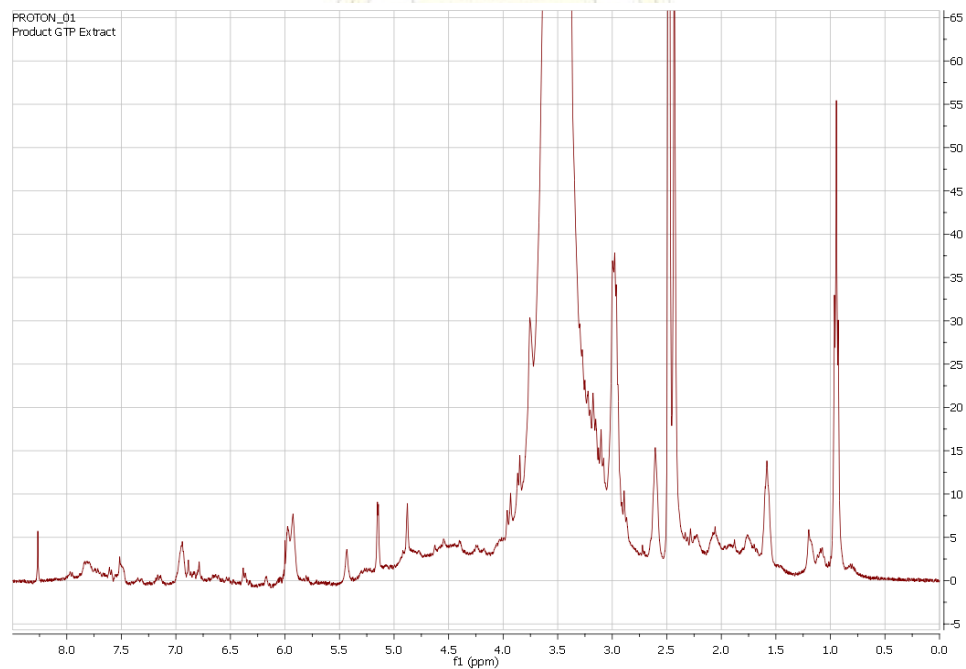
จากการนำผลิตภัณฑ์จาก GTP ที่สกัดเองและที่ได้จากบริษัทบุญรอดในชั้นน้ำ (W1 และ W1-B) ไปทำไดอะไลซิสเพื่อขจัด EDCI ได้เป็น W2 และ W2-B มาวิเคราะห์ด้วย NMR พบว่า การทำไดอะไลซิสสามารถขจัด EDCI ออกจากผลิตภัณฑ์ที่ต้องการได้ ซึ่งเห็นได้จาก รูปที่ 4.11 และ 4.12 ไม่พบพีคของ EDCI (chemical shift ของ EDCI คือ 0.95, 2.70, และ 2.93 ppm)

4.5 ผลการทดสอบความเสถียรต่อความร้อน โดยการวิเคราะห์ด้วย NMR

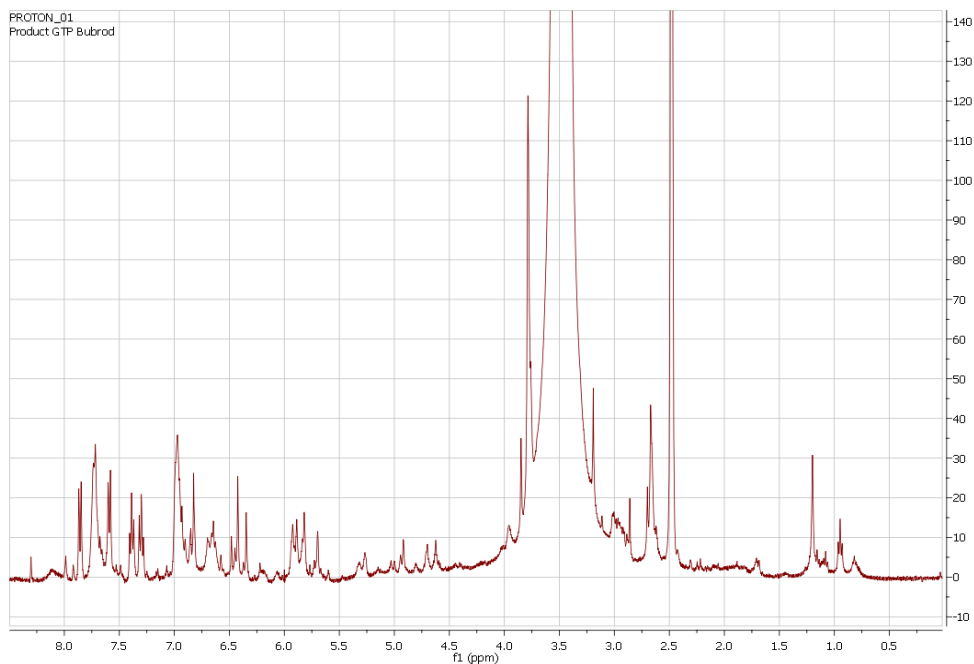
Solvent = DMSO-d_6



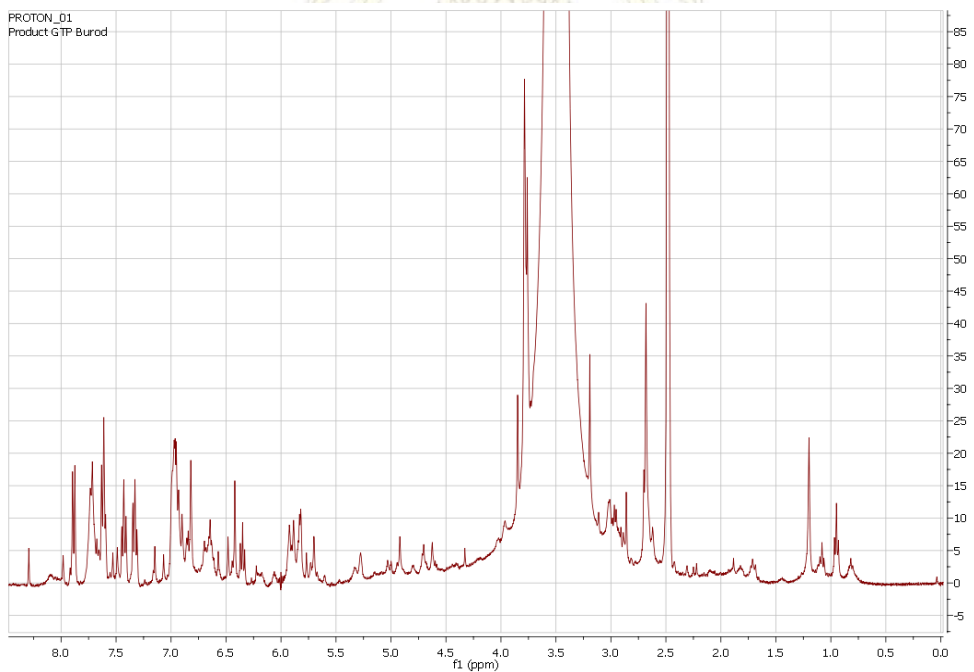
รูปที่ 4.13 $^1\text{H-NMR}$ ของผลิตภัณฑ์จาก GTP ที่สกัดเองในชั้นน้ำหลังทำไดอะไลซิส (W2) ก่อนการให้ความร้อน



รูปที่ 4.14 $^1\text{H-NMR}$ ของผลิตภัณฑ์จาก GTP ที่สกัดเองในชั้นน้ำหลังทำไดอะไลซิส (W2) ที่ผ่านการให้ความร้อนแล้ว



รูปที่ 4.15 $^1\text{H-NMR}$ ของผลิตภัณฑ์จาก GTP ที่ได้จากบริษัทบุญรอดฯ ในชั้นน้ำหลังทำไดอะไลซิส (W2-B) ก่อนการให้ความร้อน

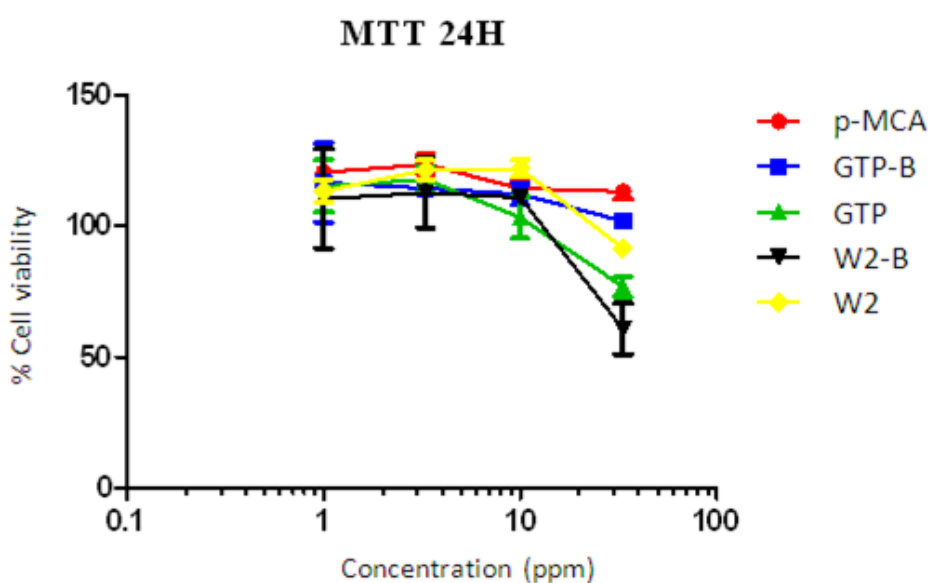


รูปที่ 4.16 $^1\text{H-NMR}$ ของผลิตภัณฑ์จาก GTP ที่ได้จากบริษัทบุญรอดฯ ในชั้นน้ำหลังทำไดอะไลซิส (W2-B) ที่ผ่านการให้ความร้อนแล้ว

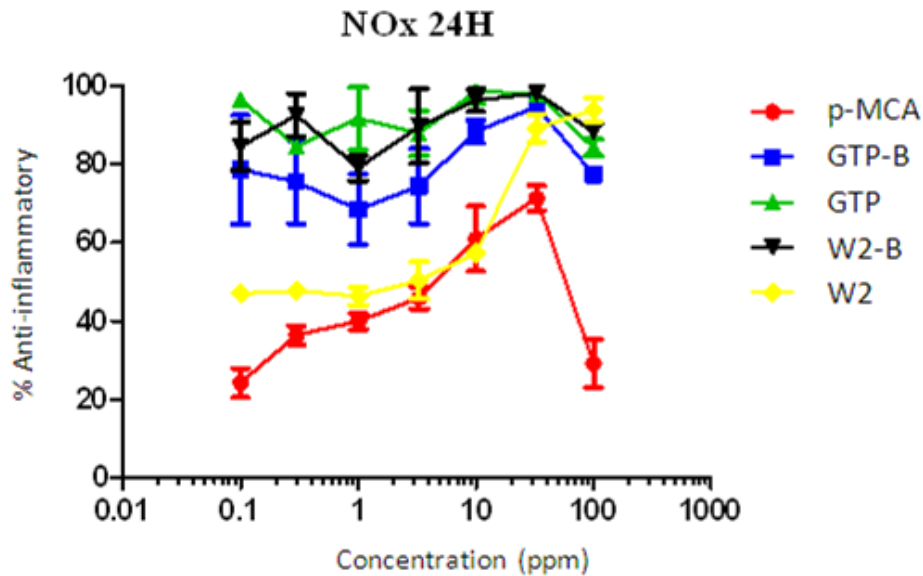
จากการวิเคราะห์ผลึกพันธ์ทั้งก่อนและหลังให้ความร้อนด้วย NMR พบว่า ผลึกพันธ์ทั้งก่อนและหลังให้ความร้อนจาก GTP ที่สกัดเองและที่ได้จากบริษัทบุญรอดฯ ในชั้นน้ำหลังทำไดอะไลซิส (W2 และ W2-B) ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แสดงว่า W2 และ W2-B มีความเสถียรต่อความร้อนในการทดสอบนี้

4.6 ผลการทดสอบการต้านการอักเสบและการต้านอนุมูลอิสระ

4.6.1 การทดสอบการต้านการอักเสบ



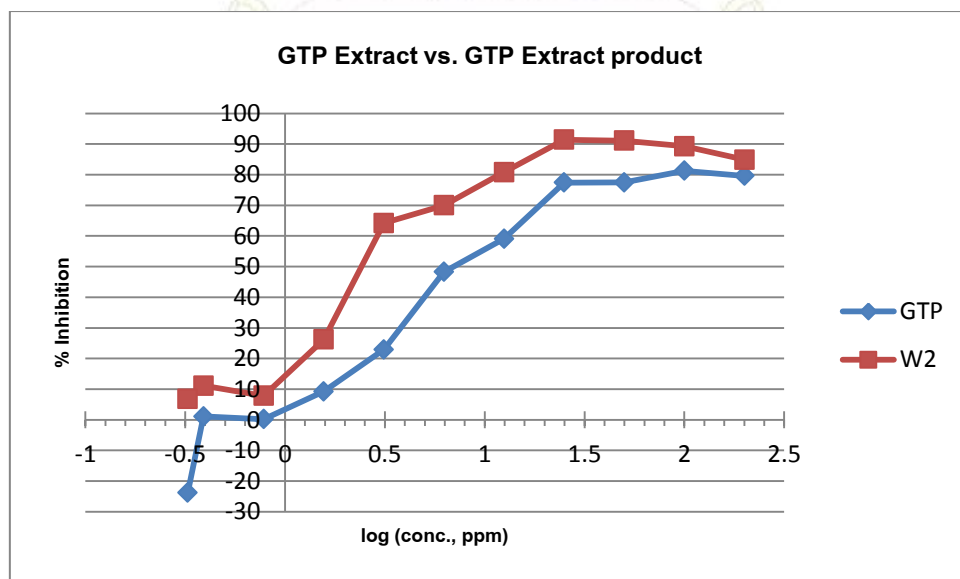
รูปที่ 4.17 ผล MTT ของ *p*-MCA, GTP, GTP-B, W2, และ W2-B



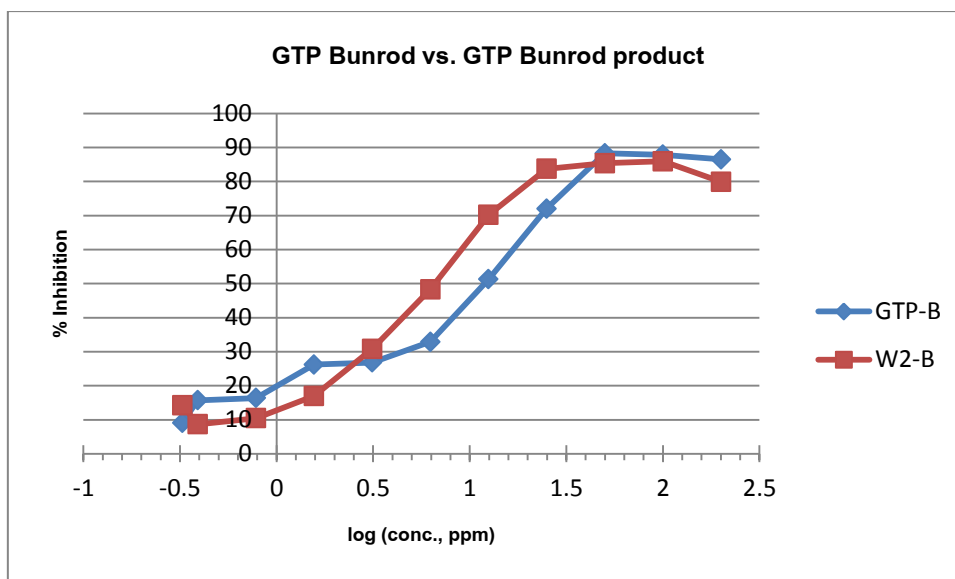
รูปที่ 4.18 ผล Nitric oxide assay ของ *p*-MCA, GTP, GTP-B, W2, และ W2-B

จากผล MTT พบว่าที่ความเข้มข้น 33 ppm ของสารทั้ง 5 ชนิดเซลล์สามารถอยู่รอดได้มากกว่า 50 % และที่ความเข้มข้นเดียวกัน ผล Nitric oxide assay แสดงให้เห็นว่า GTP, GTP-B, W2, และ W2-B มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ส่วน *p*-methoxycinnamic acid ไม่มีฤทธิ์นี้

4.6.2 การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระด้วย DPPH radical scavenging activity



รูปที่ 4.19 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง %Inhibition กับค่า log ของความเข้มข้นของ GTP เทียบกับผลิตภัณฑ์จาก GTP ที่สกัดเอง



รูปที่ 4.20 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง %Inhibition กับค่า log ของความเข้มข้นของ GTP เทียบกับผลิตภัณฑ์จาก GTP ที่ได้จากบริษัทบุญรอด

จากผลการทดลอง DPPH radical scavenging activity พบว่า GTP, GTP-B, W2, และ W2-B มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ส่วน *p*-methoxycinnamic acid ไม่มีฤทธิ์นี้ น่าจะเป็นผลมาจาก GTP, GTP-B, W2, และ W2-B มีหมู่ *ortho*-dihydroxyl (catechol) ทำให้มีสมบัติเป็นตัวรีดิวซ์

ตารางที่ 4.4 ค่า IC_{50} ของสารต่างๆที่ใช้ในการทดลอง DPPH radical scavenging activity

สารที่ใช้ในการทดลอง	IC_{50} (ppm)
Ascorbic acid	4.365
<i>p</i> -methoxycinnamic acid	Inactive
GTP	6.958
GTP-B	11.885
W2	2.413
W2-B	6.607

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้เราสามารถแยก GTP จากใบชาเขียวด้วยวิธี solvent extraction ได้และยังสามารถสังเคราะห์ GTP- *p*-methoxycinnamate ได้ด้วยปฏิกิริยาควบคู่ระหว่าง GTP กับ *p*-methoxycinnamic acid ซึ่งเป็นสารที่ดูดกลืนรังสี UV ได้ดีกว่า GTP และมีความเสถียรต่อความร้อน อีกทั้งยังคงฤทธิ์ต้านการอักเสบไว้ และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่า GTP ด้วยการทำปฏิกิริยาควบคู่ของ GTP เข้ากับ *p*-methoxycinnamic acid ยังช่วยลดความเป็นพิษต่อเซลล์ของ GTP ลงได้ด้วย จากกระบวนการทำลาย DNA และโปรตีนโดยรังสี UV มีทั้งการเกิดโดยตรงและการเกิดผ่านอนุมูลอิสระ ดังนั้นสารกรองรังสี UV ที่ทั้งดูดกลืนรังสีและมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจึงน่าจะช่วยยับยั้งกระบวนการดังกล่าวได้ดียิ่งขึ้น

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 การสกัดสารพอลิฟีนอลจากใบชาเขียวควรมีการทำ column chromatography เพื่อให้ได้สารพอลิฟีนอลที่บริสุทธิ์มากขึ้น

5.2.2 การแยกผลิตภัณฑ์จากการสังเคราะห์ GTP- *p*-methoxycinnamate ควรมีการทำ column chromatography เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่บริสุทธิ์มากขึ้น

5.2.3 การทดลอง UV-Visible spectroscopy ควรใช้สารตัวอย่างที่มีความเข้มข้นเท่ากัน และให้ค่า Absorbance ไม่เกิน 1

เอกสารอ้างอิง

- [1] Stabile, R. G.; Dicks, A. P. Two-Step Semi-Microscale Preparation of a Cinnamate Ester Sunscreen Analog. *J. Chem. Educ.* **2004**, *81* (10), 1488.
- [2] Katiyar, S. K.; Perez, A.; Mukhtar, H. Green tea polyphenol treatment to human skin prevents formation of ultraviolet light B-induced pyrimidine dimers in DNA. *Clin. Cancer Res.* **2000**, *6*, 3864-3869.
- [3] Nichols, J. A.; Katiyar, S. K. Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, anti-oxidant and DNA repair mechanisms. *Arch Dermatol Res.* **2010**, *302*(2), 71.
- [4] Quideau, S.; Deffieux, D.; Douat-Casassus, C.; Pouységou, L. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*(3), 586-621.
- [5] Zhong, Y.; Shahidi, F. Lipophilized Epigallocatechin Gallate (EGCG) Derivatives as Novel Antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 6526-6533.
- [6] Perva-Uzunalić, A.; Škerget, M. Knez, Ž.; Weinreich, B.; Otto, F.; Grüner, S. Extraction of active ingredients from green tea (*Camellia sinensis*): Extraction efficiency of major catechins and caffeine. *Food Chemistry.* **2006**, *96*, 597-605.

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้วิจัย

นายณัฐพล ตันติเมฆิน เกิดเมื่อวันที่ 17 มีนาคม พ.ศ. 2535 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย สายสามัญ แผนกวิทยาศาสตร์-คณิตศาสตร์ จากโรงเรียนราชประชาสมาสัย ฝ่ายมัธยม รัชดาภิเษก ในพระบรมราชูปถัมภ์ จังหวัดสมุทรปราการ เมื่อปีการศึกษา 2552 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2553 ที่อยู่ปัจจุบัน 333/93 หมู่ 2 ตำบลบ้านคลองสวน อำเภอพระสมุทรเจดีย์ จังหวัดสมุทรปราการ 10290

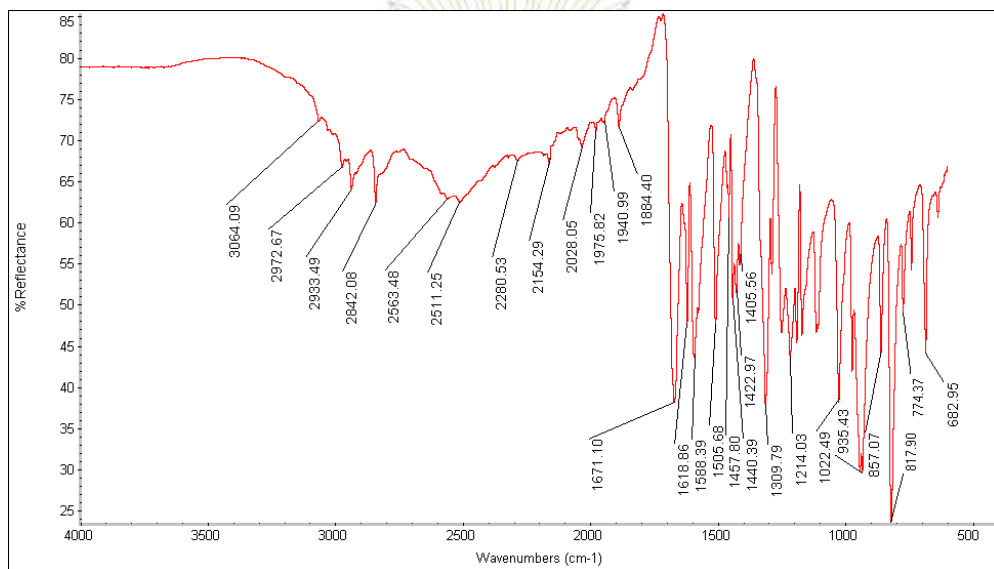
นายกวินท์ วรพัฒนานุกูล เกิดเมื่อวันที่ 17 มีนาคม พ.ศ. 2533 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย สายสามัญ แผนกวิทยาศาสตร์-คณิตศาสตร์ จากโรงเรียนบางปะกอกวิทยาคม จังหวัดกรุงเทพมหานคร เมื่อปีการศึกษา 2552 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2553 ที่อยู่ปัจจุบัน 412/3 หมู่ 4 แขวงบางมด เขตทุ่งครุ จังหวัดกรุงเทพมหานคร 10140

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

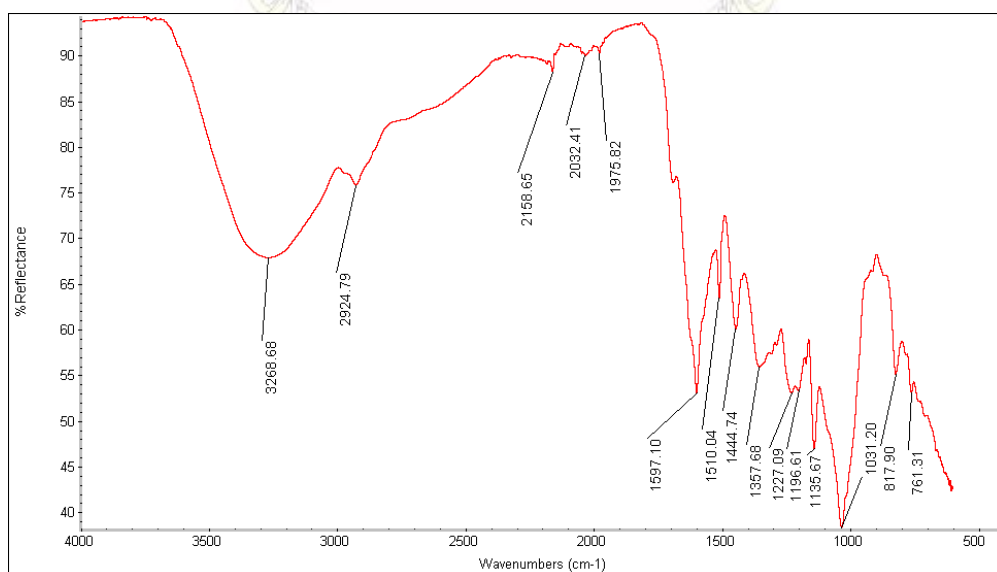
ภาคผนวก

ผลการทดลอง FT-IR spectroscopy : Attenuated total reflectance (ATR)

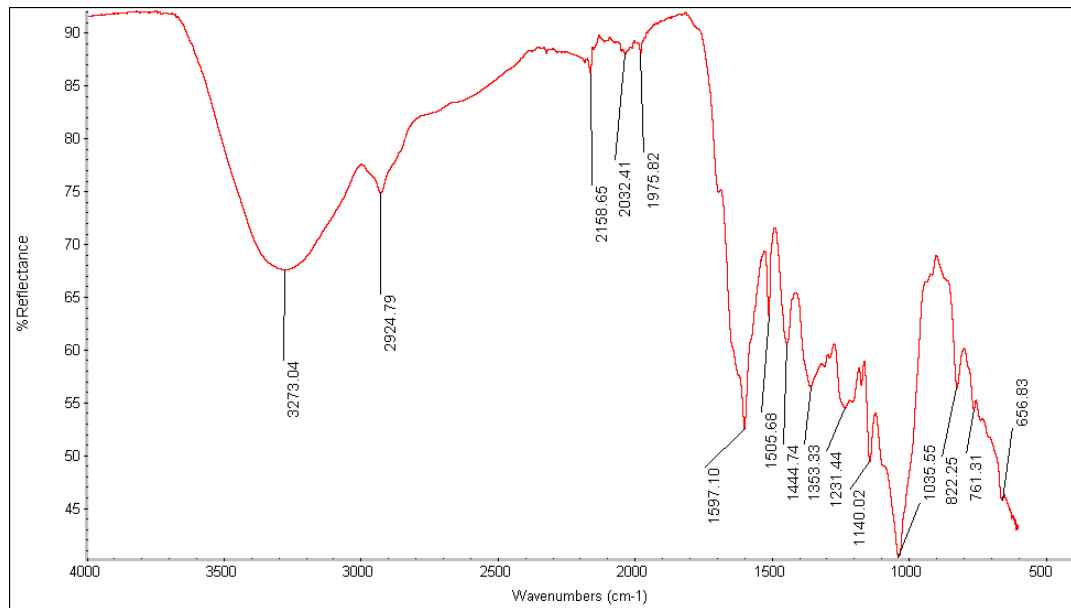
จากการนำสารตั้งต้น GTP, GTP-B, W2, และ W2-B ไปทดลอง ATR-IR ได้ผลการทดลองดังต่อไปนี้



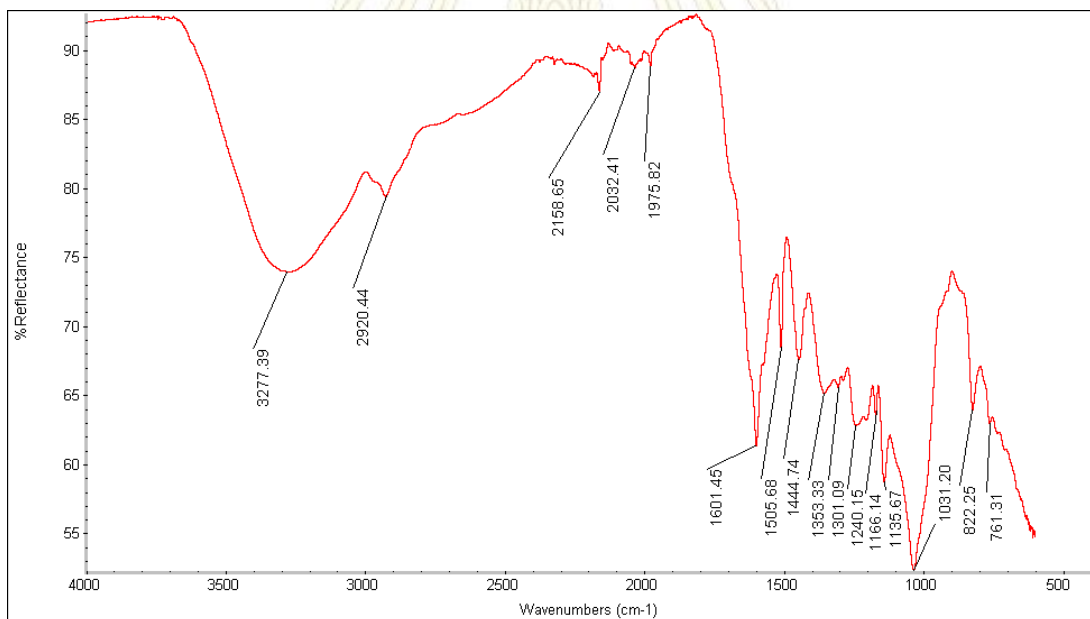
รูป IR spectrum ของ *p*-methoxycinnamic acid



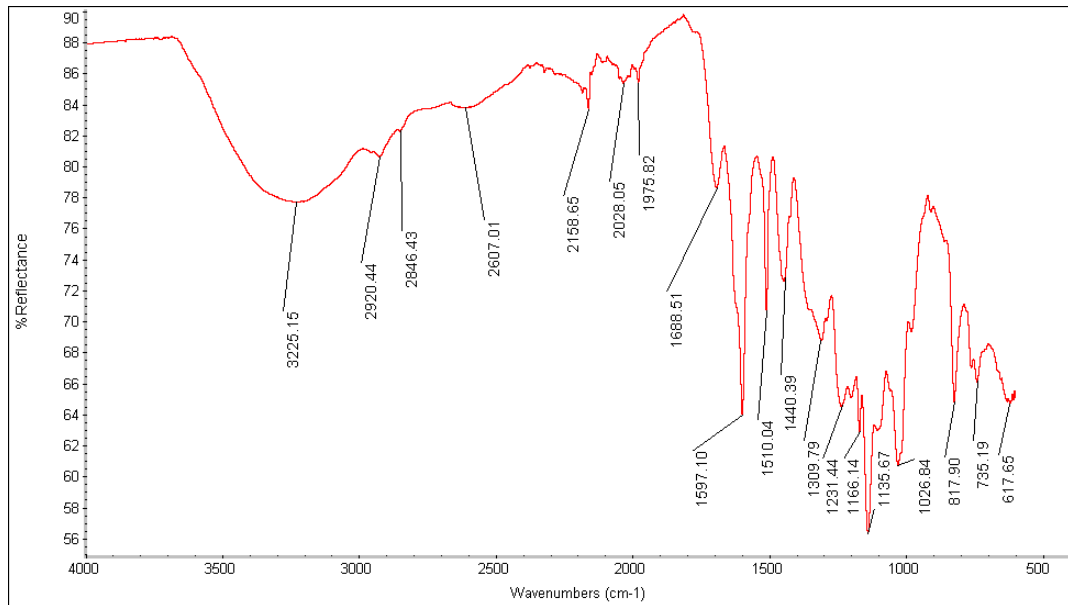
รูป IR spectrum ของ GTP ที่สกัดเอง (GTP)



รูป IR spectrum ของ GTP ที่ได้จากบริษัทบุญรอด (GTP-B)

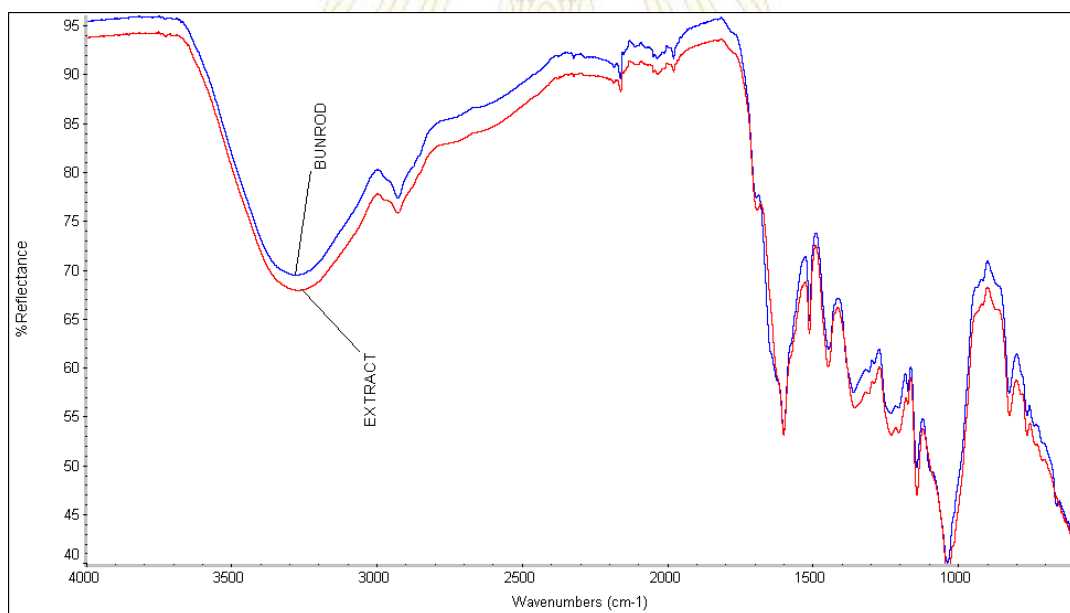


รูป IR spectrum ของผลิตภัณฑ์จาก GTP ที่สกัดเอง (W2)



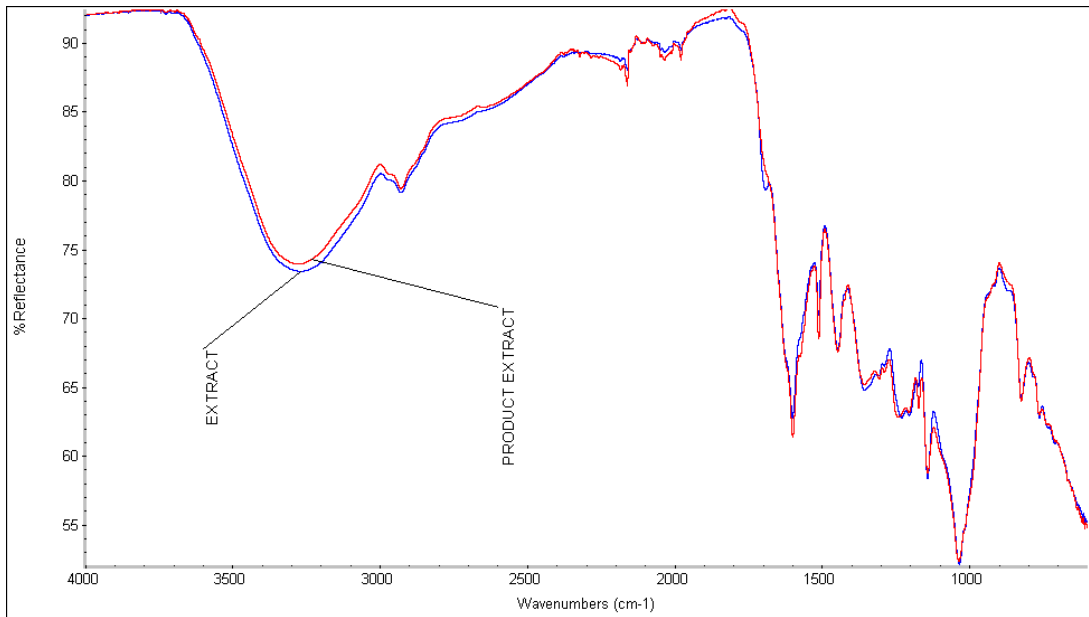
รูป IR spectrum ของผลิตภัณฑ์จาก GTP ที่ได้จากบริษัทบุญรอด (W2-B)

เมื่อนำ IR spectrum ต่าง ๆ ที่ได้มาเทียบกันจะได้ผลดังต่อไปนี้



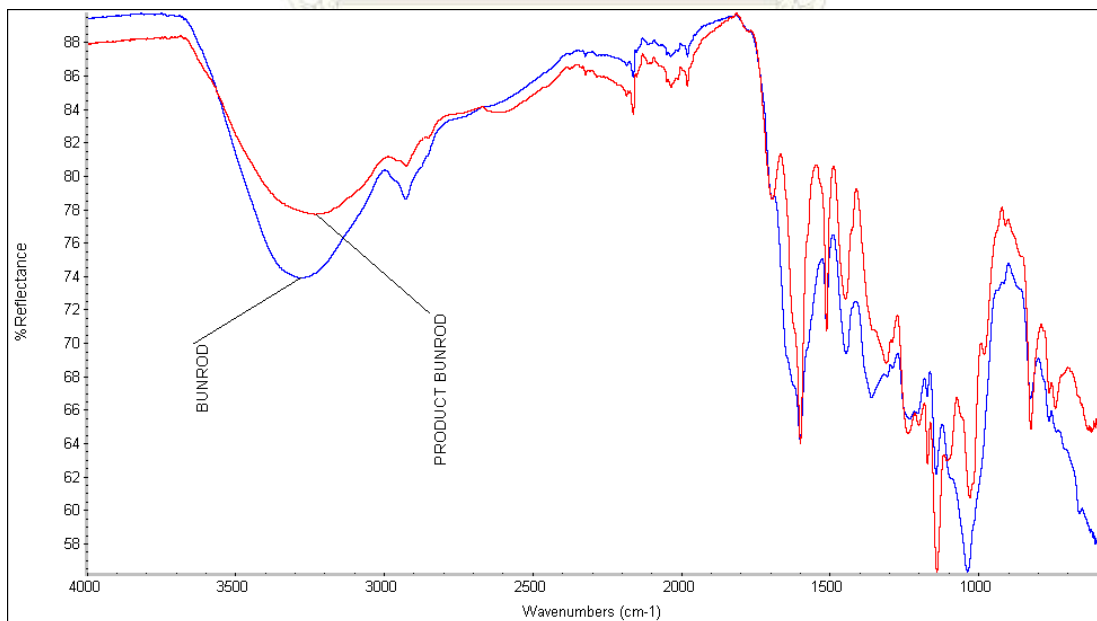
รูป IR spectrum ของ GTP ที่สกัดเองเทียบกับที่ได้จากบริษัทบุญรอด (GTP-B)

จากรูปจะเห็นว่า IR spectrum ของ GTP ที่สกัดเองกับที่ได้จากบริษัทบุญรอดไม่มีความแตกต่างกัน หมายความว่า GTP ทั้งสองมีหมู่ฟังก์ชันเหมือนกันและมีปริมาณของหมู่ฟังก์ชันใกล้เคียงกันมาก



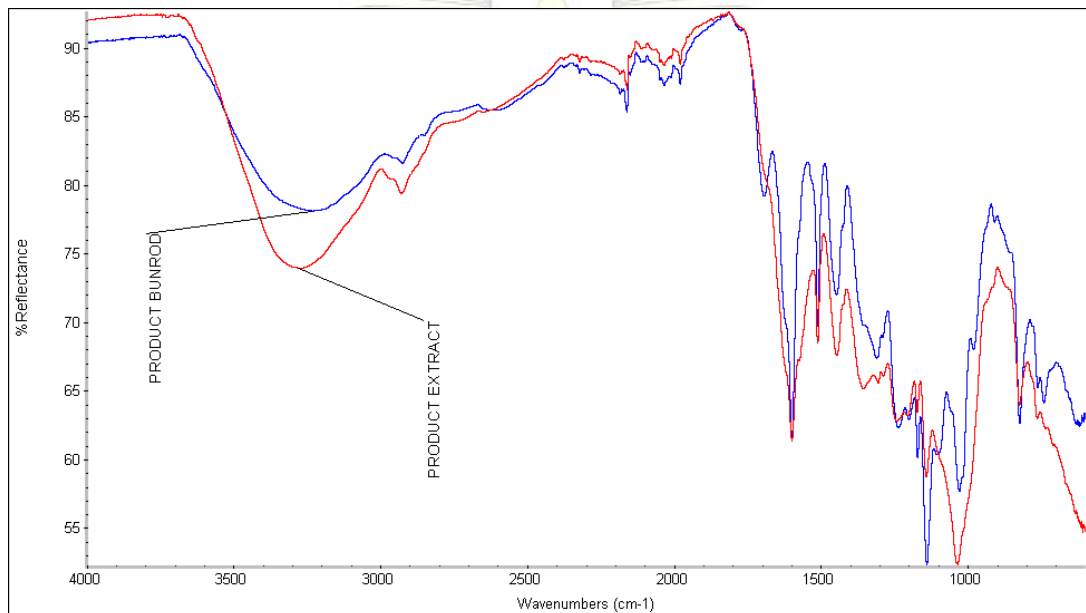
รูป IR spectrum ของ GTP กับ W2

จากรูปจะเห็นว่า IR spectrum ของ GTP ที่สกัดเองกับ W2 มีความเหมือนกันมากซึ่งอาจเป็นเพราะไม่มีผลิตภัณฑ์ที่ต้องการเกิดขึ้นเลย หรือผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นมีอัตราส่วนน้อยกว่า GTP มากจึงทำให้ spectrum ของ GTP บดบัง spectrum ของผลิตภัณฑ์จนไม่สามารถสังเกตเห็นความแตกต่างได้



รูป IR spectrum ของ GTP-B กับ W2-B

จากรูปจะเห็นว่า IR spectrum ของ GTP-B กับ W2-B มีความแตกต่างกันมากกว่า IR spectrum ของ GTP กับ W2 โดยเกิดพีคแบบ sharp และ medium ที่ $1400-1600\text{ cm}^{-1}$ อย่างชัดเจนแสดงถึง C=C stretching แปลว่าผลิตภัณฑ์มีองค์ประกอบของ aromatic เพิ่มขึ้น ซึ่งน่าจะเป็น spectrum ของ *p*-methoxycinnamate และที่ประมาณ 3200 cm^{-1} จาก O-H stretching พบว่า % reflectance ของผลิตภัณฑ์สูงกว่าของ GTP หมายความว่าผลิตภัณฑ์มีปริมาณหมู่ไฮดรอกซีน้อยกว่าของ GTP แปลว่าหมู่ไฮดรอกซีของ GTP บางตำแหน่งอาจเกิดปฏิกิริยากับ *p*-methoxycinnamic acid กลายเป็นสารประกอบเอสเทอร์

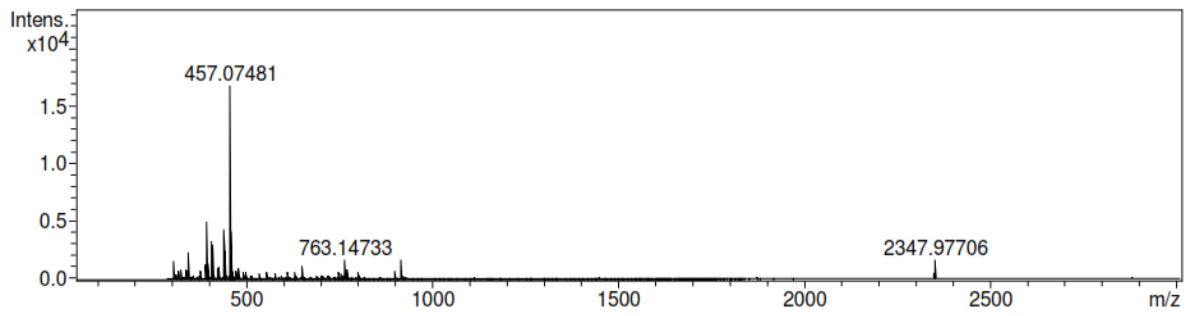


รูป IR spectrum ของ W2 กับ W2-B

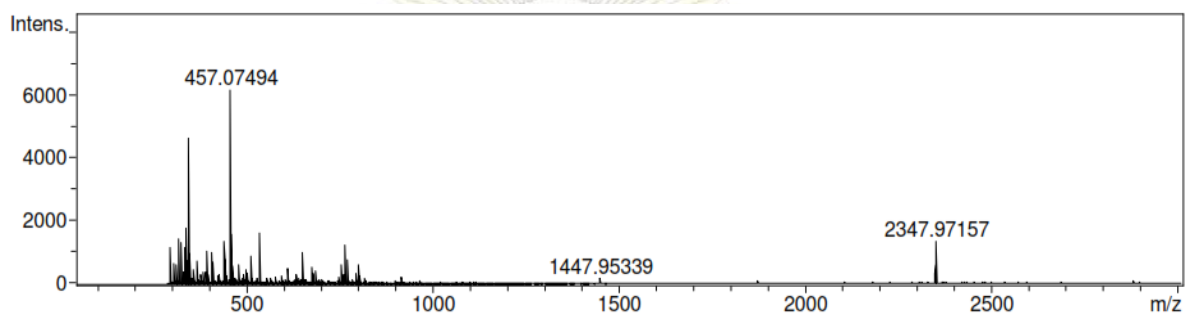
จากรูป IR spectrum ของ W2 กับ W2-B และการวิเคราะห์ IR spectrum ก่อนหน้านี้ ทำให้มีความเป็นไปได้ว่า W2-B มี *p*-methoxycinnamate เกิดขึ้นมากกว่า W2

ผลการทดลอง Mass spectrometry (MS)

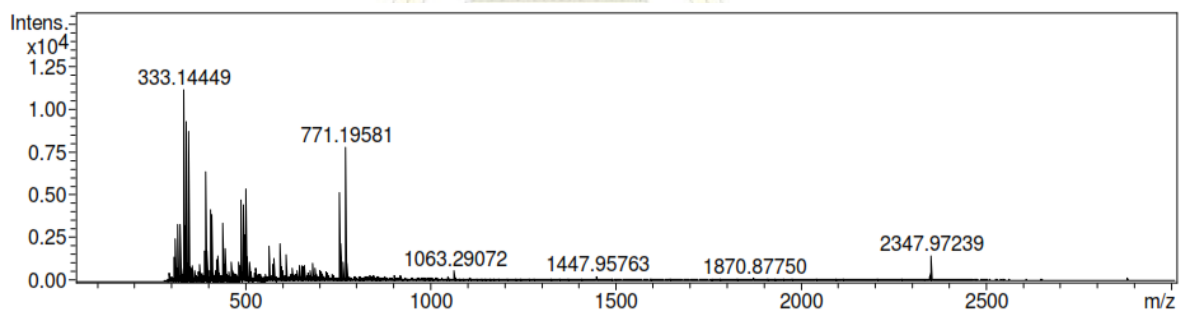
จากการนำสารตั้งต้น GTP, GTP-B, W2, และ W2-B ไปทดลอง MS ได้ผลการทดลองดังต่อไปนี้



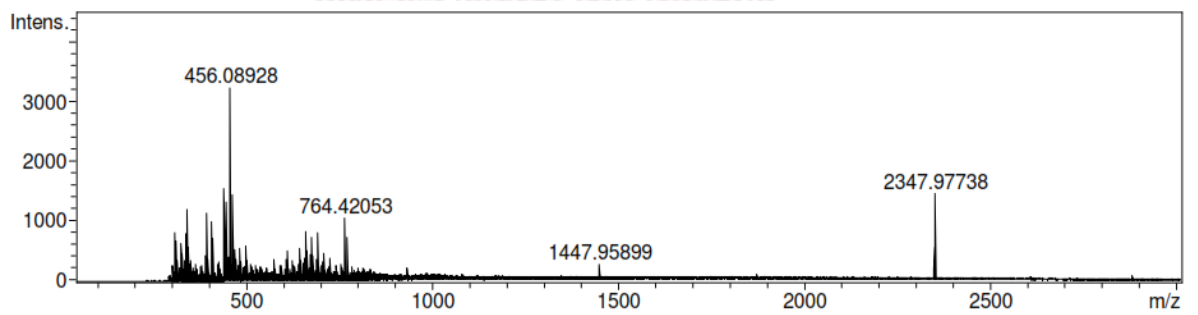
รูป Mass spectrum ของ GTP



รูป Mass spectrum ของ GTP-B



รูป Mass spectrum ของ W2



รูป Mass spectrum ของ W2-B

จาก Mass spectrum ต่างๆ ที่ได้สามารถระบุองค์ประกอบที่สนใจและมีความเป็นไปได้ที่จะพบในตัวอย่างดังตารางต่อไปนี้

ตารางแสดงองค์ประกอบที่สนใจและมีความเป็นไปได้ที่จะพบใน GTP

องค์ประกอบในตัวอย่าง	ค่า m/z ที่ได้จากการทดลอง (D)	ค่า m/z ที่ได้จากการคำนวณ (D)
EGC	305	306
$EC^- K^+$, $EGC^- Na^+$	325	328
$EGC^- K^+$	343	344
ECG	441-442	442
EGCG	457-459	458
$ECG^- K^+$, $EGCG^- Na^+$	479	480
$EGC-EGC^- K^+$	649	650
EGC-EGCG	763-764	764
$EC-EGC^- K^+$, $ECG-EGC^- Na^+$	771	770

ตารางแสดงองค์ประกอบที่สนใจและมีความเป็นไปได้ที่จะพบใน GTP-B

องค์ประกอบในตัวอย่าง	ค่า m/z ที่ได้จากการทดลอง (D)	ค่า m/z ที่ได้จากการคำนวณ (D)
EGC	305	306
$EC^- Na^+$	311	312
$EC^- K^+$, $EGC^- Na^+$	325	328
$EGC^- K^+$	341-344	344
ECG	441	442
EGCG	457-458	458
$ECG^- K^+$, $EGCG^- Na^+$	479	480
$EGCG^{2-} 2K^+$	533	534
$EGC-EGC^- K^+$	649	650
$EC-EGC^- Na^+$	755	754
EGC-EGCG	764	764
$EC-EGC^- K^+$, $ECG-EGC^- Na^+$	771	770

ตารางแสดงองค์ประกอบที่สนใจและมีความเป็นไปได้ที่จะพบใน W2

องค์ประกอบในตัวอย่าง	ค่า m/z ที่ได้จากการทดลอง (D)	ค่า m/z ที่ได้จากการ คำนวณ (D)
$EC^- Na^+$	311	312
$EC^- K^+$, $EGC^- Na^+$	325	328
$EGC^- K^+$	341-342	344
ECG	440	442
EC-p-MC	445	450
$EGC-p-MC^- Na^+$, $EC-p-MC^- K^+$	489	488
$EGCG^- K^+$, $EC-p-MC^{2-} 2Na^+$	495	496, 494
$EGC-p-MC^- K^+$	499-503	504
$EGC-p-MC^{3-} 2K^+ Na^+$	563	564
EC-EGC	593	596
EGC-EGC, EC-2p-MC	609	612, 610
$EC-EGC^- Na^+$	755-756	754
$EC-EGC^- K^+$, $ECG-EGC^- Na^+$	771-772	770

ตารางแสดงองค์ประกอบที่สนใจและมีความเป็นไปได้ที่จะพบใน W2-B

องค์ประกอบในตัวอย่าง	ค่า m/z ที่ได้จากการทดลอง (D)	ค่า m/z ที่ได้จากการ คำนวณ (D)
EGC	308	306
$EC^- Na^+$	312	312
$EC^- K^+$, $EGC^- Na^+$	324-325	328
$EGC^- K^+$	342-343	344
ECG	441	442
EC-p-MC	447	450
EGCG	456-457	458
$EC-p-MC^- Na^+$	469	472
$ECG^{2-} 2Na^+$	482	486
$ECG^{2-} K^+ Na^+$	498	502
EGC-EGC, EC-2p-MC	609	612, 610

ECG- <i>p</i> -MC ²⁻ 2Na ⁺	643	646
ECG- <i>p</i> -MC ²⁻ K ⁺ Na ⁺ , EGCG- <i>p</i> -MC ²⁻ 2Na ⁺	659-661	662
ECG- <i>p</i> -MC ²⁻ 2K ⁺	675	678
ECG- <i>p</i> -MC ⁴⁻ 4Na ⁺	691	690
EGCG- <i>p</i> -MC ²⁻ 2K ⁺	693	694
ECG- <i>p</i> -MC ⁴⁻ K ⁺ 3Na ⁺	707	706
EGC-EGCG	764	764
EC-EGC ⁻ K ⁺ , ECG-EGC ⁻ Na ⁺	771	770

หมายเหตุ - ค่า m/z ในตารางเป็นค่าโดยประมาณ

- ความหมายของสัญลักษณ์ที่ใช้ในตาราง

EC = Epicatechin (MW = 290.27 D)

ECG = Epicatechin gallate (MW = 442.37 D)

EGC = Epigallocatechin (MW = 306.27 D)

EGCG = Epigallocatechin gallate (MW = 458.37)

- = dimerization

-*p*-MC = esterified with *p*-methoxycinnamic acid

-2*p*-MC = esterified with *p*-methoxycinnamic acid 2 molecules

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย