การศึกษาเปรียบเทียบปริมาณโพลีฟีนอล ฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน และความเป็นพิษต่อเซลล์ของชาเขียวสามชนิดจากแหล่งที่ต่างกันในเอเชีย

สำนักงานวิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นางสาวโช ซานดา อึง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม หลักสูตรเทคโนโลยีเภสัชกรรม
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2545

ISBN 974-17-3346-1

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

COMPARATIVE STUDY OF POLYPHENOL CONTENTS, ANTIOXIDANT ACTIVITIES AND CYTOTOXICITY OF GREEN TEA FROM THREE DIFFERENT ASIAN SOURCES

Miss Cho Sanda Aung

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Pharmaceutical Technology
Pharmaceutical Technology Program
Faculty of Pharmaceutical Sciences
Chulalongkorn University
Academic Year 2002

ISBN 974-17-3346-1

Copyright of Chulalongkorn University

Thesis Title	Comparative Study Of Polyphenol Contents, Antioxidant Activities And Cytotoxicity Of Green Tea From Three Different Asian Sources
By	Miss Cho Sanda Aung
Field of study	Pharmaceutical Technology
Thesis Advisor	Associate Professor Papavadee Klongpityapong
Thesis Co-advisor	Assistant Professor Roongtawan Supabphol, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

.....Dean of Faculty of Pharmaceutical Sciences

(Associate Professor Boonyong Tantisira, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

.....Chairman

(Associate Professor Ubonthip Nimmannit, Ph.D.)

.....Thesis Advisor

(Associate Professor Papavadee Klongpityapong)

.....Member

(Assistant Professor Boonsri Ongpipattanakul, Ph.D.)

.....Member

(Assistant Professor Somchai Mekaroonreung)

##4476851833 : MAJOR PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY (INTERNATIONAL PROGRAM)
KEY WORD :ASIAN GREEN TEA/ GREEN TEA POLYPHENOL/ ANTIOXIDANT/ CYTOTOXICITY
CHO SANDA AUNG : COMPARATIVE STUDY OF POLYPHENOL CONTENTS, ANTIOXIDANT ACTIVITIES AND CYTOTOXICITY OF GREEN TEA FROM THREE DIFFERENT ASIAN SOURCES. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. PAPAVADEE KLONGPITYAPONG, THESIS CO-ADVISOR : ASST. PROF. ROONGTAWAN SUPABPHOL, Ph.D., 108 pp. ISBN 974-17-3346-1

Recently, green tea has become the focus of attention due to its wide range of positive health benefits. Green tea comes from *Camellia sinensis* (family Theaceae) which is native to Asian countries. In this study, green tea from three different Asian sources namely, Japanese green tea (JGT), Myanmar green tea (MGT) and Thai green tea (TGT) were chosen to be investigated and compared. Total polyphenol contents in the extracts were determined by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) assay and the results were observed as 58%, 55% and 54% (w/w) of dry solid weight for JGT, MGT and TGT respectively. The antioxidant activity of green tea extracts was then evaluated by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity assay and total antioxidant status assay. From the DPPH assay, it was found that all green tea extracts have stronger radical scavenging activity than butylated hydroxytoluene (BHT) with all exhibiting significantly lower effective concentration at 50% inhibition (EC_{50}) on DPPH radical. Total antioxidant status assay was determined by Randox kit method and no significant difference was observed among green tea extracts in terms of mmol/l Trolox equivalent, using Trolox as standard. The cytotoxicity of green tea extracts on melanoma cell line was examined by 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay. The cytotoxic effect was significantly difference with JGT having the highest inhibition and showing EC_{50} at 173 μg/ml followed by MGT (198 μg/ml) and TGT (206 μg/ml).

Field of study.....Pharmaceutical Technology..... Student's signature .....Cho Sanda Aung

Academic year.....2002..... Advisor's signature .....Papavadee Klongpityapong

โช ซานดา อึง : การศึกษาเปรียบเทียบปริมาณโพลีฟีนอล ฤทธิ์การต้านออกซิเดชันและความเป็นพิษต่อเซลล์ของชาเขียวสามชนิดจากแหล่งที่ต่างกันในเอเชีย (COMPARATIVE STUDY OF POLYPHENOL CONTENTS, ANTIOXIDANT ACTIVITIES AND CYTOTOXICITY OF GREEN TEA FROM THREE DIFFERENT ASIAN SOURCES) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ปภาวดี คล่องพิทยาพงษ์, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ผศ.ดร.รุ้งตะวัน สุภาพผล, 108 หน้า ISBN 974-17-3346-1

ปัจจุบันมีผู้สนใจเครื่องดื่มชาเขียว เนื่องจากมีประโยชน์ต่อสุขภาพอย่างกว้างขวาง ชาเขียวได้มาจากคาเมเลียไซแนนซิส (ตระกูลทีอาซี) ซึ่งเป็นพืชพื้นบ้านในประเทศแถบเอเชีย ในการศึกษานี้ได้เลือกชาเขียวจาก 3 ประเทศในเอเชีย คือ ญี่ปุ่น, พม่า และไทย เพื่อศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ของชา ปริมาณโพลีฟีนอลในสารสกัดวิเคราะห์ด้วยไฮเพอร์ฟอร์แมนลิควิดโครมาโตกราฟฟี่ (HPLC) พบปริมาณโพลีฟีนอลในชาเขียวญี่ปุ่น 58 เปอร์เซ็นต์ ชาเขียวพม่า 55 เปอร์เซ็นต์ และชาเขียวไทย 54 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักโดยน้ำหนัก) ของสารสกัดแห้ง วิเคราะห์ฤทธิ์การต้านออกซิเดชันของชาเขียวสกัดโดยใช้ 1,1-ไดเฟนิล-2 พิคริลไฮดราซิล (DPPH) และวิเคราะห์การต้านออกซิเดชันโดยรวม พบว่าชาเขียวสกัดทุกชนิดมีฤทธิ์ในการจับกลุ่มอนุมูลมากกว่าบิวทิเลท ไฮดรอกซีโทลูอีน (BHT) โดย ณ ความเข้มข้นในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (EC_{50}) มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ วิเคราะห์การต้านออกซิเดชันโดยรวมด้วยวิธีแรนดอกคิทไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อคิดเป็นค่ามิลลิโมลต่อลิตรเทียบกับโทรลอกซ์ที่เป็นสารมาตรฐาน วิเคราะห์ความเป็นพิษของเซลล์ของสารสกัดชาเขียวต่อเซลล์มะเร็งด้วย 3-[4,5-ไดเมทิลไทอาโซล-2-อิล]-2, 5-ไดเฟนิล-เตตราโซเลียม โบรไมด์ (MTT) พบความแตกต่างที่มีนัยสำคัญที่ EC_{50} ต่อเซลล์มะเร็ง ชาเขียวญี่ปุ่นจะสามารถยับยั้งได้สูงสุดที่ 173 ไมโครกรัมต่อซีซีตามด้วยชาเขียวพม่าที่ 198 ไมโครกรัมต่อซีซี และ ชาเขียวไทย 206 ไมโครกรัมต่อซีซี

ภาควิชา - ลายมือชื่อนิสิต ChoSandaAung

สาขาวิชา เทคโนโลยีเภสัชกรรมนานาชาติ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2545

ACKNOWLEDGEMENTS

My sincere and heartfelt thanks to my Advisor, Associate Professor Papavadee Klongpityavong, for her initial impetus, invaluable advice, guidance, encouragement, understanding and prompt action which have made this study a reality in time.

I am much indebted to Associate Professor Ubonthip Nimmannit, Ph.D. who, from the very first day of my stay at Chulalongkorn University has given me moral encouragements and who has never ceased to show her technical support, cordiality, kindness and generosity towards me.

My special thanks go to my co-advisor Assistant Professor Roongtawan Supabphol, Ph.D., Physiology Department, Faculty of Medicine, University of Srinakharinwirot whose technical guidance, expertise, comments and suggestions are highly regarded and appreciated. I am deeply honoured for her keen interest, dedication and deep enthusiasms shown in my study and for giving me the privilege of using the laboratory for my experiments.

I am very much obliged and honoured to the members of the Thesis Committee for their supportive attitude, constructive criticisms and for their invaluable discussions over my thesis.

It would not be completed without expressing my heartfelt gratitude to my parents and to my two sisters for their love, understanding, moral support and tremendous encouragements throughout my life.

I am duly grateful to my friends at the Faculty of Pharmaceutical Sciences, though not mentioned by names will always cherished in my heart forever, for all the help rendered and their timely assistance to overcome the Thai language difficulties. My special thanks go to my closest friend, Miss Apirada Sucontphunt (Pee Aeh) who never fails to turn up in time of need to me during my stay in Bangkok. Last but not the least, I would like to express my sincere appreciation to all the the faculty members of the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University and Physiology Department, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University for their kind assistance and without whose untiring efforts and patience with late hours experiments, this report might not have materialized in time.

CONTENTS

PAGE

ABSTRACT (ENGLISH).....iv

ABSTRACT (THAI).....v

ACKNOWLEDGEMENTS.....vi

CONTENTS.....vii

LIST OF TABLES.....viii

LIST OF FIGURES.....x

LIST OF ABBREVIATIONS.....xii

CHAPTER

I INTRODUCTION.....1

II LITERATURE REVIEWS.....4

III MATERIALS AND METHODS.....36

IV RESULTS AND DISCUSSION.....48

V CONCLUSION.....72

REFERENCES.....76

APPENDICES.....82

APPENDIX I.....83

APPENDIX II.....87

APPENDIX III.....91

APPENDIX IV.....97

APPENDIX V.....100

APPENDIX VI.....102

BIOGRAPHY.....108

LIST OF TABLES

TABLE **PAGE**

1. The peak area of the standard EGC.....50
2. The peak area of the standard caffeine.....51
3. The peak area of the standard EGCG.....52
4. The peak area of the standard EC 53
5. The peak area of the standard ECG 54
6. Qualitative and quantitative analysis of total polyphenol content present in each of green tea extracts by reverse-phase HPLC.....56
7. The radical scavenging activity of the antioxidant BHT on the DPPH radical.....58
8. The radical scavenging activity of Japanese green tea extract on the DPPH radical.....59
9. The radical scavenging activity of Myanmar green tea extract on the DPPH radical.....60
10. The radical scavenging activity of the Thai green tea on the DPPH radical.....61
11. Effective concentration at 50% inhibition (EC_{50}) of BHT and green tea extracts from DPPH assay.....62
12. The total antioxidant activity green tea extracts by Randox kit 63
13. Percent inhibition data of Japanese green tea extract on melanoma cell line by MTT assay.....65
14. Percent inhibition data of Myanmar green tea extract on melanoma cell line by MTT assay.....67
15. Percent inhibition data of Thai green tea extract on melanoma cell line by MTT assay.....68

LIST OF TABLES (CONT.)

TABLE **PAGE**

16. Comparison of the cytotoxicity of green tea extracts at 50% inhibition level (EC_{50}) on mellanoma cell line by MTT assay.....71

17. The statistical data for the comparison of total polyphenol content.....103

18. The statistical data for the comparison of EC_{50} on DPPH radical (among green tea extracts).....104

19. The statistical data for the comparison of EC_{50} on DPPH radical (BHT and green tea extracts).....105

20. The statistical data for the comparison of the total antioxidant activity.....106

21. The statistical data for the comparison of EC_{50} on melanoma cell line by MTT assay.....107

LIST OF FIGURES

FIGURE **PAGE**

1. Schematic preparation of the way of processing of green tea and black tea.....7
2. Major components of green tea and black tea.....9
3. Structures of the flavonoids.....17
4. Structures of green tea polyphenols.....18
5. Schematic presentation of the extraction of the green tea polyphenols from dried green tea leaves.....39
6. High-perfomance liquid chromatogram of standard catechins and caffein mixture 49
7. The calibration curve of the standard EGC.....50
8. The calibration curve of the standard caffeine 51
9. The calibration curve of the standard EGCG 52
10. The calibration curve of the standard EC 53
11. The calibration curve of the standard ECG 54
12. The dose-response representative curve of the radical scavenging activity of antioxidant BHT on DPPH radical.....58
13. The dose-response representative curve of the radical scavenging activity of Japanese green tea extract on DPPH radical.....59
14. The dose-response representative curve of the radical scavenging activity of Myanmar green tea extract on DPPH radical.....60
15. The dose-response representative curve of the radical scavenging activity of Thai green tea extract on DPPH radical.....61
16. Comparison of the total antioxidant activity among green tea extracts by Randox kit.....63

LIST OF FIGURES (CONT.)

FIGURE **PAGE**

17. The dose-response representative curve from the cytotoxicity study of JGT extract on melanoma cell-line by MTT assay.....66
18. The dose-response representative curve from the cytotoxicity study of MGT extract on melanoma cell-line by MTT assay.....68
19. The dose-response representative curve from the cytotoxicity study of TGT extract on melanoma cell-line by MTT assay.....70
20. The UV absorption spectrum of Epigallocatechin (EGC).....84
21. The UV absorption spectrum of caffeine.....84
22. The UV absorption spectrum of Epigallocatechin gallate (EGCG).....85
23. The UV absorption spectrum of Epicatechin (EC).....85
24. The UV absorption spectrum of Epicatechin gallate (ECG).....86
25. High-Performance Liquid chromatogram of Japanese green tea extract.....88
26. High-Performance Liquid chromatogram of Myanmar green tea extract.....89
27. High-Performance Liquid chromatogram of Thai green tea extract.....90
28. Comparison of the radical scavenging activity of green tea extracts at EC50 studied by DPPH assay.....98
29. Diagram showing the reaction of total antioxidant activity assay (Randox kit).....99

LIST OF ABBREVIATIONS

A375	=	melanoma cell line
ABTS	=	2,2'-azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulphonate]
ANOVA	=	analysis of variance
BHT	=	butylated hydroxytoluene
CV	=	coefficient of variation
conc.	=	concentration
^{o}C	=	degree celcius
DPPH	=	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
EC_{50}	=	effective concentration at 50 % inhibition
EC	=	epicatechin
ECG	=	epicatechin gallate
EGC	=	epigallocatechin
EGCG	=	epigallocatechin gallate
EDTA	=	ethylenediaminetetra acetic acid
et al.	=	*et alii*
FBS	=	fetal bovine serum
GTP	=	green tea polyphenols
g	=	gram
HPLC	=	high performance liquid chromatography
hr.	=	hour
JGT	=	Japanese green tea
MGT	=	Myanmar green tea
TGT	=	Thai green tea
l	=	liter
µg	=	microgram
µl	=	microliter

LIST OF ABBREVIATIONS (CONT.)

mg	=	milligram
ml	=	milliliter
mmol	=	milimole
min.	=	minute
MTT	=	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
nm	=	nanometer
PBS	=	phosphate buffer saline
R^2	=	coefficient of determination
r.p.m	=	revolution per minute
% w/w	=	percent weight by weight
SD	=	standard deviation
UV	=	ultraviolet