



โครงการ การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ	การสังเคราะห์ ไลซีน-กราฟต์ พอลิเมอร์ของพอลิฟีนอลจากชาเพื่อต้านโรคมะเร็ง Synthesis of lysine-grafted polymerized tea polyphenol for anticancer
ชื่อนิสิต	นางสาวอิสราภรณ์ อิงสถิตธนวันต์
ภาควิชา	เคมี
ปีการศึกษา	2560

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การสังเคราะห์ ไลซีน-กราฟต์ พอลิเมอร์ของพอลิฟีนอลจากชา
เพื่อต้านโรคมะเร็ง

Synthesis of lysine-grafted polymerized tea polyphenol
for anticancer

โดย
นางสาวอิสราภรณ์ อิงสถิตธนวันต์

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2560

โครงการ การสังเคราะห์ โไลซีน-กราฟต์ พอลิเมอร์ของพอลิฟินอลจากชาเพื่อต้านโรคมะเร็ง
โดย นางสาวอิสราภรณ์ อิงสถิตชนวันต์

ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบโครงการ


..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พร้อมพงศ์ เพียรพินิจธรรม)


..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(ศาสตราจารย์ ดร.ศุภศร วณิชเวชารุ่งเรือง)


..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุรัชย์ พรหมกุล)

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยหัวหน้าภาควิชาเคมี

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

วันที่ เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2561

คุณภาพของการเขียนรายงานเล่มนี้อยู่ในระดับ ดีมาก ดี พอใช้

ชื่อโครงการ การสังเคราะห์ โลซีน-กราฟต์ พอลิเมอร์ของพอลิฟีนอลจากชาเพื่อต้านโรคมะเร็ง
ชื่อนิสิตในโครงการ นางสาวอิสราภรณ์ อิงสถิตธวันต์ เลขประจำตัว 5733190023
ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ศาสตราจารย์ ดร.ศุภสร วณิชเวชารุ่งเรือง
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2560

บทคัดย่อ

Epigallocatechin gallate (EGCG) เป็นสารประกอบพอลิฟีนอลที่พบได้ในชา มีฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง โดย polymerized EGCG จะทำให้ได้สารที่มีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งสูงกว่า EGCG แต่อย่างไรก็ตาม polymerized EGCG ส่วนใหญ่ มีความสามารถในการกระจายตัวในน้ำต่ำ และมีลักษณะเป็นยางเหนียว (gum) ในงานวิจัยครั้งนี้ได้ทำการกราฟต์โกลซีนลงบนสารที่เป็นยางเหนียว โดยปฏิกิริยา carbodiimide coupling พบว่าเมื่อกราฟต์โกลซีนลงบน polymerized EGCG ผลิตภัณฑ์ที่ได้สามารถจัดตัวเป็นอนุภาคขนาดเล็ก สามารถกระจายตัวในน้ำได้ดีขึ้น และเมื่อนำสารที่ได้มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) ด้วยวิธี MTT assay พบว่า สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ดีกว่ายางเหนียวที่ไม่ได้มีการกราฟต์โกลซีน

คำสำคัญ: polymerized EGCG, โกลซีน, ฤทธิ์ต้านมะเร็ง

Project Title Synthesis of lysine-grafted polymerized tea polyphenol for anticancer
Student Name Miss Issaraporn Engsatidtanawan Student ID 5733190023
Advisor Name Prof. Supason Wanichwecharungruang, Ph.D.
Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Academic Year 2017

Abstract

It has been known that epigallocatechin gallate (EGCG), a phenolic compound found in green tea, exhibits anticancer activity. Previous work has shown that the polymerized EGCG exhibits higher anticancer activity than EGCG. However most of the polymerized EGCG products are water immiscible and possess sticky and gummy characteristic. Here we grafted lysine on to the insoluble polymerized EGCG (gum) via carbodiimide coupling, to improve its water dispersibility. We found that the obtained lysine-grafted products could self assemble into spherical-shaped particles with the size of 23 ± 7.34 nm and the particles were water-dispersible. Moreover, cytotoxicity using MTT assay indicated that the lysine-grafted product inhibited the growth of HepG2 liver cancer cells more effectively than the ungrafted material.

Keywords: polymerized EGCG, lysine, anticancer

กิตติกรรมประกาศ

ในการจัดทำโครงการการสังเคราะห์ ไลซีน-กราฟต์ พอลิเมอร์ของพอลิฟีนอลจากชาเพื่อต้านโรคมะเร็ง ผู้วิจัยสามารถจัดทำรายงานฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความอนุเคราะห์สนับสนุนและคำแนะนำจาก ศาสตราจารย์ ดร. ศุภสร วณิชเวชารุ่งเรือง อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ที่กรุณาให้ความรู้ ความเข้าใจ และคำแนะนำต่าง ๆ ตลอดระยะเวลาที่ทำการวิจัย รวมถึงให้ความช่วยเหลือในการเขียนรายงานฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ และขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สุรชัย พรภักกุล และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พร้อมพงศ์ เพียรพิณิจธรรม ที่ให้เกียรติมาเป็นกรรมการประเมินเล่มโครงการนี้

ขอขอบคุณคณาจารย์ทุกท่าน และ ขอขอบคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้ความรู้และประสบการณ์ต่าง ๆ

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณครอบครัว และ SW lab group ที่ให้คำปรึกษา เป็นกำลังใจและสนับสนุนผู้วิจัยอยู่เสมอ ทำให้สามารถทำงานสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี



สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญรูป	ช
สัญลักษณ์และคำย่อ	ฌ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์และขอบเขตงานวิจัย	2
1.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	2
1.3.1 มะเร็งและการรักษา	2
1.3.2 ข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับ tea polyphenols	2
1.3.3 epigallocatechin gallate (EGCG)	4
1.3.4 polymerized EGCG	4
1.3.5 water-insoluble polymerized EGCG (gum)	5
1.3.6 lysine	5
บทที่ 2 การทดลอง	6
2.1 สารเคมี และอุปกรณ์	6
2.2 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	6
2.3 การสังเคราะห์ polymerized EGCG	7
2.4 การสังเคราะห์ Boc-lysine-gum	7
2.5 การกำจัดหมู่ Boc บน Boc-lysine-gum	8
2.6 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของ lysine-gum	8
2.6.1 การวิเคราะห์ความสามารถในการดูดกลืนแสง ด้วยเทคนิค UV/Vis Spectrophotometer	8
2.6.2 พิสูจน์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดชนิดฟิวอิมิชชัน	8
2.6.3 พิสูจน์ด้วยเทคนิค Nuclear Magnetic Resonance (NMR)	8
2.6.4 พิสูจน์ด้วยเทคนิค Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR)	9
2.7 ตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT assay	9
2.7.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งตับ HepG2	9
2.7.2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT assay	9

บทที่ 3 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง	11
3.1 การสังเคราะห์ gum	11
3.2 การสังเคราะห์ Boc-lysine-gum	12
3.3 การกำจัดหมู่ Boc บน Boc-lysine-gum	13
3.4 การวิเคราะห์สารด้วยเทคนิค UV-vis spectrometry	14
3.5 การพิสูจน์เอกลักษณ์สารโดยใช้เทคนิค FT-IR	15
3.6 การศึกษาลักษณะรูปร่างของอนุภาคต่าง ๆ ด้วยเครื่อง field emission scanning electron microscope (FESEM)	18
3.7 การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งด้วยวิธี MTT assay	20
3.8 การพิสูจน์ทราบเอกลักษณ์สารโดยใช้เทคนิค ¹ H-NMR	21
บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง	23
เอกสารอ้างอิง	24
ประวัติผู้วิจัย	26



สารบัญรูปประกอบ

	หน้า
รูปที่ 1.1 โครงสร้างของ theasinensins A, B, C, D และ E	1
รูปที่ 1.2 รูปลักษณะทางสัณฐานวิทยาของชา	2
รูปที่ 1.3 โครงสร้างสารพอลิฟีนอลต่าง ๆ	3
รูปที่ 1.4 โครงสร้าง lysine	5
รูปที่ 3.1 กลไกการทำงานของเอนไซม์ Horseradish Peroxidase (HRP)	10
รูปที่ 3.2 (a) EGCG, (b) polymerized EGCG แบบละลายน้ำได้, (C) gum	11
รูปที่ 3.3 แผนภาพการสังเคราะห์ Boc-lysine-gum	11
รูปที่ 3.4 (a) gum และ (b) Boc-lysine-gum	12
รูปที่ 3.5 แผนภาพการสังเคราะห์ lysine-gum	12
รูปที่ 3.6 (a) Boc-lysine-gum และ (b) lysine-gum	13
รูปที่ 3.7 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของ EGCG, gum, Boc-lysine, Boc-lysine-gum และ lysine-gum	13
รูปที่ 3.8 โครงสร้าง Boc-lysine	14
รูปที่ 3.9 โครงสร้าง PEG	15
รูปที่ 3.10 FT-IR สเปกตรัมของ (a) EGCG, (b) PEG, (c) gum, (d) Boc-lysine, (e) Boc-lysine-gum และ (f) lysine-gum	17
รูปที่ 3.11 ภาพ FESEM ของอนุภาค gum ที่ใช้กำลังขยาย (a) 1000X, (b) 2000X และ (c) 5000X	18
รูปที่ 3.12 ภาพ FESEM ของอนุภาค Boc-lysine-gum ที่ใช้กำลังขยาย (a) 2000X, (b) 5000X และ (c) 10000X	19
รูปที่ 3.13 ภาพ FESEM ของอนุภาค lysine-gum ที่ใช้กำลังขยาย (a) 50000X และ (b) 100000X	20
รูปที่ 3.14 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นต่าง ๆ ของอนุภาค Paclitaxel, EGCG, gum และ lysine-gum และเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์มะเร็ง HepG2	20
รูปที่ 3.15 1H-NMR สเปกตรัมของ (a) EGCG, (b) polymerized EGCG 3 hr., (c) polymerized EGCG 6 hr., (d) polymerized EGCG 12 hr., (e) polymerized EGCG 48 hr., (f) Boc-lysine, (g) Boc-lysine-gum และ (h) lysine-gum	22

สัญลักษณ์และคำย่อ

EGCG	= Epigallocatechin gallate
HRP	= Horseradish peroxidase
PEG	= Polyethylene glycol
DMF	= Dimethylformamide
EDCI	= 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide
NHS	= N-hydroxysuccinimide
TFA	= Trifluoroacetic acid
Boc-lysine	= N ^α ,N ^ε -Bis(tert-butoxycarbonyl)-L-lysine Dicyclohexylammonium Salt
Boc-lysine-gum	= N ^α ,N ^ε -Bis(tert-butoxycarbonyl)-L-lysine grafted gum
lysine-gum	= L-lysine grafted gum
DI water	= Deionized water

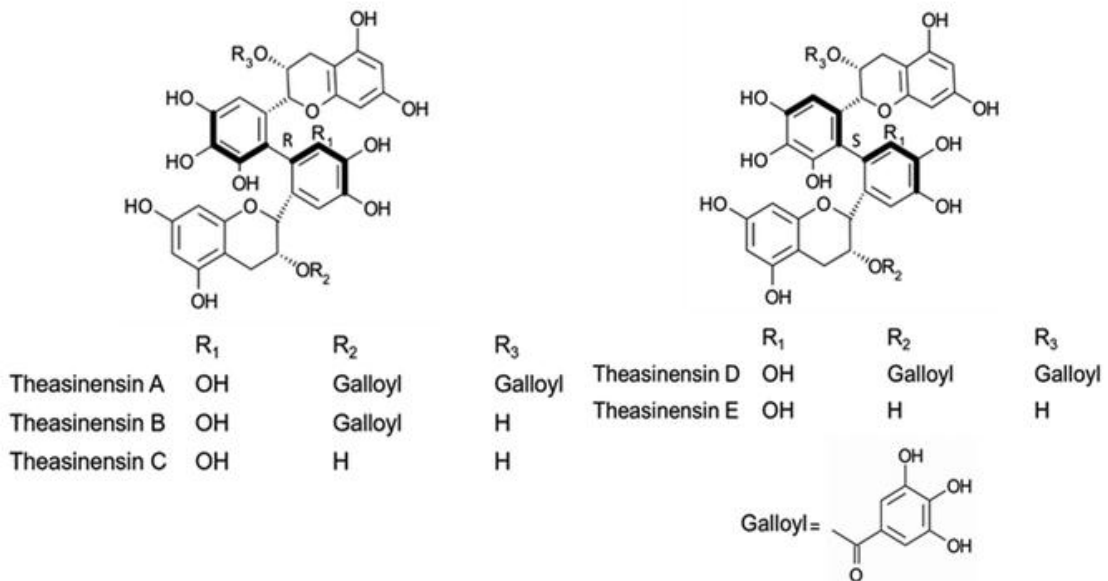
บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันมีผู้คนจำนวนมากที่ป่วยด้วยโรคมะเร็ง “ชา” เป็นหนึ่งทางเลือกที่มีรายงานว่าสามารถต้านมะเร็งได้^{2,3} ในชาที่มีสารพอลิฟีนอล ที่สำคัญ อาทิ เช่น gallic acid (GA), (-)-gallocatechin (GC), (+)-catechin, (-)-epicatechin (EC), (-)-epigallocatechin (EGC), (-)-epicatechin gallate (ECG), (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) เป็นต้น¹ ซึ่งสารที่มีปริมาณมากที่สุดคือ (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) และในงานวิจัยที่ผ่านมาได้ระบุว่า EGCG นั้นเป็นสารที่มีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งสูง² โดยสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ดี³

ชา สามารถแบ่งตามกระบวนการผลิตได้ 4 ประเภท คือ ชาเขียว (unfermented) ชาดำ (fermented) ชาอู่หลง (semi-fermented) และ ชาหลังจากกระบวนการหมัก (post-fermented) มีรายงานว่ากระบวนการหมักชา ทำให้ได้พอลิฟีนอลกลุ่มใหม่ที่เป็น polymerized polyphenols คือ theasinensins A, B, C, D และ E (รูปที่ 1.1) ซึ่งสารกลุ่มนี้มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ดีกว่า EGCG^{4,5}



รูปที่ 1.1 โครงสร้างของ theasinensins A, B, C, D และ E⁶

เมื่อศึกษาทางด้าน polymerized tea polyphenols พบว่า Pukfukdee⁷ และคณะ สามารถสังเคราะห์พอลิเมอร์ของพอลิฟีนอลจากชา ด้วยวิธี templated polymerization และสารที่ได้ให้ฤทธิ์การต้านมะเร็งดีกว่า EGCG อย่างไรก็ตาม ยังติดปัญหาการนำสารที่ได้ไปใช้งานเนื่องจากพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ได้ส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นยางเหนียวไม่ละลายน้ำ

ดังนั้นในงานวิจัยนี้ จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะปรับปรุงการละลายน้ำของพอลิเมอร์ที่ได้จากการพอลิเมอไรเซชัน ECGG โดยจะทำการเพิ่มประจุบวกลงไปในสายพอลิเมอร์ ซึ่งในที่นี้จะใช้การกราฟต์ไลซีนลงไปในสายพอลิเมอร์ ซึ่งไลซีนเป็นกรดอะมิโนที่มี side chain ที่เป็นประจุบวกเมื่ออยู่ในสภาวะปกติของ pH ร่างกาย ดังนั้นจึงน่าจะเพิ่มความสามารถในการละลายน้ำของพอลิเมอร์ดังกล่าว หรือหากพอลิเมอร์มีการจัดตัวเป็นอนุภาคได้ ไลซีนที่กราฟต์อยู่ น่าจะช่วยให้อนุภาคกระจายตัวในน้ำได้ดีขึ้น

1.2 วัตถุประสงค์และขอบเขตงานวิจัย

เพื่อสังเคราะห์ ไลซีน-กราฟต์พอลิเมอร์ของ (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG)

1.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1.3.1 มะเร็งและการรักษา

โรคมะเร็ง คือ โรคที่เกิดจากความผิดปกติบริเวณ DNA ส่งผลให้เซลล์ร่างกายเจริญเติบโตและแบ่งตัวอย่างรวดเร็ว จนเกิดก้อนเนื้อที่ผิดปกติ และนำไปสู่การเสียชีวิตได้ การรักษาโรคมะเร็งในปัจจุบันมีด้วยกันดังนี้

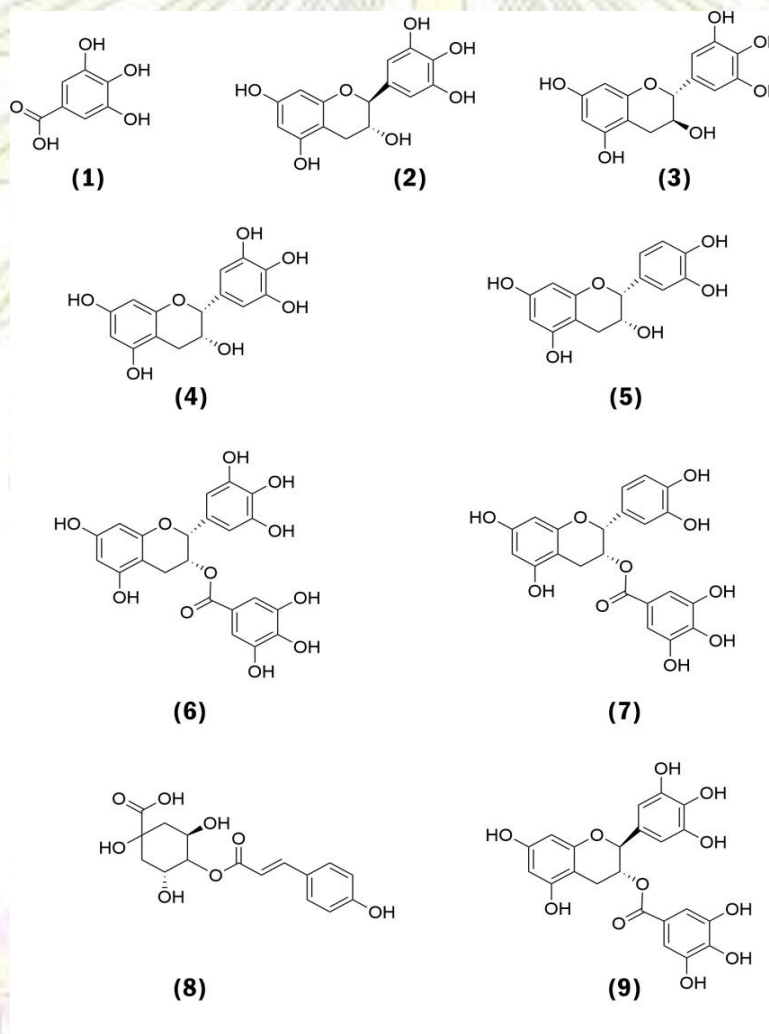
1. การผ่าตัดเพื่อนำก้อนเนื้อมะเร็งออก
2. รังสีบำบัด โดยการฉายแสงเพื่อทำลายเซลล์มะเร็ง
3. เคมีบำบัด เป็นการรักษาโดยใช้ยาหรือสารเคมีที่มีความสามารถในการยับยั้งหรือทำลายเซลล์มะเร็ง ซึ่งยาที่ใช้ในการรักษา มะเร็งมีด้วยกันมากมาย เช่น Paclitaxel ออกฤทธิ์โดยรบกวนการทำงานของ microtubules ในกระบวนการแบ่งเซลล์⁹ Cisplatin ออกฤทธิ์ขัดขวางกระบวนการจำลองตัวเองของ DNA โดยจับกับบริเวณสาย DNA⁹ และ Camptothecin ออกฤทธิ์จับกับเอนไซม์ Topoisomerases I ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีส่วนสำคัญในกระบวนการจำลองตัวเองของ DNA¹⁰

1.3.2 ข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับ Tea polyphenols



รูปที่ 1.2 รูปลักษณะทางสัณฐานวิทยาของชา¹¹

ชา (ชื่อวิทยาศาสตร์ *Canellia sinensis*) อยู่ในสกุล *Theaceae* บริเวณใบและยอดอ่อนถูกบริโภคอย่างแพร่หลาย และยังมีฤทธิ์ทางชีวภาพมากมาย มีงานวิจัยที่สนับสนุนว่าการบริโภคชาอาจช่วย ป้องกันการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด¹² ลดคอเลสเตอรอล¹³ ต้านการอักเสบ¹⁴ ต้านแบคทีเรีย¹⁵ ต้านอนุมูลอิสระและต้านมะเร็ง¹ โดยในชาจะประกอบด้วยสารพอลิฟีนอลต่างๆ (รูปที่ 1.3) ได้แก่ gallic acid (GA), gallocatechin (GC), catechin (C), epicatechin (EC), epigallocatechin (EGC), epicatechin gallate (ECG), epigallocatechin gallate (EGCG), *p*-coumaroylquinic acid (CA) และ gallocatechin-3-gallate (GCG)¹⁶ โดย ชา สามารถแบ่งตามกระบวนการผลิตได้ 4 ประเภท คือ ชาเขียว (unfermented tea) ได้จากการเก็บเกี่ยวแล้วนำมาอบไอน้ำเพื่อไม่ให้เกิดการหมักของชา ชาดำ (fermented tea) ได้จากกระบวนการหมักใบชาอย่างสมบูรณ์ ชาอู่หลง (semi-fermented) ได้จากกระบวนการหมักใบชาแบบไม่สมบูรณ์ และชาหลังจากกระบวนการหมัก (post-fermented)



รูปที่ 1.3 โครงสร้างสารพอลิฟีนอลต่าง ๆ (1) gallic acid (2) gallocatechin (3) catechin (4) epigallocatechin (5) epicatechin (6) epigallocatechin gallate (7) epicatechin gallate (8) *p*-coumaroylquinic acid และ (9) gallocatechin gallate.²

1.3.3 Epigallocatechin gallate (EGCG)

ในบรรดาสารพอลิฟีนอลประเภทต่าง ๆ epigallocatechin gallate (EGCG) มีปริมาณอยู่มากที่สุดในใบชา²¹ โครงสร้างของ EGCG ประกอบด้วย flavan-3-ol เป็นโครงสร้างหลัก และมีหมู่ hydroxyl group เป็นจำนวนมาก จึงทำให้สามารถละลายน้ำได้ดี และยังมีฤทธิ์ทางชีวภาพต่าง ๆ เช่น ต้านการอักเสบ¹⁴, ต้านอนุมูลอิสระ และยั้งต้านมะเร็งอีกด้วย¹

ในปี ค.ศ. 2011, Wang และคณะ¹⁷ ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของ EGCG ในเซลล์มะเร็งในคนและเซลล์มะเร็งปอดในหนู พบว่าระดับของ miR-210 เพิ่มขึ้น ซึ่งการเพิ่มขึ้นของระดับ miR-210 นั้นมีนัยสำคัญต่อการลดลงของการแบ่งตัวในเซลล์มะเร็ง

ในปี ค.ศ. 2012, Du และคณะ¹⁸ ได้ทดสอบการออกฤทธิ์ของพอลิฟีนอล 10 ชนิดซึ่งเป็นองค์ประกอบของชา ได้แก่ epigallocatechin gallate (EGCG), caffeic acid (CA), gallic acid (GA), catechin (C), epicatechin (EC), galocatechin (GC), epigallocatechin (EGC), catechin gallate (CG), epicatechin gallate (ECG) และ galocatechin gallate (GCG) โดยทดสอบในเซลล์มะเร็ง SW-480 และ HCT-116 ด้วยวิธี MTS assay พบว่า EGCG มีประสิทธิภาพออกฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งได้มากที่สุดเมื่อเทียบกับพอลิฟีนอลชนิดอื่น ๆ

ในปี ค.ศ. 2017, Kwak และคณะ¹⁹ ได้ศึกษาฤทธิ์ทางเคมีของ EGCG ต่อเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี (HuCC-T1 cell) ทั้งใน *in vitro* และ *in vivo* พบว่า EGCG สามารถยับยั้งและต้านเซลล์ HuCC-T1 cell โดยไม่ส่งผลอันตรายต่อเซลล์ปกติ นอกจากนี้ยังยับยั้งการเจริญเติบโตของก้อนเนื้อที่ผิดปกติได้

1.3.4 Polymerized EGCG

Polymerized EGCG พบทั้งในชาอุ่หลง (semi-fermented tea) ชาดำ (Fermented tea) และชาหลังจากกระบวนการหมัก (post-fermented) คาดว่ากระบวนการหมักชา ทำให้ได้พอลิฟีนอลลกลุ่มใหม่ซึ่งเป็น polymerized polyphenols โดยตัวอย่างของสารในกลุ่ม polymerized tea polyphenol ที่มีคนชี้เฉพาะไว้แล้ว ได้แก่ theasinensins A, B, C, D และ E (รูปที่ 1) ซึ่งสารกลุ่มนี้มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ดีกว่า EGCG²⁰

ในปี ค.ศ.1999 Yamamoto²³ และคณะ ได้ศึกษาฤทธิ์ของ Tea polyphenol ต่อเซลล์มะเร็ง HT1080 พบว่า EGCG สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 80 µg/mL ในขณะที่ Theaflavin (polymerized EGCG) สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้เช่นกัน โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 30 µg/mL

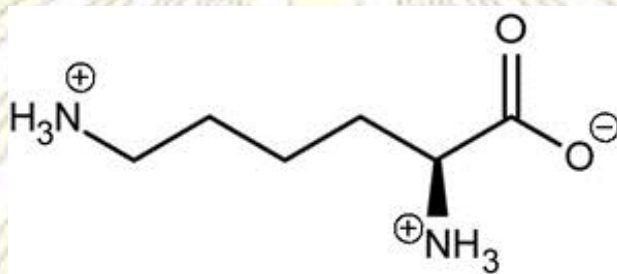
ในปี ค.ศ. 2000 Pan²⁰ และคณะ ได้ศึกษาฤทธิ์ของ theasinensin A ในเซลล์มะเร็งต่อมน้ำเหลือง U937 พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งมะเร็งได้ดีกว่า EGCG โดย theasinensin A มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 12 µg/mL ในขณะที่ EGCG มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 26 µg/mL

1.3.5 Water-insoluble polymerized EGCG (Gum)

ในปี ค.ศ. 2016, Pukfukdee⁷ และคณะ สามารถสังเคราะห์พอลิเมอร์ของพอลิฟีนอลจากชา โดยเตรียม tea polymerized polyphenol จาก polyphenol ที่สกัดได้จากชาด้วยวิธี templated polymerization พบว่าสารที่ได้ให้ฤทธิ์การต้านมะเร็งดีกว่า EGCG อย่างไรก็ตาม ยังติดปัญหาการนำสารที่ได้ไปใช้งานเนื่องจากพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ได้ส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นยางเหนียวไม่ละลายน้ำ

1.3.6 lysine

ไลซีน คือ กรดอะมิโนที่ร่างกายไม่สามารถสังเคราะห์เองได้ (essential amino acid) โครงสร้างประกอบด้วย หมู่อะมิโน 2 หมู่และ หมู่คาร์บอกซิล 1 หมู่ จึงทำให้ไลซีนมีประจุบวกที่ pH 7.5 และละลายน้ำได้ดี



รูปที่ 1.4 โครงสร้าง Lysine ที่ pH 7.5

ในปี ค.ศ. 2006 Kato²¹ และคณะ ได้เพิ่มความสามารถในการละลายของ BPTI-22 ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีความสามารถในการละลายน้ำต่ำ ด้วยการติด poly-lysine และ poly-arginine พบว่าสามารถเพิ่มความสามารถในการละลายได้

ในปี ค.ศ. 2011 ElShaer²² และคณะ ปรับปรุงความสามารถในการละลายน้ำของ Indomethacin ซึ่งเป็นยาที่มีคุณสมบัติการละลายน้ำต่ำ (20 µg/mL) ด้วยวิธี salt formation โดยใช้ L-arginine, L-lysine และ L-histidine ผลการทดลองพบว่าผลิตภัณฑ์ที่เกิดจาก L-arginine และ L-lysine สามารถเพิ่มการละลายให้แก่ Indomethacin ได้

บทที่ 2

การทดลอง

2.1 สารเคมี และอุปกรณ์

1. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) (Chemieiliva Pharmaceutical and Company, Choqing, China)
2. Horseradish peroxidase (HRP) (Chemieiliva Pharmaceutical and Company, Choqing, China)
3. Polyethylene glycol (PEG, MW 35,000) (Merck, Darmstadt, Germany)
4. Hydrogen peroxide (H₂O₂) (Merck, Darmstadt, Germany)
5. 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDCI) (Acros Organics, Geel, Belgium)
6. N-hydroxysuccinimide (NHS) (Acros Organics, Geel, Belgium)
7. Dimethyl Sulfoxide (DMSO) (RCI Labscan, Bangkok, Thailand)
8. Methanol (MeOH) (RCI Labscan, Bangkok, Thailand)
9. N^α,N^ε-Bis(tert-butoxycarbonyl)-L-lysine Dicyclohexylammonium Salt (TCI chemicals, Tokyo, Japan)

2.2 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องชั่งดิจิตอล รุ่น AB204-S (Mettler-Toledo, Switzerland)
2. เครื่อง Freeze-drying รุ่น 7753501 (Labconco Corporation, Kansas, MI, USA)
3. เครื่อง UV-Visible Spectrophotometer (OPTIZEN POP, Mecasys, Daejeon, Korea)
4. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดชนิดฟิวอิมิชชั่นและอุปกรณ์วิเคราะห์ธาตุ รุ่น 7610F (FESEM-EDS) (JSM-7610, JOEL, Tokyo, Japan)
5. เครื่อง Nuclear Magnetic Resonance รุ่น Varian Mercury+ 400 (NMR) (Varian Company, CA, USA)
6. เครื่อง FT-IR spectrometer รุ่น Nicolet 6700 (Thermo Electron Corporation, Madison, WI, USA)
7. Dialysis tubing cellulose membrane avg. flat width 76 mm (MWCO 12000-14000, Sigma-aldrich, USA)

2.3 การสังเคราะห์ polymerized EGCG

นำ EGCG (0.54g) HRP (10 mg) และ PEG (MW 35,000, 0.03 g) ผสมเข้าด้วยกันในขวดก้นกลม หลังจากนั้นค่อย ๆ ใส่ สารละลาย H_2O_2 ความเข้มข้น 30% 3.4 mL จากนั้นเติม phosphate buffer pH 7.4 12.5 mL และนำไป sonicate จนสารผสมเป็นเนื้อเดียวกัน จึงค่อย ๆ เติม 12.5 mL MeOH (ปริมาตรรวมทั้งหมด 25 mL) และนำไปคนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบ 48 ชั่วโมงจะได้สารละลายสีน้ำตาลอ่อน และยางเหนียวสีน้ำตาล หลังจากนั้นนำสารทั้งหมด มาโดอะไลซิส (Molecular weight cut-off = 12,000-14,000) เพื่อกำจัด MeOH โดยเปลี่ยนน้ำ DI วันละ 3 ครั้ง ครั้งละ 1,000 mL และคนตลอดเวลาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 สัปดาห์ จะได้สารที่มีลักษณะแตกต่างกัน 2 แบบ คือ สารที่กระจายตัวในน้ำได้ดี และสารที่มีลักษณะเป็นยางเหนียวติดบริเวณถุงโดอะไลซิส จากนั้นนำสารแต่ละส่วนไป freeze-dried เพื่อให้สารแห้ง โดยผลิตภัณฑ์สนใจนำมาใช้งาน คือ สารที่มีลักษณะเป็นยางเหนียว หรือ gum โดยสามารถคำนวณร้อยละผลได้ ของ ส่วนที่ละลายน้ำ และ gum ได้ดังนี้

$$\text{ร้อยละผลได้} = \frac{\text{น้ำหนักของ ส่วนที่ละลายน้ำ หรือ gum}}{\text{น้ำหนักของ EGCG}} \times 100$$

โดยสามารถยืนยันโครงสร้างของ gum ได้จากเทคนิค 1H -NMR (Deuterated dimethyl sulfoxide- d_6 (DMSO- d_6), รูปที่ 3.15 (e)) พบสัญญาณที่ δ (ppm) = 9.19 (m), 8.71 (m), 6.58 (d, $J = 164.90$ Hz), 5.80 (m), 5.80 (s), 5.85 (d, $J = 40.05$ Hz), 5.33 (m), 4.92 (s), 3.48 (s), 3.32 (s), 2.64 (m), 2.48 (s), 1.21 (s) และ 0.83 (m) และใช้เทคนิค FTIR เพื่อยืนยันหมู่ฟังก์ชันของ gum (รูปที่ 3.10 (c)) พบสัญญาณที่ 3293 cm^{-1} (O-H), 2880 cm^{-1} (C-H), 1691 cm^{-1} (C=O), 1606 cm^{-1} (C=C), 1535 cm^{-1} , 1513 cm^{-1} (C=C) และ 1445 cm^{-1} (C-H)

2.4 การสังเคราะห์ Boc-lysine-gum

ซึ่ง N^α , N^ϵ -Bis(tert-butoxycarbonyl)-L-lysine Dicyclohexylammonium Salt (BOC-lysine) (30 mg) ละลายใน Dimethylformamide (DMF) 0.5 mL และ 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDCI) (32.69 mg) ละลายใน DMF 0.5 mL โดยใช้ขวดสามคอเป็นภาชนะในการทำปฏิกิริยา โดยทำปฏิกิริยาใน ice bath และทำให้อยู่ในสภาวะบรรยากาศ N_2 โดย flow N_2 gas เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นผสมสารละลาย Boc-lysine และ EDCI เข้าด้วยกัน แล้วคนเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นชั่ง N-hydroxysuccinimide (NHS) (19.62 mg) ละลายใน DMF 0.5 mL และ gum (30 mg) ละลายใน DMF 0.5 mL จากนั้นใส่สารละลาย NHS และ gum ลงขวดสามคอตามลำดับ ตั้งปฏิกิริยาไว้ 8 ชั่วโมง นำสารทั้งหมดมาโดอะไลซิส (Molecular weight cut-off = 12,000-14,000) เพื่อกำจัด DMF โดยเปลี่ยนน้ำ DI วันละ 3 ครั้ง ครั้งละ 1,000 mL และคนตลอดเวลาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นนำสารดังกล่าวมา freeze-dried เพื่อทำสารให้แห้ง โดยสามารถคำนวณ ร้อยละผลได้ ของ Boc-lysine-gum ได้ดังนี้

$$\text{ร้อยละผลได้} = \frac{\text{น้ำหนักของ Boc-lysine-gum}}{\text{น้ำหนักของ gum}} \times 100$$

โดยสามารถยืนยันโครงสร้างของ Boc-lysine-gum ได้จากเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ (Deuterated dimethyl sulfoxide- d_6) (DMSO- d_6), รูปที่ 3.15 (g) พบสัญญาณที่ δ (ppm) = 8.74 (m), 6.73 (s), 6.43 (s), 5.35 (m), 3.44 (m), 3.26 (s), 3.16 (s), 3.10 (s), 2.81 (s), 2.43 (s), 2.01 (s) และ 1.30 (s) และใช้เทคนิค FTIR เพื่อยืนยันหมู่ฟังก์ชันของ Boc-lysine-Gum (รูปที่ 3.10 (e)) พบสัญญาณที่ 3267 cm^{-1} (O-H), 2922 cm^{-1} (C-H), 1702 cm^{-1} , 1681 cm^{-1} (C=O), 1604 cm^{-1} (C=C), 1531 cm^{-1} 1516 cm^{-1} (C=C) และ 1442 cm^{-1} (C-H)

2.5 การกำจัดหมู่ Boc บน Boc-lysine-gum

การกำจัดหมู่ Boc ทำได้โดย lysine-gum (200 mg) ลงในขวดกันกลม จากนั้นใส่ chloroform (0.7 mL) และ trifluoroacetic acid (0.7 mL) ตามลำดับ โดยทำปฏิกิริยาใน ice bath คนเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยทำสารละลายให้เป็นกลางด้วยสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 1 M (9 mL) จากนั้นเทสารผสมดังกล่าวลงใน diethyl ether ที่เย็นจัด และนำสารทั้งหมดมาไดอะไลซิส (Molecular weight cut-off = 12,000-14,000) เพื่อกำจัด chloroform และ diethyl ether โดยเปลี่ยนน้ำ DI วันละ 3 ครั้ง ครั้งละ 1,000 mL และคนตลอดเวลาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นนำสารดังกล่าวมา freeze-dried เพื่อทำสารให้แห้ง โดยสามารถคำนวณ ร้อยละผลได้ ของ lysine-gum ที่กำจัดหมู่ Boc แล้ว ได้ดังนี้

$$\% \text{Yield} = \frac{\text{น้ำหนักของ lysine-gum}}{\text{น้ำหนักของ Boc-lysine-gum}} \times 100$$

โดยสามารถยืนยันโครงสร้างของ lysine-gum ได้จากเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ (D_2O , รูปที่ 13.4 (f)) พบสัญญาณที่ δ (ppm) = 4.62 (s), 3.49 (s) และใช้เทคนิค FTIR เพื่อยืนยันหมู่ฟังก์ชันของ lysine-gum (รูปที่ 3.9 (f)) พบสัญญาณที่ 3258 cm^{-1} (O-H), 2922 cm^{-1} (C-H), 1708 cm^{-1} (C=O), 1599 cm^{-1} (C=C) และ 1442 cm^{-1} (C-H)

2.6 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของ lysine-gum

2.6.1 การวิเคราะห์ความสามารถในการดูดกลืนแสง ด้วยเทคนิค UV/Vis Spectrophotometer

เตรียมสารละลาย EGCG, gum, Boc-lysine, Boc-lysine-gum และ lysine-gum โดยใช้ DMSO เป็นตัวทำละลาย ที่ความเข้มข้น 39 ppm, 39 ppm, 39 ppm, 10,000 ppm, 39 ppm และ 39 ppm ตามลำดับ นำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UV/Vis Spectrophotometer

2.6.2 พิสูจน์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดชนิดฟิวอิมิชชั่น

นำสารตัวอย่าง (ได้แก่ gum, Boc-lysine-gum และ lysine-gum) มาละลายด้วยน้ำ และหยดสารละลายตัวอย่างดังกล่าวลงบนกระจกใส รอ 1-2 วัน จนสารละลายดังกล่าวแห้ง แล้วติดลงบน double-sided carbon adhesive tape แล้วแปะลงบน stub จากนั้นนำ stub ไปเคลือบผิวด้วยทอง ก่อนส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดชนิดฟิวอิมิชชั่น ที่กำลังขยาย 1,000X, 2,000X, 5,000X และ 10,000X

2.6.3 พิสูจน์ด้วยเทคนิค Nuclear Magnetic Resonance (NMR)

นำสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ (ได้แก่ EGCG, polymerized EGCG, gum, Boc-lysine-gum และ lysine-gum) มาละลายในตัวทำละลายโดย EGCG, Boc-lysine และ lysine-gum ตัวทำละลายคือ D₂O และ polymerized EGCG, gum และ Boc-lysine-gum ตัวทำละลายคือ DMSO-d₆ และตรวจสอบ ¹H-NMR spectra โดยใช้เครื่อง NMR spectrometer

2.6.4 พิสูจน์ด้วยเทคนิค Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR)

เตรียมสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ ได้แก่ EGCG, PEG, polymerized EGCG, gum, Boc-lysine-gum และ lysine-gum ใส่ไว้ใน desiccator อย่างน้อย 24 ชม. เพื่อกำจัดความชื้นออกจากสารตัวอย่าง จากนั้นตรวจสอบหมู่ฟังก์ชันของสารตัวอย่างโดยใช้เครื่อง Fourier Transform Infrared Spectroscopy

2.7 ตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT assay

การศึกษาศักยภาพต้านเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) โดยศึกษาสมบัติของอนุภาค EGCG, gum, Boc-lysine, Boc-lysine-gum และ lysine-gum โดยใช้วิธี MTT assay ในการตรวจวัดฤทธิ์ต้านมะเร็งของอนุภาคต่าง ๆ

2.7.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งตับ HepG2

เซลล์มะเร็งตับ (HepG2) จาก American Type Culture Collection ถูกเลี้ยงด้วยอาหาร RPMI-1640 กับ 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS) และ 1% antibiotic (penicillin และ streptomycin) ในบรรยากาศที่มี CO₂ 5% อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

2.7.2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT assay

เตรียมสารละลายตัวอย่างที่จะทดสอบ ได้แก่ EGCG, gum และ lysine-gum ความเข้มข้น 10,000 ppm โดยชั่ง 10 mg ในตัวทำละลาย H₂O สำหรับ EGCG และ lysine-gum ในตัวทำละลาย DMSO สำหรับ gum จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0.39 ppm, 1.56 ppm, 6.25 ppm, 25 ppm และ 100 ppm

นำเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) จำนวน 5×10^3 เซลล์ต่อมิลลิลิตร มาเลี้ยงใน 96-well culture plate ภายใต้บรรยากาศที่มี CO_2 5% อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นใส่สารละลายตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ 100 μL ต่อหลุม ทิ้งไว้เป็นเวลา 72 ชม. จากนั้นเทสารละลายตัวอย่างออก และใส่สารละลาย 0.5 mg/mL MTT และบ่มเป็นเวลา 4 ชม. เมื่อครบเวลาเทสารละลาย MTT ออก และเติม DMSO 100 μL ต่อหลุม จะได้สารละลายสีม่วง และวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 550 nm นำค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้มาคำนวณ % cell viability ดังสมการ

$$\% \text{Cell viability} = \frac{\text{O.D. of sample} - \text{O.D. of media}}{\text{O.D. of solvent} - \text{O.D. of media}} \times 100$$

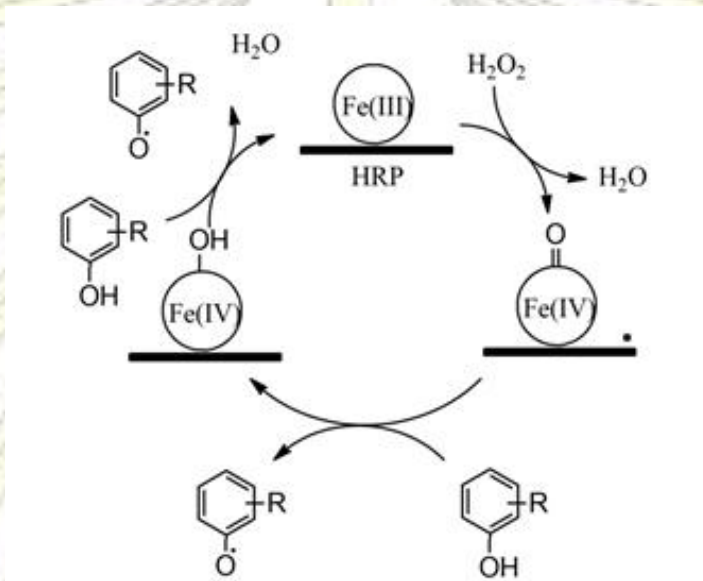


บทที่ 3

ผลการทดลอง และวิเคราะห์ผลการทดลอง

3.1 การสังเคราะห์ polymerized EGCG (gum)

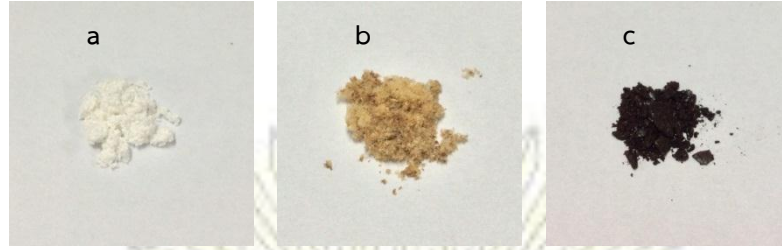
เมื่อผสม EGCG, HRP, PEG และ สารละลาย 30% H_2O_2 ในน้ำ เข้าด้วยกัน จะได้สารผสมสีขาวขุ่น จากนั้นเติม phosphate buffer pH 7.4 12.5 mL และ MeOH 12.5 mL จะได้สารผสมสีน้ำตาล ในขั้นนี้ จะเกิดปฏิกิริยา templated polymerization ของ EGCG โดยมี HRP เป็น ตัวเร่งปฏิกิริยา H_2O_2 เป็นตัวออกซิไดซ์ และ PEG เป็น template โดยมีกลไกการเกิดปฏิกิริยาดังแสดง



รูปที่ 3.1 กลไกการทำงานของเอนไซม์ Horseradish Peroxidase (HRP)²⁴

HRP และ Fe^{3+} จะถูกออกซิไดซ์ด้วย H_2O_2 ทำให้โมเลกุลของ HRP เกิดเป็น radical ได้เป็น $HRP(Fe^{4+})$ จากนั้น $HRP(Fe^{4+})$ จะจับ H^+ จาก EGCG ทำให้ EGCG กลายเป็น EGCG radical ซึ่งสามารถรับ e^- จาก EGCG ทำให้ได้ EGCG radical เพิ่มขึ้น และได้ $HRP(Fe^{3+})$ ดั้งเดิม EGCG radical จะเกิด polymerization ต่อกันไปเรื่อย ๆ โดยมี PEG เป็น template

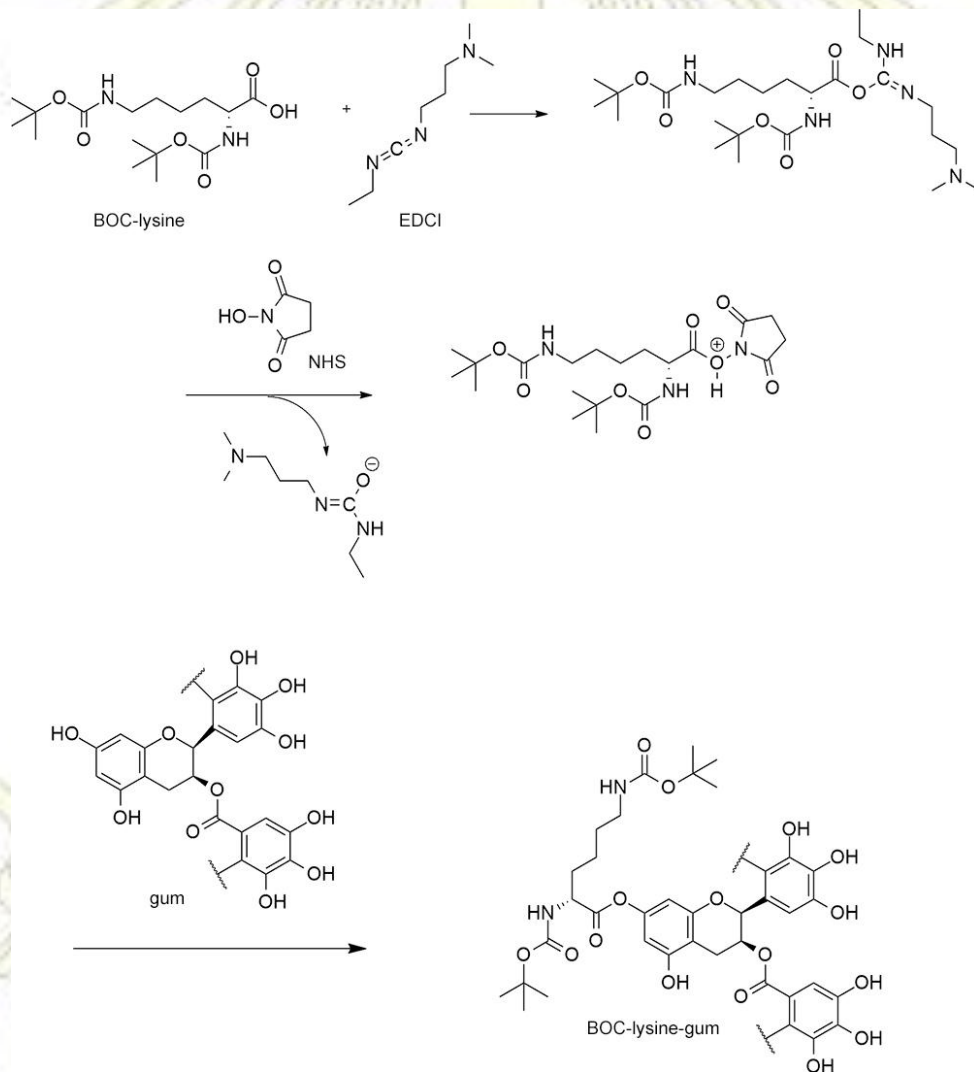
การทำปฏิกิริยาทำให้ได้ สารที่กระจายตัวได้ดีในน้ำ คือ polymerized EGCG จำนวนหนึ่ง และ สารที่มีลักษณะเป็นยางเหนียว หรือ gum โดยคาดว่า gum คือ polymerized EGCG ที่มีขนาดโมเลกุลที่ใหญ่ จนไม่สามารถกระจายตัวในน้ำได้ จึงตกตะกอนลงมาเป็นยางเหนียว ซึ่ง gum คือสิ่งที่สนใจในงานวิจัยนี้ เมื่อทำสารให้แห้งด้วยวิธี freeze-dry พบว่า gum มีลักษณะทางกายภาพเป็นสารสีน้ำตาลเข้ม เกาะเป็นกลุ่มก้อน



รูปที่ 3.2 (a) EGCG (b) Polymerized EGCG แบบละลายน้ำได้ และ (c) gum

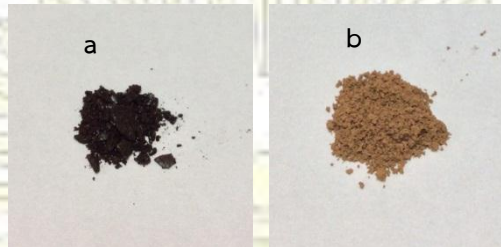
3.2 การสังเคราะห์ Boc-lysine-gum

การสังเคราะห์ Boc-lysine-gum ผ่านปฏิกิริยา carbodiimine coupling ขั้นแรกผสมสารละลาย Boc-lysine และ EDCI เข้าด้วยกัน ได้สารผสมสีขาวขุ่น จากนั้นใส่ NHS และ gum ตามลำดับ สารผสมเปลี่ยนจากสีขาวขุ่นเป็นสีน้ำตาลเข้ม จะเกิดปฏิกิริยาระหว่าง Boc-lysine, EDCI, NHS และ gum ดังแสดง



รูปที่ 3.3 แผนภาพการสังเคราะห์ Boc-lysine-gum

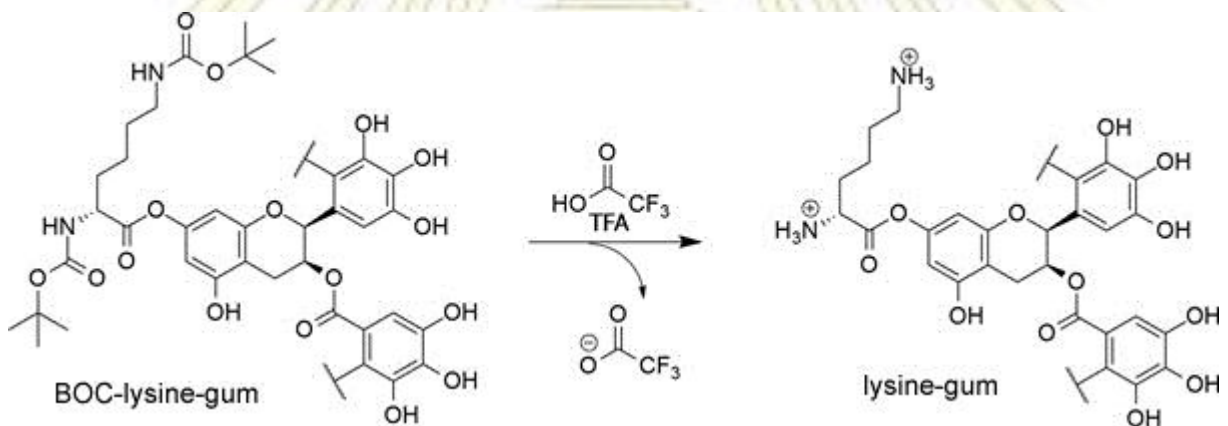
จากขั้นตอนการทำปฏิกิริยาทำให้ได้ Boc-lysine ที่กราฟต์ลงบน gum โดยเชื่อมกันด้วยพันธะ ester bond ทำให้สารแห้งด้วยวิธี freeze-dry พบว่าได้สารมีลักษณะทางกายภาพเป็นสารสีน้ำตาล มีลักษณะเป็นผงละเอียด ร่วนซุย



รูปที่ 3.4 (a) gum และ (b) Boc-lysine-gum

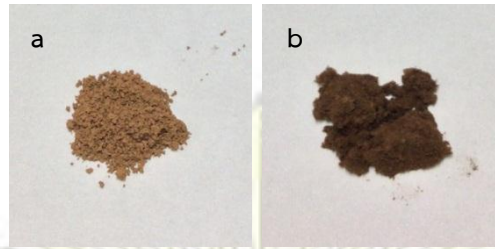
3.3 การกำจัดหมู่ Boc บน Boc-lysine-gum

การกำจัดหมู่ Boc บน Boc-lysine-gum ด้วย trifluoroacetic acid โดยผสม Boc-lysine-gum, chloroform และ trifluoroacetic acid ตามลำดับ ทำปฏิกิริยาใน ice bath จะได้สารผสมสีน้ำตาลเข้ม



รูปที่ 3.5 แผนภาพการกำจัดหมู่ Boc ของ Boc-lysine-gum

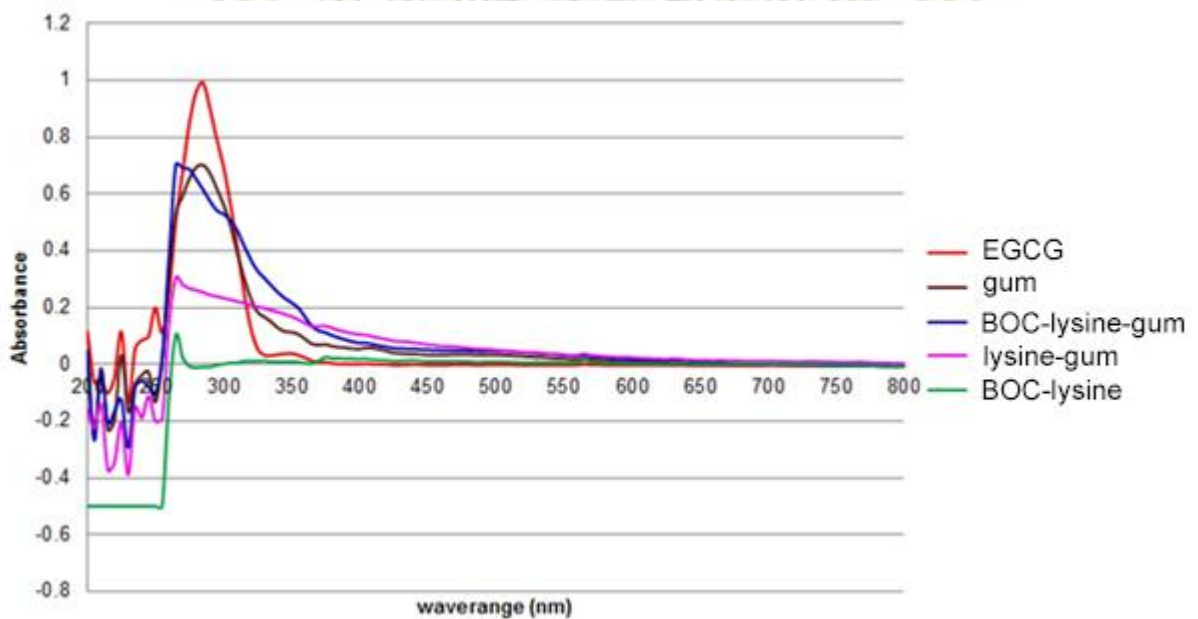
หยุดปฏิกิริยาเพื่อให้ปฏิกิริยาเป็นกลางด้วย NaOH จากนั้นเมื่อเทสารผสมลงใน diethyl ether ที่เย็นจัด สารผสมจะแยกชั้นโดยชั้นของ gum ที่มีสีน้ำตาลจะอยู่ชั้นล่าง ส่วนชั้น diethyl ether สีไม่มีสีจะอยู่ชั้นบน นำสารผสมทั้งหมดไปไดอะไลซิสและทำแห้งด้วยการ freeze-dry พบว่า lysine-gum ที่ได้มีสีน้ำตาลเข้ม น้ำหนักเบา ฟุ้งง่าย



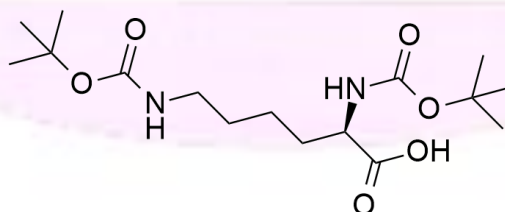
รูปที่ 3.6 (a) Boc-lysine-gum และ (b) lysine-gum

3.4 การวิเคราะห์สารด้วยเทคนิค UV-vis spectrometry

นำสารละลาย EGCG, gum, Boc-lysine, Boc-lysine-gum และ lysine-gum มาวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสง พบว่า EGCG ให้ค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสง (ϵ) ที่ความยาวคลื่น 285 นาโนเมตร เท่ากับ $11,587 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ในขณะที่ Boc-lysine ให้ค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสง (ϵ) ที่ความยาวคลื่น 265 นาโนเมตร เท่ากับ $5.49 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ซึ่งมีค่าค่อนข้างต่ำ จากโครงสร้างของ Boc-lysine พบว่า Boc-lysine ไม่มีหมู่ chromophore ที่ดูดกลืนคลื่นแสงในช่วงคลื่น 260 ถึง 365 นาโนเมตร เหมือน EGCG



รูปที่ 3.7 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของ EGCG, gum, Boc-lysine, Boc-lysine-gum และ lysine-gum



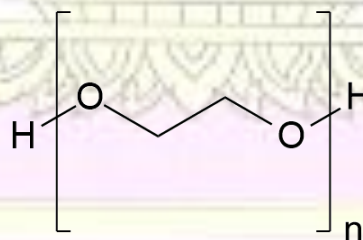
รูปที่ 3.8 โครงสร้าง Boc-lysine

EGCG ให้ค่าการดูดกลืนแสงระหว่างช่วง 260 ถึง 365 นาโนเมตร โดยมีค่าการดูดกลืนที่ความยาวคลื่นสูงสุดเท่ากับ 285 นาโนเมตร จากโครงสร้างของ EGCG พบว่ามี conjugation เป็นจำนวนมาก ทำให้ระดับพลังงานระหว่างชั้น HOMO และ LUMO แคบลง ค่าความยาวคลื่นจึงเลื่อนไปทางขวามากขึ้น และ transition ที่น่าจะพบตั้งแต่ 250 nm เป็นต้นไปเป็นของ $n \rightarrow \pi^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$ และ $n \rightarrow \sigma^*$ ต่อมาเมื่อวิเคราะห์การดูดกลืนแสงของ gum พบว่า ให้ค่าการดูดกลืนแสงระหว่างช่วง 250 ถึง 610 นาโนเมตร มีค่าการดูดกลืนที่ความยาวคลื่นสูงสุด 285 นาโนเมตร เช่นกัน และมีลักษณะกราฟที่คล้ายกับสารตั้งต้น (EGCG) จึงน่าจะยังมีหมู่ฟังก์ชันที่เหมือนกับ EGCG แต่กราฟกว้างมากขึ้น คาดว่าเกิดจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีของ EGCG ผ่านกระบวนการ polymerization น่าจะทำให้มีบางส่วนที่มี conjugation มากขึ้นโดยสังเกตได้จากกราฟที่กว้างมากขึ้น

Boc-lysine มีค่าการดูดกลืนที่ความยาวคลื่นสูงสุดเท่ากับ 265 นาโนเมตร และมีค่าสัญญาณต่ำ เนื่องจากมีค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสง (ϵ) น้อยมาก ต่อมาเมื่อวิเคราะห์การดูดกลืนแสงของ Boc-lysine-gum ให้ค่าการดูดกลืนแสงระหว่างช่วง 260 ถึง 610 นาโนเมตร โดยมีค่าการดูดกลืนที่ความยาวคลื่นสูงสุด 265 นาโนเมตร เช่นเดียวกับ Boc-lysine และกราฟมีช่วงการดูดกลืนที่กว้างเช่นเดียวกับ gum โดยกราฟจะเลื่อนไปทางขวา คาดว่าอาจเกิดปฏิกิริยาทางเคมีระหว่าง Boc-lysine และ gum ต่อมาเมื่อวิเคราะห์การดูดกลืนแสงของ lysine-gum พบว่ามีค่าการดูดกลืนที่ความยาวคลื่น สูงสุด 265 นาโนเมตร และมีช่วงการดูดกลืนที่กว้างเช่นเดียวกัน แสดงให้เห็นว่ายังคงมีไลซีนอยู่ในโครงสร้างหลังการกำจัดหมู่ Boc แล้ว

3.5 การพิสูจน์เอกลักษณ์สารโดยใช้เทคนิค FT-IR

พิจารณา IR สเปกตรัมใน รูปที่ 3.11 (a) ของ EGCG พบว่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นที่ 3480, 3351 cm^{-1} ซึ่งเป็นพีคของ O-H stretching ที่ติดกับวงอะโรมาติก และ พีคที่ 1691 cm^{-1} เป็นพีคของ C=O stretching ที่ต่อกับ trihydroxybenzoate ring และ chroman ring พีคที่ 1614 cm^{-1} เป็นพีคของ C=C stretching ต่อมา พีคที่ 1543, 1524 cm^{-1} เป็นพีคของ C=C stretching ในวงอะโรมาติก และ พีคที่ 1442 cm^{-1} เป็นพีคของ C-H stretching ใน chroman ring นอกจากนี้ยังพบพีคที่ 1344, 1222 cm^{-1} ซึ่งเป็นพีคของ O-C=O stretching



รูปที่ 3.9 โครงสร้าง PEG

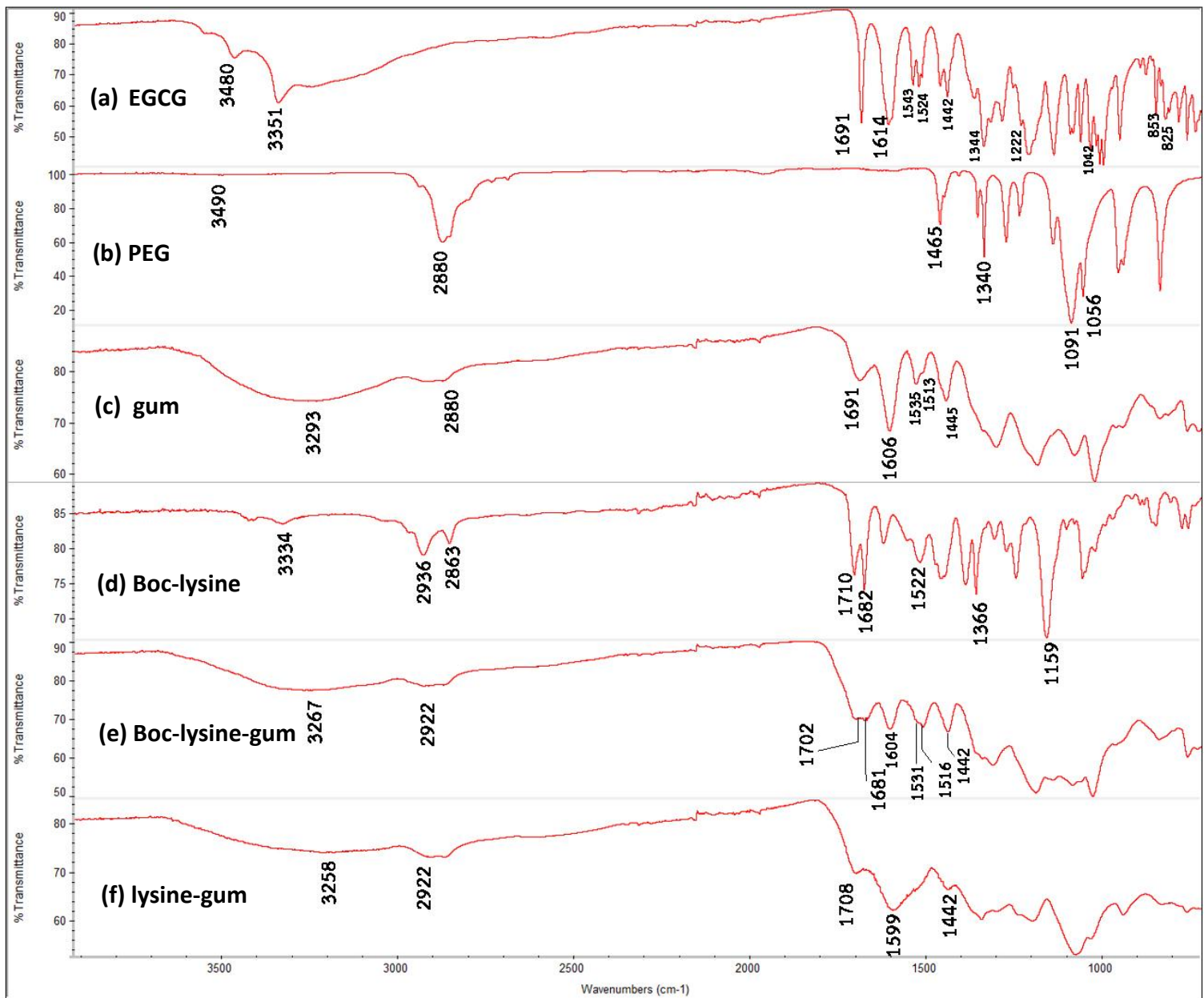
พิจารณา IR สเปกตรัมใน รูปที่ 3.11 (b) ของ PEG พบว่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นที่ 3490 cm^{-1} ซึ่งเป็นพีคของ O-H stretching ต่อมาพีคที่ 2880 cm^{-1} เป็นพีคของ C-H stretching และ พีคที่ 1465, 1340 cm^{-1} เป็นพีคของ C-H bending

พิจารณา IR สเปกตรัมใน รูปที่ 3.11 (c) ของ gum พบว่ามีการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นที่ 3293 cm^{-1} ซึ่งเป็นพีคของ O-H stretching และพีคที่ 2880 cm^{-1} เป็นพีคของ C-H stretching และ พีคที่ 1691 cm^{-1} เป็นพีคของ C=O stretching ต่อมา พีคที่ 1606 cm^{-1} คือพีคของ C=C stretching และพีคที่ $1535, 1513\text{ cm}^{-1}$ เป็นพีคของ C=C stretching ในวงอะโรมาติก นอกจากนี้ยังพบพีคที่ 1445 cm^{-1} เป็นพีคของ C-H stretching ใน chroman ring จะเห็นได้ว่า gum พบพีคสัญญาณจากหมู่ฟังก์ชันทั้ง EGCG และ PEG

พิจารณา IR สเปกตรัมใน รูปที่ 3.11 (d) ของ Boc-lysine พบว่ามีการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นที่ $3450\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$ แสดงถึง OH stretching และพบพีคที่ 3334 cm^{-1} คือพีคของ N-H stretching และพีคที่ $2936, 2863\text{ cm}^{-1}$ คือพีคของ C-H stretching นอกจากนี้ยังพบพีคที่ $1710, 1682\text{ cm}^{-1}$ คือพีคของ C=O stretching ของหมู่ carboxylic acid ใน lysine และ ester ในหมู่ Boc ตามลำดับ และพบพีคที่ 1552 cm^{-1} คือพีคของ N-H bending และพีคที่ 1366 cm^{-1} คือ พีคของ CH_3 bending และพีคที่ 1159 cm^{-1} คือพีคของ C-N stretching

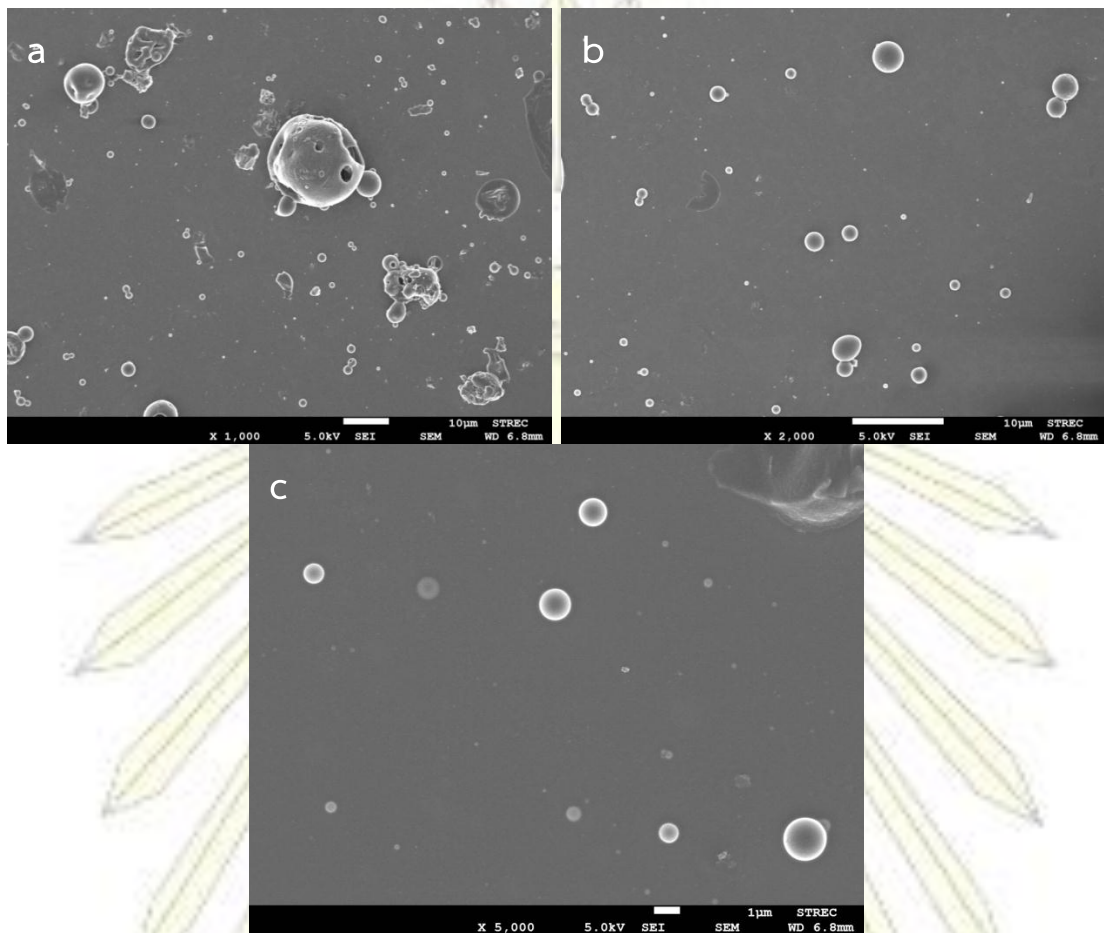
พิจารณา IR สเปกตรัมใน รูปที่ 3.11 (e) ของ Boc-lysine-gum พบว่ามีการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นที่ $1702, 1681\text{ cm}^{-1}$ เป็นพีคของ C=O stretching ของ Ester ใน gum และ หมู่ Boc จาก lysine ตามลำดับ ยืนยันได้ว่า Boc-lysine ถูกกราฟต์ลงบน gum

พิจารณา IR สเปกตรัมใน รูปที่ 3.11 (f) ของ lysine-gum พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นที่ 1708 cm^{-1} เป็นพีคของ C=O stretching ของ ester ใน gum จะเห็นได้ว่าพีคสัญญาณของ C=O stretching บริเวณประมาณ 1681 cm^{-1} จากหมู่ Boc หายไปแสดงให้เห็นว่าสามารถกำจัดหมู่ Boc ได้สำเร็จ



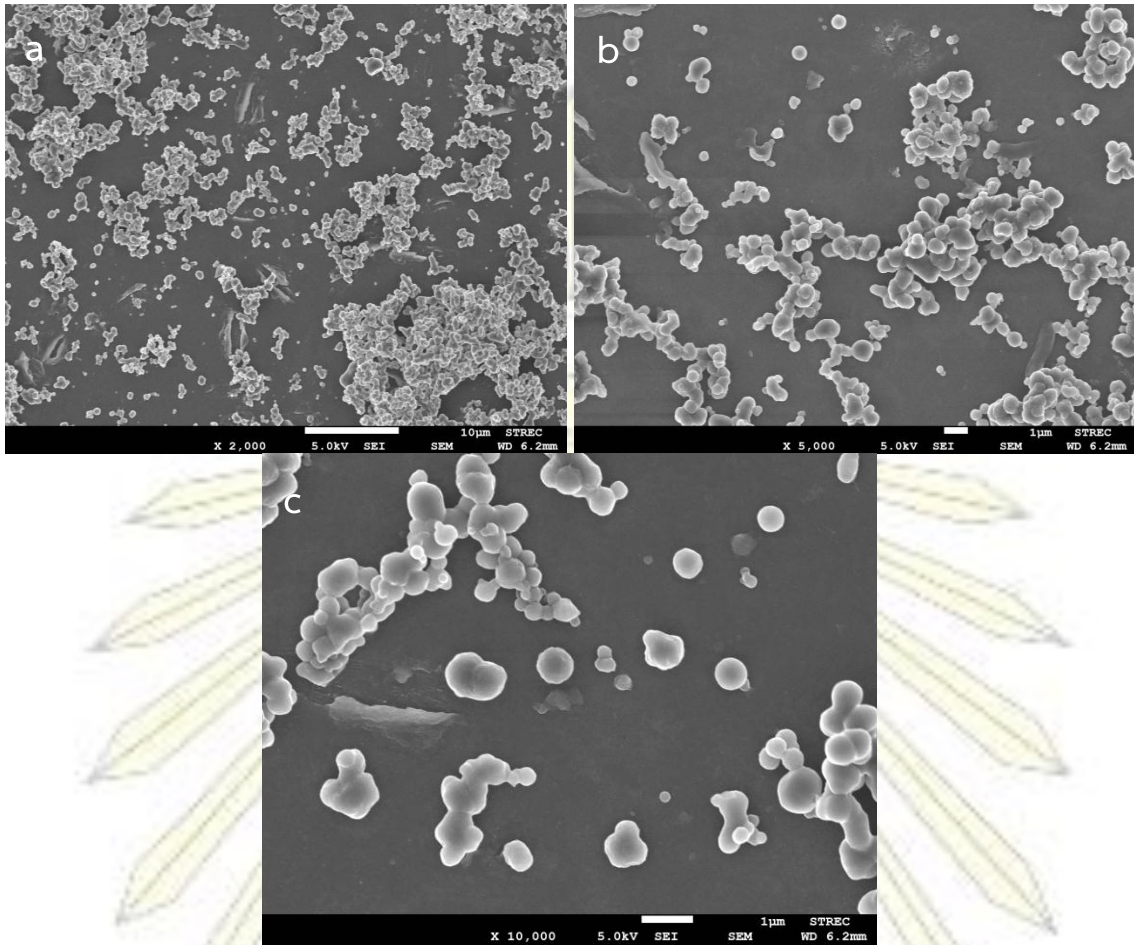
รูปที่ 3.10 FT-IR สเปกตร้าของ (a) EGCG, (b) PEG, (c) gum, (d) Boc-lysine, (e) Boc-lysine-gum และ (f) lysine-gum

3.6 การศึกษาลักษณะรูปร่างของอนุภาคต่าง ๆ ด้วยเครื่อง field emission scanning electron microscope (FESEM)



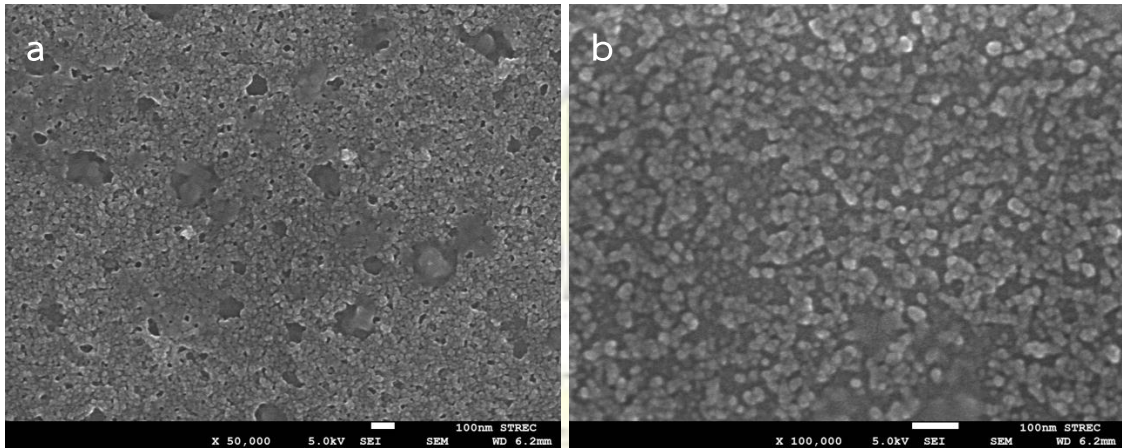
รูปที่ 3.11 ภาพ FESEM ของอนุภาค gum ที่ใช้กำลังขยาย (a) 1000X, (b) 2000X และ (c) 5000X

เมื่อวิเคราะห์ลักษณะของอนุภาค gum พบว่า มีขนาดที่หลากหลายตั้งแต่ประมาณ 1 - 20 ไมโครเมตร อาจเกิดจากการ polymerized EGCG ที่มีขนาดโมเลกุลไม่เท่ากัน เป็นไปได้ว่าการเกิด polymerization ไม่มากจะทำให้ได้อนุภาคที่มีขนาดเล็ก และสามารถกระจายตัวในน้ำได้ดี การเกิด polymerization มากจะทำให้ได้อนุภาคขนาดใหญ่ ดังนั้นเราจึงเห็นอนุภาคขนาดต่าง ๆ ปะปนกันไป อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลทำไม่ได้ เนื่องจากติดปัญหาการละลายของอนุภาคในตัวทำละลายที่สามารถวิเคราะห์ได้ด้วยเครื่อง gel filtration chromatography



รูปที่ 3.12 ภาพ FESEM ของอนุภาค Boc-lysine-gum ที่ใช้กำลังขยาย (a) 2000X, (b) 5000X และ (c) 10000X

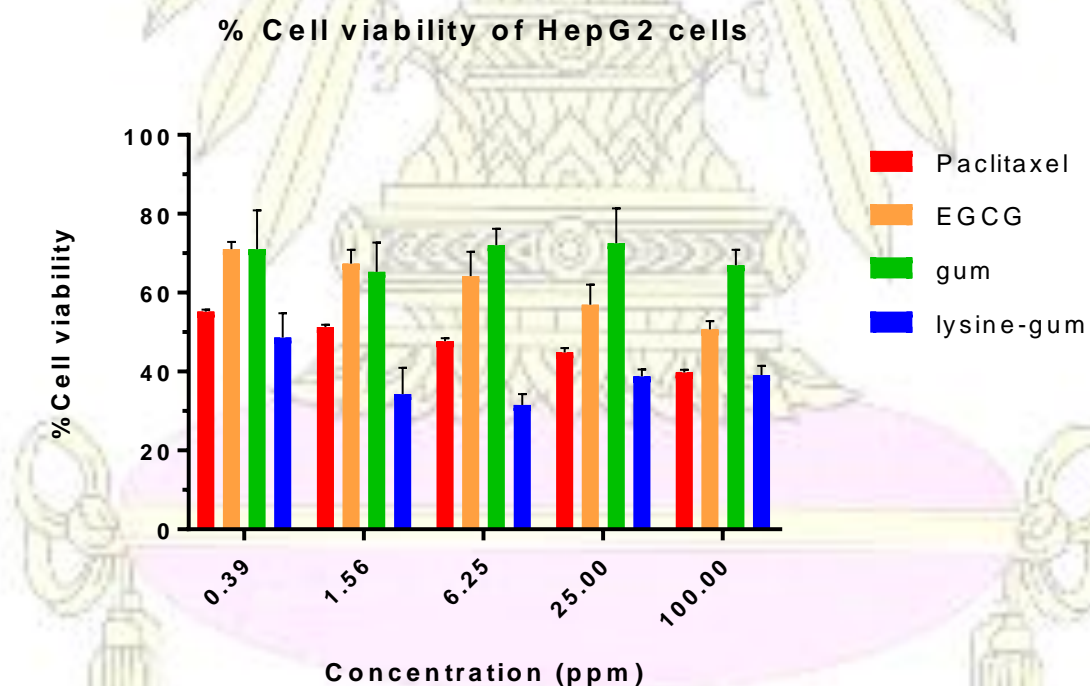
เมื่อวิเคราะห์ลักษณะของอนุภาค Boc-lysine-gum พบว่า อนุภาครวมกลุ่มกันบางส่วน และมีขนาดประมาณ 0.7 ± 0.11 ไมโครเมตร จากการกราฟต์ Boc-lysine ลงบน gum พบว่าอนุภาคขนาดเล็กลง แม้ว่าอนุภาคจะมีขนาดเล็กลง แต่การกระจายตัวในน้ำยังไม่ดีเท่าที่ควร คาดว่ามาจากหมู่ Boc ที่มีความ hydrophobic คงอยู่



รูปที่ 3.13 ภาพ FESEM ของอนุภาค lysine-gum ที่ใช้กำลังขยาย (a) 50000X และ (b) 100000X

เมื่อวิเคราะห์ลักษณะของอนุภาคพบว่า อนุภาคมีขนาดประมาณ 23 ± 7.34 นาโนเมตร จะเห็นได้ว่าอนุภาคมีขนาดเล็กมากเมื่อเทียบกับอนุภาค Boc-lysine-gum เนื่องจากอนุภาค lysine-gum ได้กำจัดหมู่ Boc ออก ทำให้อนุภาคมีประจุบวกจากหมู่ฟังก์ชันของไลซีน อนุภาคแต่ละอนุภาคที่มีประจุเหมือนกันจึงผลักกัน ทำให้มี surface area เพิ่มขึ้น และ self assembly เป็นอนุภาคขนาดเล็ก จึงทำให้อนุภาคกระจายตัวในน้ำได้ดีขึ้น

3.7 การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งด้วยวิธี MTT assay



รูปที่ 3.14 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นต่าง ๆ ของอนุภาค Paclitaxel, EGCG, gum และ lysine-gum และเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์มะเร็งตับ HepG2

การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งด้วยวิธี MTT assay โดยศึกษาในอนุภาค Paclitaxel, EGCG, gum และ lysine-gum ที่ความเข้มข้น 0.39, 1.56, 6.25, 25.00 และ 100.00 ppm โดยจากงานวิจัยของ Pukfukdee⁷ และคณะ พบว่า polymerized EGCG มีฤทธิ์ต้านมะเร็งดีกว่า EGCG แต่ในการทดลองนี้พบว่า gum ซึ่งเป็น polymerized EGCG ขนาดใหญ่ มีฤทธิ์ต้านมะเร็งต่ำกว่า EGCG เนื่องจาก gum ไม่สามารถกระจายตัวในน้ำได้ และพบว่า lysine-gum มีฤทธิ์ต้านมะเร็งดีกว่า EGCG เนื่องจากการกราฟต์ lysine ลงบน gum จะช่วยให้อนุภาคกระจายตัวในน้ำได้ดีขึ้น จึงทำให้มีฤทธิ์ต้านมะเร็งมากขึ้นนั่นเอง

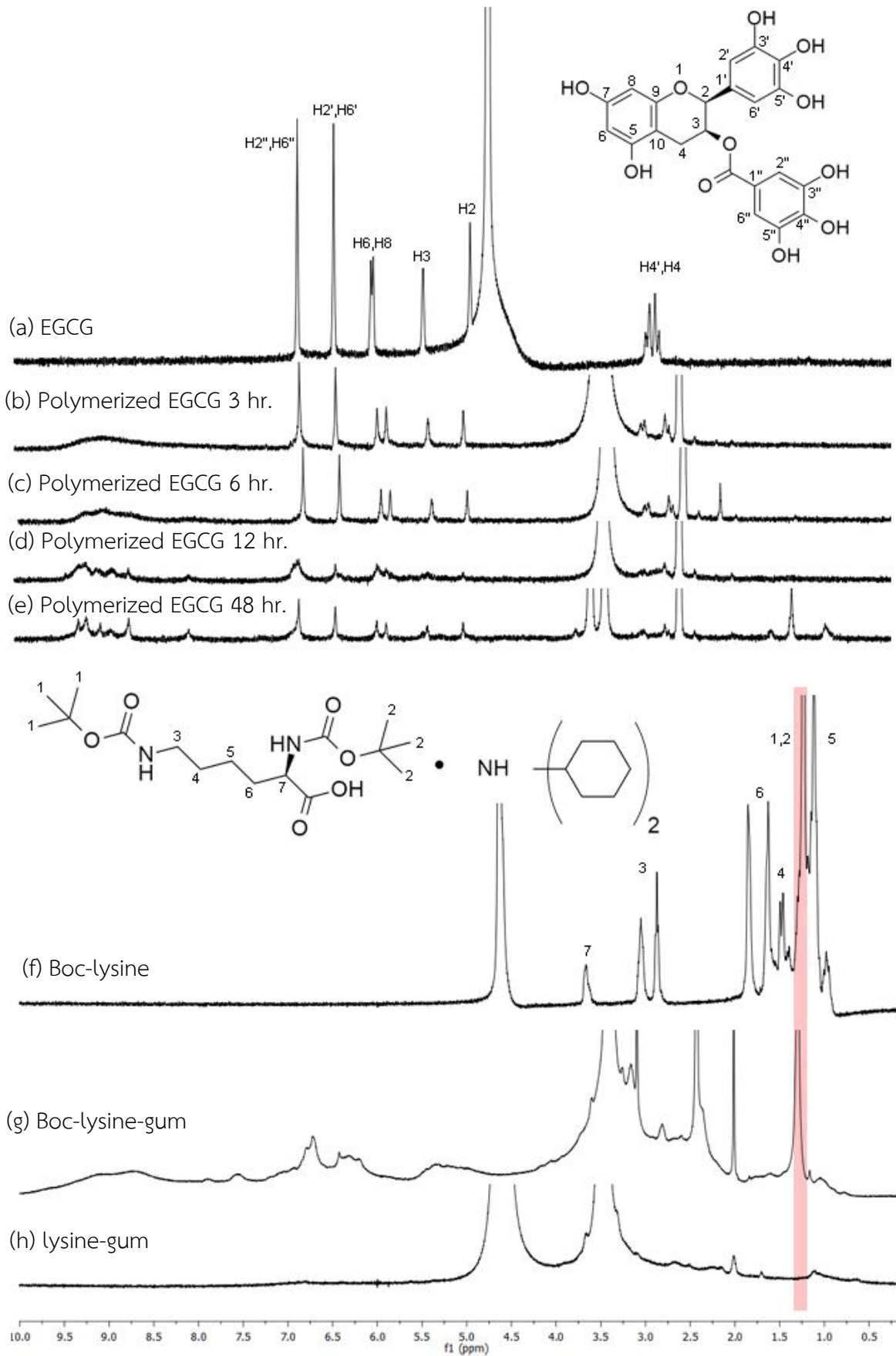
3.8 การพิสูจน์ทราบเอกลักษณ์สารโดยใช้เทคนิค $^1\text{H-NMR}$

$^1\text{H-NMR}$ ของ EGCG ดังรูปที่ 13.4 (a) ใช้ตัวทำละลายเป็น D_2O ได้ผล $^1\text{H-NMR}$ spectra ดังนี้ พีคที่ δ (ppm) = 6.801 ($\text{H}_2', \text{H}_6''$), 6.387 (H_2', H_6'), 5.966-5.944 (H_6, H_8), 5.376 (H_3), 4.845 (H_2), 4.642 (D_2O), 2.861-2.705 (H_4', H_4) ต่อมาเมื่อนำ polymerized EGCG ที่ 3, 6, 12 และ 48 ชั่วโมง มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค NMR โดยใช้ตัวทำละลายเป็น DMSO เมื่อเปรียบเทียบพีคสัญญาณระหว่าง EGCG และ polymerized EGCG พบว่าให้ลักษณะของพีคที่คล้ายเดิม แต่จะมีลักษณะ broad ขึ้นเมื่อระยะเวลา polymerization มากขึ้น แสดงให้เห็นว่า polymerized EGCG ยังคงมีโครงสร้างในส่วนของ EGCG อยู่ นอกจากนี้ยังพบพีคสัญญาณที่ประมาณ 9.3-8.7 ppm โดยจากงานวิจัยก่อนหน้า Pukfukdee⁶ และคณะ พบว่า คือ หมู่ Phenol ที่เกิดขึ้นหลังจาก polymerization

$^1\text{H-NMR}$ ของ lysine ดังรูปที่ 13.4 (f) ใช้ตัวทำละลายเป็น D_2O ได้ผล $^1\text{H-NMR}$ spectra ดังนี้ พีคที่ δ (ppm) = 4.643 (D_2O), 3.660 (H_7), 3.051-2.873 (H_3), 1.853-1.628 (H_6), 1.495-1.458 (H_4), 1.236 (H_1, H_2) และ 1.112 (H_5)

$^1\text{H-NMR}$ ของ Boc-lysine-gum ดังรูปที่ 13.4 (g) พบพีคสัญญาณของหมู่ Boc จาก lysine ที่ δ (ppm) = 1.296 แสดงถึง lysine สามารถกราฟต์ลง gum ได้สำเร็จ และยังพบลักษณะของ polymerized EGCG ที่คล้ายเดิมแต่ broad มากขึ้น

$^1\text{H-NMR}$ ของ lysine-gum ดังรูปที่ 13.4 (h) พบว่าไม่ปรากฏพีคสัญญาณของหมู่ Boc จาก lysine แสดงให้เห็นว่าสามารถกำจัดหมู่ Boc จาก lysine ที่กราฟต์อยู่บน gum ได้



รูปที่ 3.15 $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของ (a) EGCG, (b) Polymerized EGCG 3 hr., (c) Polymerized EGCG 6 hr., (d) Polymerized EGCG 12 hr., (e) Polymerized EGCG 48 hr., (f) Boc-lysine, (g) Boc-lysine -gum และ (h) lysine-gum

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ได้สังเคราะห์อนุภาค gum จาก EGCG ผ่านปฏิกิริยา template polymerization โดยมีร้อยละผลได้ = 8 % พบว่าสามารถละลายได้ดีใน DMF และ DMSO แต่มีความสามารถในการกระจายตัวในน้ำต่ำ มีค่า $\epsilon_{285 \text{ nm}} = 285 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ และมีเส้นผ่าศูนย์กลางของอนุภาค 20 ไมโครเมตร จากนั้นจึงกราฟต์ Boc-lysine ลงบน gum ผ่านปฏิกิริยา carbodiimide coupling ผลิตภัณฑ์ที่ได้คือ Boc-lysine-gum มีร้อยละผลได้ = 99 % มีลักษณะเป็นอนุภาคทรงกลมขนาดเล็ก เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.7 ± 0.11 ไมโครเมตร จากนั้นนำมากำจัดหมู่ Boc ออกจาก Boc-lysine-gum ผลิตภัณฑ์ที่ได้คือ lysine-gum ให้ร้อยละผลได้ของปฏิกิริยา 71% มีค่า $\epsilon_{265 \text{ nm}} = 5.49 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ มีลักษณะเป็นอนุภาคทรงกลมขนาดเล็ก เส้นผ่าศูนย์กลาง 23 ± 7.34 นาโนเมตร การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (HepG2) พบว่าอนุภาค lysine-gum มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ดีกว่า gum



เอกสารอ้างอิง

1. S. Forester and J. Lambert. Cancer Preventive Effects of Green Tea Polyphenols. *Polyphenols in Human Health and Disease*. **2014**, 2:1309-1322.
2. H. Li, S. Yashiki, J. Sonoda, H. Lou, S. Ghosh, J. Byrnes, C. Lema, T. Fujiyoshi, M. Karasuyama and S. Sonoda. Green Tea Polyphenol Induce Apoptosis in vitro in Oeripheral Blood T Lymphocytes of Adult T-cell Leukemia Patients. *Japanese Journal of Cancer Research*. **2000**, 91:34-40.
3. B. Singh, S. Shankar, R. Srivastava. Green Tea Catechin, Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG): Mechanisms, Perspectives and Clinical Applications. *Biochemical Pharmacology*. **2011**, 82:1807-1821.
4. H. Jiang, T. Shij, Y. Matsuo, T. Tanaka, Z. Jiang and I. Kouno. A New Catechin Oxidation product and Polymeric Polyphenols of Post-fermented Tea. *Food chemistry*. **2011**, 129:830-836.
5. M. Pan, Y. Liang, S. Lin-Shiau, N. Zhu, C. Ho and J. Lin. Introduction of Apoptosis by the Oolong Tea Polyphenol Theasinensin A through Cytochrome c Release and Activation of Caspase-9 and Caspase-3 in Human U937 Cells. *American Chemical Society*. **2000**, 48:6337-6346.
6. Pan, Min-Hsiung, et al. "Molecular mechanisms of the anti-obesity effect of bioactive compounds in tea and coffee." *Food & function* **2016**, 7.11. 4481-4491.
7. P. Pukfukdee, P. Samutprasert, S. Wanichwecharungruang. Fabrication of particles from tea extract for anticancer activity. STT Proceeding of the 42th Congress on Science and Technology of Thailand. **2016**, Dec1-2; Bangkok, Thailand. P.217-22.
8. Jordan, M. A.; Wilson, L., Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nature Reviews Cancer*. **2004**, 4 (4), 253.
9. Eastman, A., Characterization of the adducts produced in DNA by cis-diamminedichloroplatinum (II) and cis-dichloro (ethylenediamine) platinum (II). *Biochemistry*. **1983**, 22 (16), 3927-3933.
10. Acevedo-Morantes, C. Y.; Acevedo-Morantes, M. T.; Suleiman-Rosado, D.; Ramírez-Vick, J. E., Evaluation of the cytotoxic effect of camptothecin solid lipid nanoparticles on MCF7 cells. *Drug delivery*. **2013**, 20 (8), 338-348.
10. Sueoka, N.; Suganuma, M.; Sueoka, E.; Okabe, S.; Matsuyama, S.; Imai, K.; Nakachi, K.; Fujiki, H., A New Function of Green Tea: Prevention of Lifestyle-related Diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **2001**, 928 (1), 274-280.
11. Tag Archive ชาเขียวญี่ปุ่น. <http://jyebook.com/tag/ชาเขียวญี่ปุ่น>
12. Davies, M. J.; Judd, J. T.; Baer, D. J.; Clevidence, B. A.; Paul, D. R.; Edwards, A. J.; Wiseman, S. A.; Muesing, R. A.; Chen, S. C., Black tea consumption reduces total and LDL cholesterol in mildly hypercholesterolemic adults. *The Journal of nutrition*. **2003**, 133 (10), 3298S-3302S.
13. Donà, M.; Dell'Aica, I.; Calabrese, F.; Benelli, R.; Morini, M.; Albini, A.; Garbisa, S., Neutrophil restraint by green tea: inhibition of inflammation, associated angiogenesis, and pulmonary fibrosis. *The Journal of Immunology*. **2003**, 170 (8), 4335-4341.

14. Roccaro, A. S.; Blanco, A. R.; Giuliano, F.; Rusciano, D.; Enea, V., Epigallocatechin-gallate enhances the activity of tetracycline in staphylococci by inhibiting its efflux from bacterial cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **2004**, 48 (6), 1968-1973.
15. Yuan, J.-M.; Koh, W.-P.; Sun, C.-L.; Lee, H.-P.; Yu, M. C., Green tea intake, ACE gene polymorphism and breast cancer risk among Chinese women in Singapore. *Carcinogenesis*. **2005**, 26 (8), 1389-1394.
16. Li, H. C.; Yashiki, S.; Sonoda, J.; Lou, H.; Ghosh, S. K.; Byrnes, J. J.; Lema, C.; Fujiyoshi, T.; Karasuyama, M.; Sonoda, S., Green Tea Polyphenols Induce Apoptosis in vitro in Peripheral Blood T Lymphocytes of Adult T-Cell Leukemia Patients. *Cancer Science*. **2000**, 91 (1), 34-40.
17. Wang, H.; Bian, S.; Yang, C. S., Green tea polyphenol EGCG suppresses lung cancer cell growth through upregulating miR-210 expression caused by stabilizing HIF-1 α . *Carcinogenesis*. **2011**, 32 (12), 1881-1889.
18. Du, G.-J.; Zhang, Z.; Wen, X.-D.; Yu, C.; Calway, T.; Yuan, C.-S.; Wang, C.-Z., Epigallocatechin Gallate (EGCG) is the most effective cancer chemopreventive polyphenol in green tea. *Nutrients*. **2012**, 4 (11), 1679-1691.
19. Kwak, T. W.; Park, S. B.; Kim, H.-J.; Jeong, Y.-I.; Kang, D. H., Anticancer activities of epigallocatechin-3-gallate against cholangiocarcinoma cells. *Oncotargets and therapy*. **2017**, 10, 137.
20. Pan, M.-H.; Liang, Y.-C.; Lin-Shiau, S.-Y.; Zhu, N.-Q.; Ho, C.-T.; Lin, J.-K., Induction of apoptosis by the oolong tea polyphenol theasinensin A through cytochrome c release and activation of caspase-9 and caspase-3 in human U937 cells. *Journal of agricultural and food chemistry*. **2000**, 48 (12), 6337-6346.
21. Kato, A.; Maki, K.; Ebina, T.; Kuwajima, K.; Soda, K.; Kuroda, Y., Mutational analysis of protein solubility enhancement using short peptide tags. *Biopolymers*. **2007**, 85 (1), 12-18.
22. Amr, E.; Sheraz, K.; Dhaya, P.; Peter, H.; Afzal, R. M., Use of Amino Acids as Counterions Improves the Solubility of the BCS II Model Drug, Indomethacin. *Current Drug Delivery*. **2011**, 8 (4), 363-372.
23. Maeda-Yamamoto, Mari, et al. "Effects of tea polyphenols on the invasion and matrix metalloproteinases activities of human fibrosarcoma HT1080 cells." *Journal of agricultural and food chemistry*. **1999**, 47.6. 2350-2354.
24. Oliver, Susan, et al. "Enhancing the therapeutic effects of polyphenols with macromolecules." *Polymer Chemistry* 7.8 (2016): 1529-1544.

ประวัติผู้วิจัย

นางสาวอิสราภรณ์ อิงสถิตชนวันต์ เกิดเมื่อวันที่ 15 เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2537 ที่จังหวัด กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนสตรีอ่างทอง จังหวัด อ่างทอง เมื่อปี การศึกษา 2556 เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2557 ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้ บ้านเลขที่ 20/9 ตำบล บ้านแห อำเภอมือง อ่างทอง จังหวัด อ่างทอง รหัสไปรษณีย์ 14000 อีเมล issraporn.eng@gmail.com

