ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	สัมฤทธิผลของสารคะเตชินจากสารสกัดชาเขียวในการทำลายอนุมูลอิสระและการจับธาตุเหล็กรูปที่ไม่ได้จับกับทรานสเฟอร์รินในซีรั่มผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมียชนิดบีตา
ผู้เขียน	นางสาวชลธิดา เทพหินลัพ
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	อ. ดร. สมเดช ศรีชัยรัตนกูล ประธานกรรมการ อ. ดร. อุดมภัณฑ์ ขาลสุวรรณ กรรมการ

บทคัดย่อ

ภาวะเหล็กเกินชนิดทุติยภูมิในผู้ป่วยธาลัสซีเมียชนิดบีตาเกิดขึ้นจากการดูดซึมธาตุเหล็กมากขึ้นกว่าปกติหรือได้รับการเติมเลือดหลายครั้ง ปริมาณธาตุเหล็กที่มากเกินสามารถเร่งการสร้างอนุมูลอิสระขึ้นมาจำนวนมากซึ่งนำไปสู่การทำลายสารชีวโมเลกุลต่างๆที่มีความสำคัญ ทำให้หน้าที่และความแข็งแรงของเซลล์ไม่เพียงพอ ปัจจุบันมีการใช้ยาดีเฟอโรซามีนและดีเฟอริโพรนเพื่อลดปริมาณธาตุเหล็กเกินและภาวะออกซิเดทีฟสเตรสภายในร่างกาย อย่างไรก็ตามยาทั้งสองชนิดนี้มีฤทธิ์ข้างเคียงหลายอย่าง Non-transferrin bound iron (NTBI) เป็นธาตุเหล็กทุกรูปในพลาสมาที่จับกับลิแกนอื่นๆนอกเหนือจากทรานส์เฟอริน โดยพบครั้งแรกในซีรัมของผู้ป่วยธาลัสซีเมียชนิดบีต้าเมเจอร์ซึ่งทรานส์เฟอรินมีความอิ่มตัวสูง ธาตุเหล็กรูปนี้สลายตัวได้ มีความเป็นพิษและสามารถทำลายสารชีวโมเลกุลและเยื่อหุ้มเซลล์ได้ ชามีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Camellia sinensis* ใบชามีสารคะเตชิน 6 ชนิดเป็นองค์ประกอบได้แก่ catechin (C), epicatechin (EC), epigallocatechin (EGC), epigallocatechin gallate (EGCG), epicatechin gallate (ECG) and gallocatechin gallate (GCG) โดยมี EGCG และ ECG เป็นองค์ประกอบหลักที่มีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและสามารถจับธาตุเหล็กได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การศึกษานี้มีเป้าหมายในการเปรียบเทียบปริมาณสารคะเตชินและประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและการจับธาตุเหล็กของชาเขียวที่ได้จากกรรมวิธีการผลิตต่างกัน สารสกัดหยาบของชาเขียวและสารคะเตชินจะถูกศึกษาฤทธิ์การดึงธาตุเหล็กในรูปที่ไม่ได้จับกับทรานสเฟอร์ริน (NTBI) จากซีรั่มผู้ป่วยธาลัสซีเมียในหลอดทดลอง ยอดใบชาสดถูกนำไปผ่านกรรมวิธีการตามท้องตลาดและผ่านความร้อนโดยเตาไมโครเวฟ หลังจากสกัดด้วยน้ำร้อน 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที สารสกัดหยาบชาเขียวถูกนำไปตรวจวัดปริมาณสารคะเตชินโดยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวประสิทธิภาพสูง สารคะเตชินถูกแยกด้วยเทคนิค semi-preparative HPLC ความสามารถในการจับกับธาตุเหล็กถูกศึกษาโดยใช้สเปคโตรโฟโตรเมตรี การตรวจวัดการดึงธาตุเหล็กในรูป NTBI ใช้วิธีโครมาโตกราฟีของเหลวประสิทธิภาพสูงและใช้เทคนิคโฟลไซโตรเมตรีในการตรวจวัดการต้านอนุมูลอิสระในเม็ดเลือดแดงที่ถูกกระตุ้นด้วยธาตุเหล็กในรูปต่างๆและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

สารสกัดชาเขียวที่เตรียมจากการอบด้วยไมโครเวฟมีปริมาณคะเตชินและความสามารถในการจับกับธาตุเหล็กได้ดีกว่าชาเขียวที่เตรียมจากกรรมวิธีตามท้องตลาด สารสกัดชาเขียวมีคุณสมบัติในการจับธาตุเหล็กในรูปเฟอร์ริกได้ดีกว่ารูปเฟอร์รัสโดยให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 560 และ 450 นาโนเมตรในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้นและเวลา การดึงธาตุเหล็กในรูป NTBI จากซีรั่มผู้ป่วยธาลัสซีเมียโดยสารสกัดหยาบและสารคะเตชินจะเป็นไปอย่างรวดเร็วในช่วงแรกและจะลดลงอย่างช้าๆในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้นและเวลาโดยสาร EGCG มีความสามารถในการจับและดึงธาตุเหล็กได้ดีที่สุดรองลงมาเป็นสาร ECG ทั้งนี้อาจเนื่องจากหมู่ galloyl ในโมเลกุล นอกจากนี้ยังพบว่าทั้งสารสกัดหยาบ, EGCG และ ECG สามารถลดอนุมูลอิสระในเม็ดเลือดแดงที่ถูกกระตุ้นด้วยสารละลายเหล็กได้ ทั้งนี้อาจเนื่องจากคุณสมบัติของการจับกับธาตุเหล็กซึ่งเป็นตัวเร่งในปฏิกริยาเฟนตอน

จากผลการทดลองสรุปได้ว่าการให้ความร้อนโดยไมโครเวฟเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการเตรียมผลิตภัณฑ์ชาเขียวแห้งที่มีปริมาณสารคะเตชินสูง มีคุณสมบัติการดึงธาตุเหล็กและการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดี ระหว่างสารคะเตชินที่ตรวจพบสาร EGCG มีความสามารถในการดึงธาตุเหล็กได้ดีที่สุดรองลงมาคือสาร ECG ทั้งนี้ควรมีการศึกษาทางคลินิกของสารต่างๆเหล่านี้ในสัตว์ทดลองต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title Efficacy of Catechins from Green-Tea Extract in Free-Radical Scavenging and Non-Transferrin-Bound Iron (NTBI) Chelation in β-Thalassemic Serum

Author Miss Chonthida Thephinlap

Degree Master of Science (Biochemistry)

Thesis Advisory Committee: Dr. Somdet Srichairatanakool Chairperson

Dr. Udompun Khansuwan Member

ABSTRACT

Secondary iron overload in β-thalassemia patients is commonly caused by an increased iron absorption or multiple blood transfusions. Excessive iron potentially catalyses free radical formation leading to the damage of important biomolecules and impairment in cellular function and integrity. Non-transferrin-bound iron (NTBI) is all forms of iron in the plasma that are bound to ligands other than transferrin. It is a non-specific chelatable and detectable in plasma of β-thalassemia patients when the large amounts of released iron exceed the transferrin iron binding capacity. This highly toxic, labile iron potentially causes oxidative damage to cell membranes and biomolecules. At present deferoxamine (DFO) and 1,2-dimethyl-3-hydroxypyrid-4-one (deferiprone) are available for the treatment of iron overload. DFO and DFP chelation can give negative iron balance and reduce oxidative stress; nevertheless, both of them exert several side effects. Tea (*Camellia sinensis*) contains six catechins compounds including catechin (C), epicatechin (EC), epigallocatechin (EGC), epigallocatechin gallate (EGCG), epicatechin gallate (ECG) and gallocatechin gallate (GCG). EGCG and ECG are the major active components and known to show strong antioxidant and iron binding activity.

The propose of this study was purposed to compare the efficiency between commercial and microwave process to produce the green tea (GT) with high catechin content, antioxidative

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

and iron binding properties. Crude extract and catechin fractions of GT were investigated, *in vitro*, for the chelation of NTBI in thalassemic serum (TS). Fresh tea shoots were processed with commercial and microwave methods. GT crude extract was prepared in hot water at 80°C for 15 minutes and quantified for catechins using the analytical HPLC. Catechin derivatives were separated from GT extract with the semi-preparative HPLC. Iron binding activity of crude extract and catechin fractions was examined by spectrophotometric method. NTBI chelation was investigated using the HPLC. Antioxidative property of catechin was assayed in ferrous-EDTA, ferric-nitrilotriacetate (Fe-NTA) and thalassemic serum treated normal human erythrocytes in the presence of 3% H_2O_2 using flow cytometry.

Microwave-processed GT had higher catechin content and iron-binding capacity than commercial GT. Both GT preparations had higher binding affinity for ferric ion than ferrous ion to form iron-catechin complex(s) exhibiting distinct absorption at 560 and 450 nm. Binding activity of GT extract with iron was dose- and time-dependent, with the order of ferric-nitrate> ferric-nitrilotriacetate>ferric citrate. NTBI chelation by crude extract, EGCG and ECG fractions was dose- and biphasic time-dependent. EGCG had the highest NTBI-chelating activity and ECG was the second highest, probably due to galloyl group in the molecule. Oxidative stress in iron-treated erythrocytes was reduced by crude extract, EGCG and ECG due to the limitation of iron in the Fenton reaction.

In conclusion, microwave method could be efficient for the preparation of green tea with high catechin content, iron-chelating and antioxidant activities. Removal of NTBI removal by green tea crude extract, EGCG and ECG was dose- and time-dependent. Among fractionated catechins, EGCG had the highest iron-chelating capacity and ECG is the second highest. Green tea crude extract, EGCG and ECG could effectively reduce erythrocyte oxidative stress. Clinical trials of such crude extract, EGCG and ECG need further investigation to evaluate how effective they are *in vivo*.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved