

<b>Thesis Title</b>	Iron-Chelating Property of Green Tea Extract in Iron-Overload Status	
<b>Author</b>	Miss Sakaewan Ounjaijean	
<b>Degree</b>	Master of Science (Biochemistry)	
<b>Thesis Advisory Committee:</b>	Dr. Somdet Srichairatanakool	Chairperson
	Dr. Udompun Khansuwan	Member

### ABSTRACT

Green tea contains many polyphenolic catechins exhibiting biochemical and pharmacological properties. Antioxidative and free-radical scavenging activities are widely applicable. These beneficial effects can protect human beings from many pathogeneses such as cancer, hypertension and aging. Iron overload can be caused by an increase of iron absorption and multiple blood transfusions. Non-transferrin bound iron (NTBI) is a potential toxic iron and detectable in many forms of iron overload such as primary hemochromatosis and  $\beta$ -thalassemia. Oxidative stress results from unbalanced formation of reactive oxygen species (ROS) that is mainly caused by iron catalyst in Haber-Weiss and Fenton reactions.

This study was aimed to select the efficient physical method to produce the green tea with high catechins content, antioxidative and iron-chelating capacity. Inhibitory effect of green tea on oxidative stress and iron overload status was also investigated in the rats receiving parenteral iron regularly. Fresh tea shoots were processed with baking, roasting, steaming and microwave heating. Green tea extract was prepared in hot water and quantified for polyphenolic catechins using the HPLC. Antioxidant capacity and chelating affinity of different green tea preparations

with ferrous and ferric ions was examined. Different treatments with microwave-processed green tea were studied for free radical scavenging *in vitro* in human erythrocytes and plasma co-incubated with several iron agents. Effect of different treatments with green tea on oxidative stress and iron status was also investigated in iron-loaded rats.

The results showed that microwave-processed green tea had the highest total catechins content, and iron-binding activity, while green tea from steaming had the highest antioxidative capacity. All green tea preparations, particularly microwave had higher binding affinity for ferric ion than ferrous ion to form iron-catechin complex(s) having distinct light absorption at 560 and 450 nm. Green tea catechins was rapidly and dose-dependent binding with iron, in with ferric nitrate was chelated more easily than Fe-NTA. Using flow cytometric and thiobarbituric acid-reactive substance (TBARS) assay, it was found that pre- and immediate-treatment with green tea extract inhibited oxidative stress more efficiently than others in the erythrocyte and sera co-incubated with Fe-NTA and TS. Interestingly, pre-treatment decreased oxidative stress in red blood cells and lipid peroxidation in plasma of iron-loaded rats most effectively compared to other green tea treatments. Following iron loading for 16 weeks, appearance of iron overload was slower in green tea-treated rats than in untreated rats. Pre-treatment with green tea still was the most effective for reduction of iron, transferrin saturation and NTBI in plasma of iron-loaded rats.

It can be concluded that the microwave method is the most efficient for manufacturing dry nutritious green tea with highest catechins content and iron-binding activity. Green tea has higher binding affinity for ferric ion than ferrous ion, which the iron-binding character is rapidly and dose-dependent. Pre-treatment with green tea is the most potential to decrease oxidative stress and iron overload both *in vitro* and *in vivo*.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	คุณสมบัติการจับธาตุเหล็กของสารสกัดชาเขียวใน สภาวะที่มีธาตุเหล็กเกิน	
ผู้เขียน	สะแกวัลย์ อุ่นใจจีน	
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)	
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ดร.สมเดช ศรีชัยรัตนกุล	ประธานกรรมการ กรรมการ
	ดร.อุดมกัญช์ ขาลสุวรรณ	กรรมการ
	บทคัดย่อ	

คุณสมบัติทางชีวเคมีและเภสัชวิทยาหลายอย่างของชาเขียวเกิดจากสารประกอบโพลีฟีนอล โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มแคเทชิน ซึ่งมีคุณสมบัติด้านการเกิดออกซิเดชันและจับธาตุเหล็กได้ดี ทำหน้าที่ในการจับอนุมูลอิสระและต่อต้านการเกิดพยาธิสภาพต่าง ๆ เช่น โรคมะเร็ง โรคความดันโลหิตสูง และโรคชรา ภาวะธาตุเหล็กเกิน เกิดจากการได้รับการถ่ายเลือดเป็นประจำและการดูดซึมธาตุเหล็กมากกว่าปกติ เช่นในคนไข้โรคฮีโมโครมาโตซิสและโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียชนิดบีต้า จะพบธาตุเหล็กในรูปที่ไม่ได้จับกับทรานสเฟอร์ริน ซึ่งเป็นธาตุเหล็กในรูปที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ โดยเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาฮาเบอร์ไวส์และเฟนต์อน ได้ผลผลิตเป็นสารอนุมูลอิสระชนิดที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ ซึ่งเป็นสาเหตุหลักของการเกิดภาวะออกซิเดชัน

การศึกษานี้มีเป้าหมายในการศึกษาวิธีที่เหมาะสมในการผลิตชาเขียวที่มีปริมาณสารแคเทชินสูง มีฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันและจับธาตุเหล็กได้ดี เพื่อใช้ในการเตรียมสารสกัดชาเขียวเพื่อศึกษาผลของชาเขียวต่อการต้านการเกิดออกซิเดชันและภาวะธาตุเหล็กเกินในหนูทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำโดยการให้ธาตุเหล็กเป็นประจำ ยอดชาสดจะถูกนำไปผ่านกระบวนการต่าง ๆ ได้แก่ การอบ การต้วนในกระหะร้อน การนึ่ง และการให้ความร้อนโดยเตาไมโครเวฟ หลังจากสกัดโดยใช้น้ำร้อน สารสกัดชาเขียวจะนำไปตรวจวัดปริมาณสารแคเทชินโดยเทคนิค

โครมาโตกราฟฟีของเหลวสมรรถนะสูง วิเคราะห์ความสามารถในการต้านการเกิดออกซิเดชัน และคุณสมบัติการจับธาตุเหล็กในรูปเฟอร์ริกและเฟอร์รัส จากการศึกษาพบว่าสารสกัดชาเขียวมีคุณสมบัติในการจับธาตุเหล็กในรูปเฟอร์ริกได้ดีกว่ารูปเฟอร์รัสและให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุดที่ความยาวคลื่น 560 และ 450 นาโนเมตร ได้อย่างรวดเร็วในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้น ชาเขียวที่เตรียมโดยวิธีการอบในเตาไมโครเวฟมีปริมาณสารเคเตชินโดยรวมสูงที่สุด มีความสามารถในการจับธาตุเหล็กเฟอร์ริกสูงที่สุด และมีคุณสมบัติด้านการเกิดออกซิเดชันสูง

สารสกัดชาเขียวที่เตรียมจากวิธีการอบด้วยไมโครเวฟ ได้นำไปศึกษาผลของการให้สารสกัดชาเขียวต่อการต้านการเกิดอนุมูลอิสระในเม็ดเลือดแดงและในพลาสมาที่เหนี่ยวนำด้วยการให้ธาตุเหล็กในรูปแบบต่าง ๆ นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาผลของการให้สารสกัดชาเขียวต่อการต้านภาวะออกซิเดชันและภาวะธาตุเหล็กเกินในหนูทดลองที่ได้รับธาตุเหล็ก

การวิเคราะห์ภาวะอนุมูลอิสระโดยวิธีโฟลโซโตรเมตรีและการวัดตัวบ่งชี้ของกระบวนการลิปิดเปอร์ออกซิเดชันพบว่า การให้สารสกัดชาเขียวก่อนและการให้ร่วมกับการให้ธาตุเหล็กมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดภาวะออกซิเดชันในเม็ดเลือดแดงและพลาสมาที่เหนี่ยวนำโดยเฟอร์ริก-เอนทีเอและพลาสมาจากผู้ป่วยธาลัสซีเมียได้ดี

การให้สารสกัดชาเขียว 1 เดือนก่อนการให้ธาตุเหล็กในหนูทดลอง สามารถลดการเกิดภาวะออกซิเดชันของเม็ดเลือดแดง และการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชันในพลาสมาได้ดีกว่าการให้สารสกัดชาเขียวแบบอื่น ๆ การได้รับสารสกัดชาเขียวยังมีผลต่อการชะลอการเกิดภาวะธาตุเหล็กเกินในหนูทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำโดยการให้ธาตุเหล็กได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับหนูทดลองที่ได้รับธาตุเหล็กแต่ไม่ได้รับสารสกัดชาเขียว โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดชาเขียว เป็นเวลา 1 เดือนก่อนเริ่มให้สารละลายเหล็ก พบว่ามีปริมาณเหล็กในพลาสมา ค่าความอึดตัวของ ทรานสเฟอร์ริน และ ปริมาณธาตุเหล็กในรูปแบบที่ไม่ได้จับกับทรานสเฟอร์รินต่ำกว่ากลุ่มอื่น ๆ

จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่าการให้ความร้อนโดยผ่านไมโครเวฟเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการเตรียมผลิตภัณฑ์ชาเขียวแห้งที่มีปริมาณสารเคเตชินและคุณสมบัติการจับธาตุเหล็กสูงที่สุด โดยสารสกัดชาเขียวมีคุณสมบัติในการจับธาตุเหล็กในรูปเฟอร์ริกได้ดีกว่าเฟอร์รัส ได้อย่างรวดเร็วในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้น การให้สารสกัดชาเขียวก่อนการเหนี่ยวนำด้วยธาตุเหล็กมีประสิทธิภาพในการลดเกิดภาวะออกซิเดชันและภาวะธาตุเหล็กเกินได้ดีทั้งในหลอดทดลองและในหนูทดลอง