

แบบรายงานสรุปผลการวิจัย
โครงการวิจัยทุนอุดหนุนจากมูลนิธิโครงการหลวง

ชื่อโครงการวิจัย

(ภาษาอังกฤษ) “Investigation of Iron- and Free Radical-Scavenging Capacities of Epigallocatechin gallate and Epicatechin gallate in Tea Leaves from Thailand Royal Project”

(ภาษาไทย) “การตรวจวัดความสามารถในการลดภาวะธาตุเหล็กและอนุมูลอิสระมากเกินไปโดยสาร Epigallocatechin gallate และ Epicatechin gallate ในใบชาของโครงการหลวง”

ทุนอุดหนุนวิจัย ปี 2547-2548 รหัสโครงการ 3030-3412 งบประมาณ 354,000 บาท

หัวหน้าโครงการวิจัย นายสมเดช ศรีชัยรัตนกุล

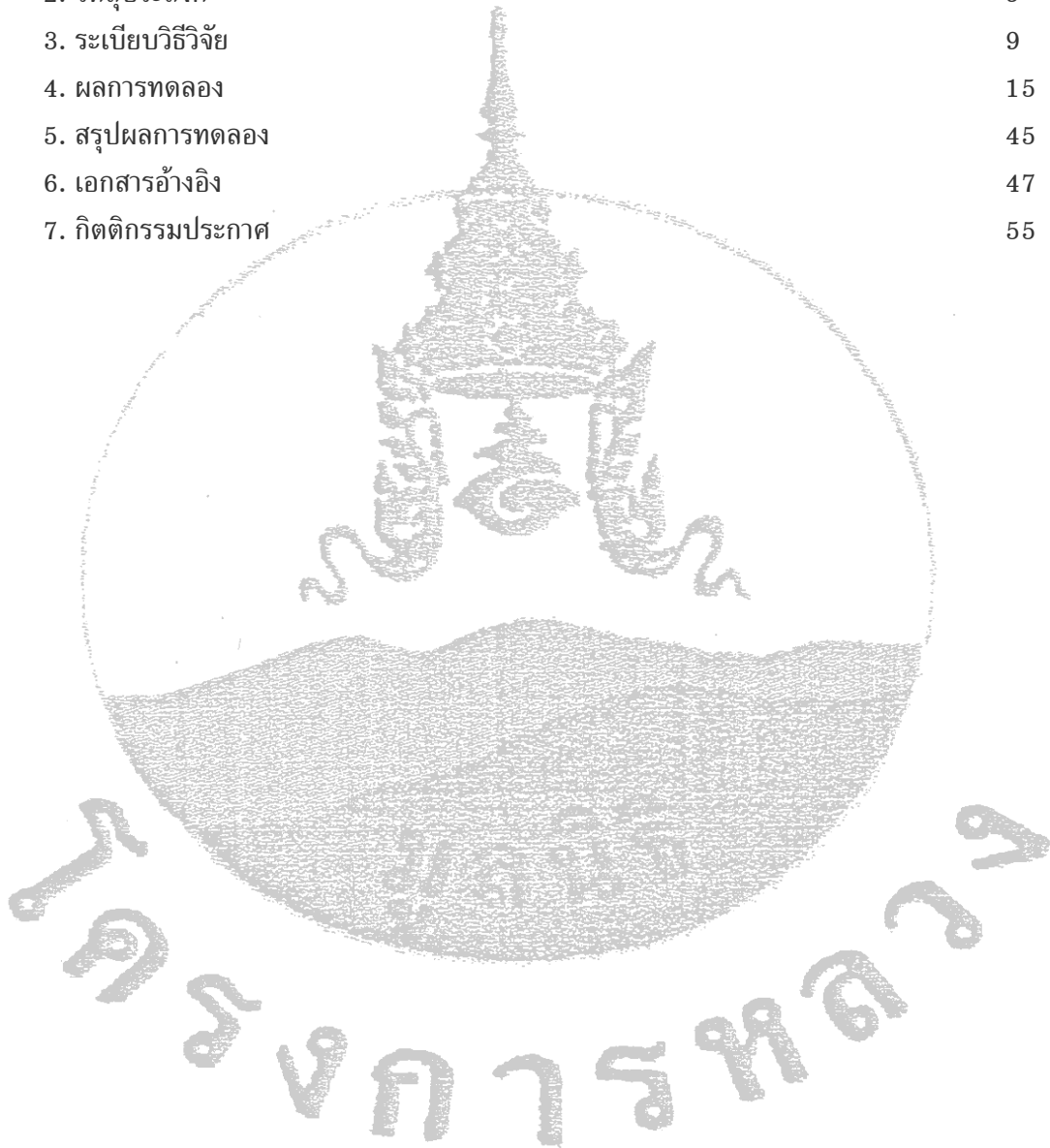
ผู้ร่วมโครงการวิจัย นายอุดมภักดิ์ ขาสสุวรรณ
นางสาวจันทร์ศิริ วาทะหงษ์
นายชัยวัฒน์ ชุ่มปิ่น

ผู้ช่วยวิจัย นางสาวสะแกวัลย์ อุ่นใจเงิน
นางสาวชลธิดา เทพหินลับ

โครงการหลวง

สารบัญ

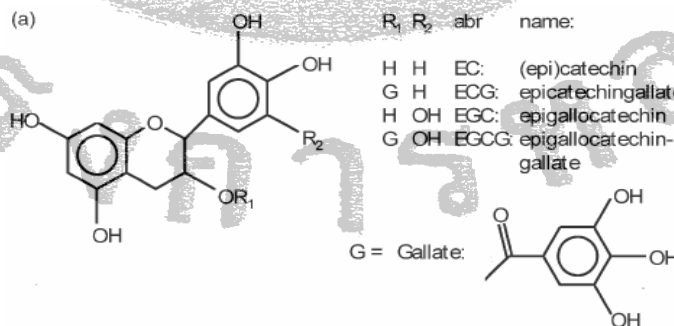
	หน้า
1. บทนำ	3
2. วัตถุประสงค์	9
3. ระเบียบวิธีวิจัย	9
4. ผลการทดลอง	15
5. สรุปผลการทดลอง	45
6. เอกสารอ้างอิง	47
7. กิตติกรรมประกาศ	55



การตรวจวัดความสามารถในการลดภาวะธาตุเหล็กและอนุมูลอิสระมากเกินไปโดยสาร
Epigallocatechin gallate และ Epicatechin gallate ในใบชาของโครงการหลวง
(Investigation of Iron- and Free Radical-Scavenging Capacities of Epigallocatechin
gallate and Epicatechin gallate in Tea Leaves from Thailand Royal Project)

1. บทนำ

เครื่องดื่มชาได้รับความนิยมในการบริโภคมากที่สุดชนิดหนึ่งของโลก การดื่มชาเขียวหนึ่งแก้ว (1.2 กรัม) ทำให้มีสารcatechinอยู่ในพลาสมาในปริมาณ 0.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร [1] เมื่อนำใบชาเอามาทำให้แห้งจะได้เป็นชาหลายชนิด เช่นชาดำ ชาจีนอู่หลงและชาเขียว ขบวนการผลิตชาเขียวนั้นแตกต่างจากชาดำและชาอู่หลง กล่าวคือจะนำใบชาอ่อนที่ไม่ผ่านปฏิกิริยาออกซิเดชันมาหนึ่งด้วยความร้อนที่อุณหภูมิสูงในเวลาสั้นๆ เพื่อหยุดยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่จะทำให้ลายสารประกอบโพลีฟีนอลหลายตัวที่มีอยู่ในใบชา โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารcatechin (catechins, C) ซึ่งได้แก่ (+)-C, (-)-epicatechin (EC), (-)-epicatechin 3gallate (ECG), (-)-epigallocatechin (EGC), (-)-gallocatechin gallate และ (-)-epigallocatechin 3gallate (EGCG) [2] (รูปที่ 1) ซึ่งสารเหล่านี้มีคุณสมบัติต้านการออกซิเดชัน (antioxidants) [3, 4] ในขบวนการหมักเพื่อผลิตชาอู่หลงและชาดำ สารcatechinเหล่านี้จะถูกออกซิไดซ์และโพลีเมอไรซ์ได้ สารธีฟลาวิน (theaflavins, TFs) ที่มีสีส้มแดงและเป็นผลิตภัณฑ์ผสมของสารธีฟลาวิน (TF₁) สารธีฟลาวินแกลเลต (theaflavin-3-gallate, TF_{2A} และ theaflavin-3'-gallate, TF_{2B}) และสารธีฟลาวินไดแกลเลต (theaflavin-3,3'-digallate) [5] สารธีรูบิเจน (thearubigen) ซึ่งพบมากนอกจากนี้ใบชายังมีสารธีโอฟิลลิน (theophyllin) และสารธีโอโบรมีน (theobromine) ที่มีฤทธิ์ทำให้กล้ามเนื้อเรียบบริเวณหลอดเลือดขยายตัว รู้สึกหายใจโล่งจมูก นอกจากนี้ยังมีสารแคฟเฟอีน (caffeine) ที่ออกฤทธิ์กระตุ้น ทำให้ผู้ดื่มรู้สึกสดชื่น กระปรี้กระเป่า



รูปที่ 1 โครงสร้างโมเลกุลสารcatechinต่างๆ

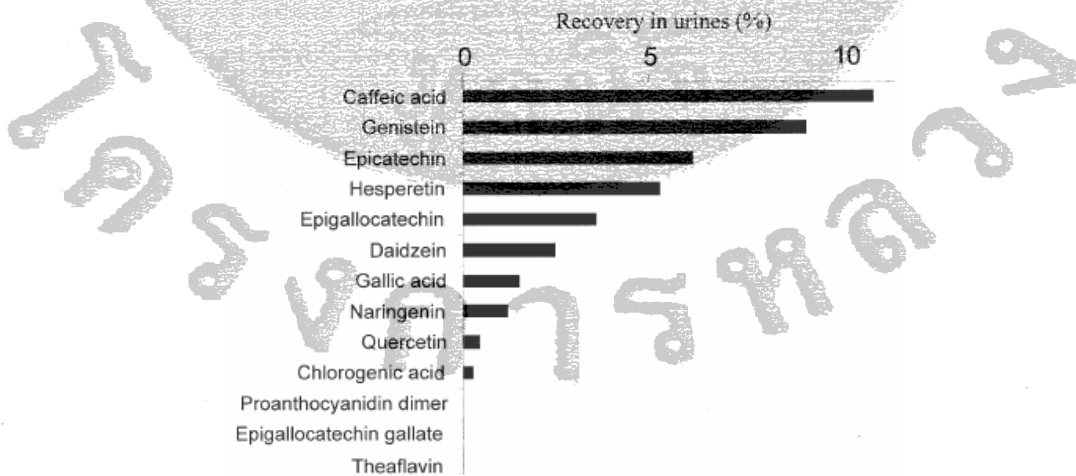
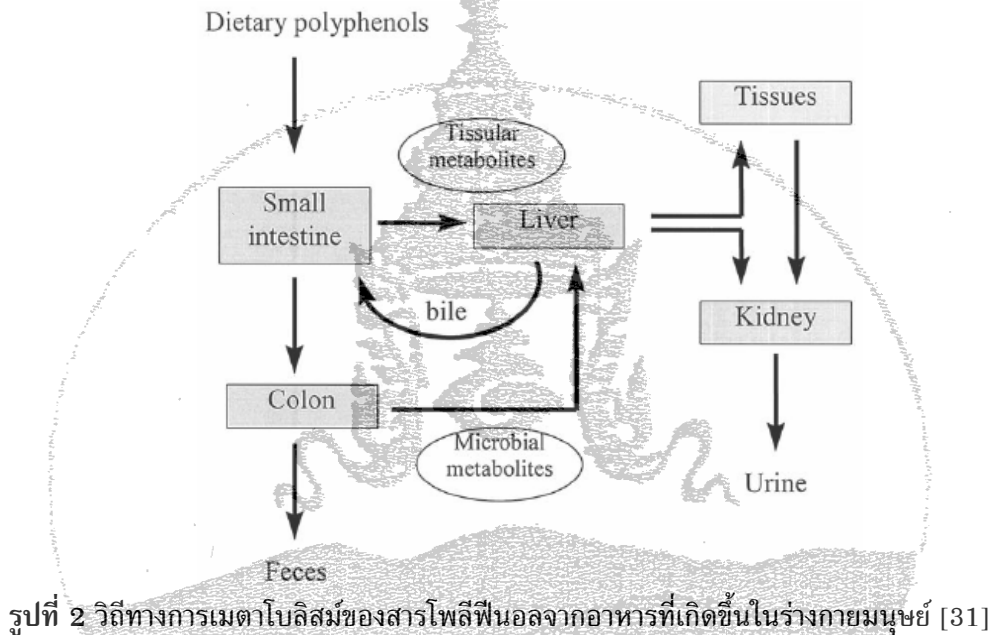
ปัจจุบันสารcatechinและธีฟลาวินได้รับความนิยมในอย่างมากในแง่ที่ใช้เป็นสารต้านและป้องกันการเกิดโรคมะเร็ง (anti-carcinogenic compounds) และโรคระบบหลอดเลือดและหัวใจ (anti-cardiovascular disease agent) [6, 7] มีฤทธิ์ลดความดันโลหิตสูง (antihypertensive) [8]

เป็นสารต้านการอักเสบ (anti-inflammatory agents) สารที่ให้ความร้อนแก่ร่างกาย (thermogenic substances) [9] สารกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ในลำไส้ (probiotics) สารต้านการเจริญเติบโตของจุลชีพที่เป็นโทษ (antimicrobial agent) ช่วยป้องกันเม็ดเลือดแดงถูกทำลายโดยภาวะอนุมูลอิสระมากเกินไป [10] ช่วยเปลี่ยนวิตามินอีให้กลับคืนสู่สภาพธรรมชาติ [11] เป็นสารต้านภาวะไขมันในเลือดสูง (antihyperlipidemic effect) [12] ช่วยลดระดับโคเลสเตอรอล (hypcholesterolaemic) [11, 13, 14] สาร ECG จากชาเขียวช่วยป้องกันลิโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำ (low-density lipoprotein, LDL) ถูกออกซิไดซ์ด้วยสารอนุมูลอิสระ สารประกอบโพลีฟีนอลจากชาเขียวที่ความเข้มข้นต่ำๆ (2-20 ไมโครโมลาร์) มีคุณสมบัติจับธาตุเหล็ก (iron-chelating agents) ได้ [15] (Morel et al., 1993; Hider et al., 2001)

สารคะเตชินในใบชาเขียว ชาดำและชาอูหลงมีปริมาณที่แตกต่างกัน ใบชาเขียวเป็นแหล่งของสารคะเตชินที่ต้านการออกซิเดชัน (antioxidant) ดีเยี่ยม พบว่ามีสารคะเตชินมีอยู่ประมาณ 20% ของน้ำหนักแห้งซึ่งน่าจะเป็นปริมาณที่มีความสำคัญมากที่สุด สารคะเตชินในชาเขียวมีโครงสร้างปฐมภูมิเป็นสารฟลาโวนอล (flavanols) ซึ่งได้แก่สาร C, EGCG, EGC, ECG, GCG และ EC สาร EGCG เป็นสารไอโซเมอร์หลักที่พบได้ในปริมาณสูงที่สุด ตามด้วยสาร ECG, EGC และ EC ตามลำดับ [9] คุณสมบัติต้านการออกซิเดชันเรียงลำดับจากมากไปน้อยดังนี้ ECG > EGCG > EGC > GA > EC = C [16-18] สารคะเตชินต่างๆเหล่านี้มีความไวต่อการถูกออกซิไดซ์ได้ง่าย จึงมีเสถียรภาพที่ในรูปสารละลาย สภาวะความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิและความเข้มข้นที่แตกต่างกัน [19, 20] คุณสมบัติที่น่าสนใจอีกอย่างหนึ่งคือสารคะเตชินในชามีฤทธิ์ต้านการเกิดโรคเบาหวาน (anti-diabetic) มีการนำสมุนไพรมานำมาใช้รักษาหนูทดลอง [21, 22] และคนที่เป็นโรคเบาหวาน [23, 24] สาร EC ในชากระตุ้นการเมตาโบลิซึมของสารไขมันที่ตับหนูทดลองมีผลช่วยป้องกันโรคอ้วน โรคเบาหวานรวมทั้งโรคหลอดเลือดและหัวใจ [25] สาร EGCG ช่วยยับยั้งการสร้างน้ำตาลกลูโคสโดยขบวนการ gluconeogenesis ที่ตับได้ [26, 27] สารโพลีฟีนอลในชาเขียวสามารถช่วยป้องกันการเกิดโรคเบาหวานจากพิษของสาร streptozotocin ในหนูทดลองได้ [3] และลดภาวะ oxidative stress ในหนูทดลองที่เป็นโรคเบาหวานได้ [28] แม้ว่าสาร EGCG จะมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันแรงที่สุดในกลุ่มสารคะเตชินและสามารถป้องกันการเกิดโรคมะเร็งได้ สาร EGCG ไม่ได้อาศัยฤทธิ์ต้านการออกซิเดชัน [29] แต่จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ gelatinase ของเซลล์มะเร็งทำให้ไม่สามารถแพร่กระจายไปที่อื่นได้ [30] หรืออาจจะจับกับอะตอมธาตุเหล็กในโมเลกุลเอนไซม์ ribonucleotide reductase ซึ่งจำเป็นในการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งก็เป็นไปได้ สาร EGCG ช่วยป้องกันการเกิดออกซิเดชันของไขมันที่สมองได้ [1]

การดูดซึมสารโพลีฟีนอลที่มีอยู่ในอาหารต่างๆผ่านช่องทางเดินอาหารเข้าสู่เลือด ส่งผลให้ในพลาสมามีคุณสมบัติต้านออกซิเดชันสูงขึ้นและตรวจพบได้ในปริมาณที่แตกต่างกันในปัสสาวะ ดังนั้นจึงทำให้สามารถเปรียบเทียบ bioavailability ของโมเลกุลสารต่างๆเหล่านี้ในอาหารได้ เมื่อทำการวิเคราะห์ปัสสาวะพบว่ามีการพบ theaflavin อยู่ในปริมาณต่ำสุด (0.0006 เปอร์เซ็นต์) สาร quercetin และ rutin อยู่จำนวนน้อย สาร quercetin glycoside (0.3-1.4

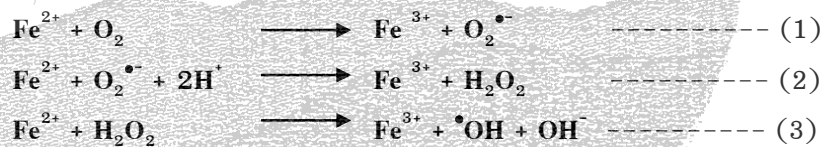
เปอร์เซ็นต์) มีปริมาณสูงกว่าสาร catechin glycoside (3-27 เปอร์เซ็นต์) อย่างไรก็ตามสามารถ
 สาร caffeic acid อยู่ในปริมาณสูงที่สุด (27 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งสารนี้มีเสถียรภาพดีในทางเดินอาหาร
 นอกจากสารคะเตชินต่าง ๆ เหล่านี้จะถูกขับออกทางปัสสาวะแล้ว ยังสามารถถูกขับออกทางน้ำดี
 แล้วขับออกจากร่างกายทางอุจจาระ มีบางส่วนถูกเปลี่ยนแปลงโดยเชื้อแบคทีเรียในลำไส้ใหญ่ก่อน
 จากนั้นจึงถูกดูดซึมกลับเข้าสู่กระแสโลหิตแล้วนำกลับไปยังตับอีกครั้งหนึ่ง (รูปที่ 2)



ภาวะธาตุเหล็กเกิน (Iron overload) เป็นปัญหาที่รุนแรงที่พบได้ในผู้ป่วยโรคโลหิต
 จางธาลัสซีเมียชนิดบีตาและชนิดฮีโมโกลบินอปีตามีสาเหตุมาจากการถ่ายเลือดเป็นประจำ
 เพื่อรักษาให้ฮีโมโกลบินในเลือดอยู่ในระดับปกติ [32, 33] และจากการดูดซึมธาตุเหล็กบริเวณ

ลำไส้เล็กมากกว่าปกติ เพื่อนำไปใช้ในขบวนการสร้างฮีโมโกลบินภายในเม็ดเลือดแดงที่ถูกเหนี่ยวนำให้เพิ่มมากขึ้นสำหรับชดเชยเม็ดเลือดแดงที่ถูกทำลายไปมากกว่าปกติ นอกจากนี้ยังพบได้ในผู้ป่วยโรคฮีโมโครมาโตซิสแบบปฐมภูมิหรือพันธุกรรม ที่มีการดูดซึมธาตุเหล็กบริเวณลำไส้เล็กมากกว่าปกติ [34] จึงทำให้มีการสะสมของธาตุเหล็กบริเวณเนื้อเยื่อต่างๆ โดยเฉพาะที่ตับอ่อนตับ ม้าม ต่อมไร้ท่อและหัวใจ จนเกิดภาวะอนุมูลอิสระมากเกินไป (oxidative stress) ซึ่งเป็นอันตรายต่อเซลล์และเนื้อเยื่อสำคัญเหล่านั้นเกิดมีพยาธิสภาพตามมา [33, 35] อาจทำให้เสียชีวิตได้ในช่วงอายุ 20-30 ปีถ้าไม่ได้รับการรักษาด้วยยาขับเหล็กหรือสารต้านการออกซิเดชัน

ดังแสดงในรูปที่ 4 อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นเหล่านี้มีสาเหตุหลักสำคัญมาจากธาตุเหล็กจำนวนมากที่สะสมอยู่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเฮเบอร์ไวส์ (Haber-Weiss reaction) (ปฏิกิริยา 1 และ 2) ที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ ($O_2^{\bullet -}$) และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ให้กลายเป็นอนุมูลไฮดรอกซิล ($\bullet OH$) [36, 37] และเร่งปฏิกิริยาเฟนตอน (Fenton reaction) ที่มีการเปลี่ยนไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ให้กลายเป็นอนุมูลไฮดรอกซิล [38] ซึ่งเป็นอันตรายอย่างยิ่งต่อสารชีวโมเลกุลต่างๆ เช่นกรดนิวคลีอิก โปรตีน เอนไซม์และไขมันต่างๆ ที่มีความสำคัญ สามารถทำลายเซลล์เม็ดเลือดแดง [39, 40] เซลล์และเนื้อเยื่ออื่นๆ จนเกิดพยาธิสภาพต่างๆ ตามมา ทำให้มีการแก่เกินวัยและอายุสั้นกว่าปกติ

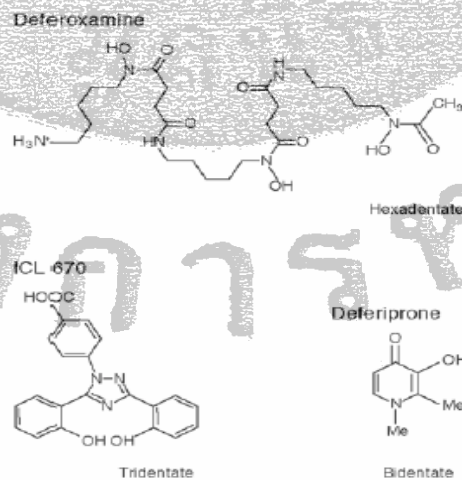


รูปที่ 4 บทบาทธาตุเหล็กในการเกิดอนุมูลอิสระ

การที่ร่างกายได้รับธาตุเหล็กจากภายนอกเข้าไปเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ ส่งผลให้มีการสะสมธาตุเหล็กขึ้นในเซลล์และเนื้อเยื่อต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่บริเวณตับ [41, 42] ทำให้เกิดอาการแทรกซ้อนขึ้นที่อวัยวะต่างๆ เหล่านี้ เซลล์มีการสร้างเฟอร์ริตินขึ้นจำนวนมากเพื่อเก็บสะสมเหล็กที่มากเกินไปภายในและขับออกนอกเซลล์ส่งผลให้เฟอร์ริตินในพลาสมา มีระดับสูงขึ้นอย่างมาก [43-45] ปริมาณธาตุเหล็กรวมและทรานส์เฟอร์รินในพลาสมา มีความสัมพันธ์เพิ่มมากขึ้น [46] ทำให้มีธาตุเหล็กรูปที่ไม่จับกับทรานส์เฟอร์รินเรียกว่า non-transferrin bound iron (NTBI) ปรากฏในพลาสมาของผู้ป่วย [28, 31, 47-51] แม้ยังไม่มี การสรุปแน่นอนว่าธาตุเหล็กรูป NTBI มีโครงสร้างแท้จริงเป็นอย่างไร จากหลักฐานทางอ้อมยืนยันว่าธาตุเหล็กรูป NTBI ไม่ได้อยู่ในรูปหมู่ฮีโมหรือเกาะกับเฟอร์ริติน แต่น่าจะเป็นสารประกอบเหล็กที่เป็นทั้งชนิดโมเลกุลขนาดใหญ่ซึ่งเกาะอย่างหลวมๆ กับโปรตีนในพลาสมา (เช่นอัลบูมิน) และชนิดโมเลกุลขนาดเล็กซึ่งจับอยู่กับซีเตรทฟอสเฟตหรือกลูตาเมต [52] ธาตุเหล็กรูป NTBI ในพลาสมามีส่วนทำให้ผู้ป่วยติดเชือบางอย่างได้ง่าย และทำให้การทำหน้าที่เซลล์เอนโดทีเลียมบริเวณหลอดเลือดบดบกร่อง [53] เมื่อธาตุเหล็ก

รูป NTBI เข้าไปในเซลล์แล้วสามารถเร่งการเกิดอนุมูลอิสระที่ทำลายสารชีวโมเลกุล เซลล์และเนื้อเยื่อได้ [54, 55] ปัจจุบันธาตุเหล็กรูป NTBI ได้รับความสนใจในแง่ที่ใช้เป็นตัวบ่งชี้ (indicator) ที่มีความสัมพันธ์กับภาวะธาตุเหล็กเกินและใช้เป็นตัวติดตามสัมฤทธิ์ผลของการรักษาภาวะเหล็กเกินในผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมียที่ได้รับยาขับเหล็ก [56]

ตามปกติร่างกายไม่มีกลไกทางสรีรวิทยาใดที่ขับธาตุเหล็กจำนวนมากเกินที่สะสมอยู่ตามเนื้อเยื่อต่าง ๆ ออกจากร่างกายได้ การบำบัดด้วยยาขับเหล็ก (รูปที่ 5) เช่น ยาเดสเฟอรัลหรือออกซามินหรือยาดิเฟอรัลโพรนหรือทั้งสองชนิดรวมกันเป็นวิธีที่กำจัดธาตุเหล็กที่มากเกินไปออกจากร่างกายได้ เป็นการช่วยป้องกันอันตรายจากการเกิดสารอนุมูลอิสระที่มีธาตุเหล็กเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาและส่งผลให้ผู้ป่วยมีอายุยืนยาวขึ้น มีคุณภาพชีวิต (quality of life) ที่ดีขึ้น แต่การรักษาด้วยยาขับเหล็กมีค่าใช้จ่ายที่สูงซึ่งไม่เหมาะสมอย่างยิ่งกับประเทศที่กำลังพัฒนา ต้องทำการรักษาอย่างต่อเนื่องตลอดเวลาและมีฤทธิ์ข้างเคียงที่เป็นอันตราย [57, 58] ผู้ป่วยที่มีภาวะเหล็กเกินมักจะเกิดภาวะที่สารต้านอนุมูลออกซิเดชัน (antioxidant) ในร่างกายมีระดับที่ต่ำกว่าปกติ [59-61] การให้ผู้ป่วยธาลัสซีเมียที่มีภาวะเหล็กเกินรับประทานวิตามินซีขณะที่กำลังได้รับยาเดสเฟอรัลสามารถเร่งการขับธาตุเหล็กออกทางปัสสาวะได้มากกว่าเดิม [62] และยังขึ้นอยู่กับปริมาณของวิตามินซีที่รับประทานเข้าไปด้วย [63] คาดว่าวิตามินซีช่วยส่งเสริมให้ธาตุเหล็กอยู่ในรูปแบบที่เหมาะสมที่ยาขับเหล็กจะจับได้ง่ายและดียิ่งขึ้น ส่วนการรับประทานวิตามินซีในปริมาณสูง ๆ โดยไม่ได้รับยาขับเหล็กเข้าไปพร้อม ๆ กันก็ก่อให้เกิดอันตรายได้ โดยพบว่าผู้ป่วยบางรายที่มีภาวะเหล็กเกินเรื้อรังแล้วได้รับยาเดสเฟอรัลร่วมกับวิตามินซีในปริมาณที่สูงเกิน 500 มิลลิกรัมต่อวันมีการทำงานของหัวใจที่ผิดปกติ แต่เมื่อหยุดรับประทานวิตามินซีพบว่าอาการผิดปกติเหล่านั้นก็หายไป



รูปที่ 5 สูตรโครงสร้างโมเลกุลยาขับเหล็กที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน

แม้ว่าการให้ยาขับเหล็กแก่ผู้ป่วยที่มีภาวะธาตุเหล็กเกินโดยเฉพาะอย่างยิ่งผู้ป่วยโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียชนิดบีต้าไมเจอร์และชนิดบีต้าฮีโมโกลบินอีซึ่งพบเป็นจำนวนมากในประเทศไทยจะต้องสิ้นเปลืองค่ารักษาเป็นเงินจำนวนมากและสามารถก่อให้เกิดอาการข้างเคียงขึ้นกับผู้ป่วยได้ แต่การที่ผู้ป่วยธาลัสซีเมียได้รับยาขับเหล็กเป็นประจำก็สามารถทำให้ผู้ป่วยมีอายุยืนยาวขึ้นเมื่อเทียบกับผู้ป่วยที่ไม่ได้รับยาขับเหล็กซึ่งส่วนใหญ่จะเสียชีวิตในช่วงอายุ 20-30 ปีจากภาวะการทำงานของหัวใจล้มเหลว ยาขับเหล็กที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันมีอยู่เพียง 2 ชนิด ชนิดแรกเป็นยาขับเหล็กที่ใช้ฉีดเข้าร่างกายคือยาเดสเฟอริออกซามีน (desferrioxamine) หรือดีเฟอโรซามีน (deferioxamine) ที่ผลิตและจัดจำหน่ายโดยบริษัท Novartis Pharma AG ประเทศสวิสเซอร์แลนด์ และใช้ชื่อทางการค้าคือเดสเฟอรัล (Desferal) อีกชนิดหนึ่งเป็นยาขับเหล็กชนิดใช้รับประทานคือยาดีเฟอริพرون (deferiprone) หรือ L1 ที่ปัจจุบันถูกผลิตและจัดจำหน่ายโดยบริษัท ApoTech ประเทศแคนาดาโดยใช้ชื่อทางการค้าคือเฟอริพร็อก (Ferriprox) และโดยบริษัท ApoPhamar ประเทศอินเดียโดยใช้ชื่อทางการค้าว่าเคลเฟอร์ (Kelfer) ปัจจุบันประเทศไทยโดยองค์การเภสัชกรรมก็ได้ผลิตยาดีเฟอริพرونขึ้นมาเพื่อใช้รักษาผู้ป่วยคนไทยที่เป็นโรคธาลัสซีเมีย ขณะนี้อยู่ในระหว่างการศึกษาระหว่างการศึกษาระหว่างมาตรฐานของยา (drug bioequivalent) และอยู่ในระหว่างการขยายกำลังผลิตสู่ระดับอุตสาหกรรม และคาดว่าจะสามารถนำมาใช้รักษาผู้ป่วยได้ในอีก 2-3 ชำนาญล่าสุดบริษัท Novartis Pharma AG ได้ผลิตยาขับเหล็กชนิดใช้รับประทานซึ่งมีชื่อทางเคมีคือ ICL670 หรือ (4-[3,5-bis(2-hydroxyphenyl)-1,2,4-triazol-1-yl] benzoic acid) และชื่อทางการค้าคือเอกซ์เจด (Exjade) ขึ้นมาและกำลังอยู่ในระหว่างช่วงทดลองใช้กับผู้ป่วยธาลัสซีเมียในหลายๆ ศูนย์ทั่วโลก (Multi-center clinical trials) เปรียบเทียบสัมฤทธิ์ผลกับยาเดสเฟอริออกซามีนและยาดีเฟอริพرون รวมทั้งติดตามฤทธิ์ข้างเคียงและผลต่างๆ ที่เกิดขึ้นจากการใช้รักษาผู้ป่วยเป็นเวลานานๆ ด้วย [59, 61, 64, 65]

สูตรโครงสร้างโมเลกุลสาร catechin ต่างๆ ซึ่งเป็นสารพฤษเคมีสำคัญที่เป็นส่วนประกอบในชาเขียวมีลักษณะคล้ายคลึงกับสาร catechol (catechol) หรือไฮดรอกซีไพริดีน (3-hydroxypyridin-4-one) ที่มีหมู่ไฮดรอกซิลหรือไฮดรอกซิลอยู่ในโมเลกุลซึ่งมีศักยภาพในการจับกับธาตุเหล็ก (iron-chelating agent) และทำลายอนุมูลอิสระ (free-radicals scavenging) ได้ ดังนั้นคุณสมบัติสำคัญทั้งสองอย่างเหล่านี้ (bifunctional properties) จึงเป็นเรื่องท้าทายสำหรับสาร catechin ต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสาร EGCG และ ECG ในสารสกัดชาเขียวที่น่าจะมีความสามารถในการจับธาตุเหล็กที่เป็นตัวการหลักของปฏิกิริยาเคมีฮาเบอร์ไวส์และเฟนตอนในการสร้างอนุมูลอิสระและความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระที่มีอยู่มากมายในร่างกายของผู้ป่วยธาลัสซีเมียด้วย สมมติฐานนี้ทำให้มีค้นคว้าวิจัยหาวิธีหรือขบวนการสกัดและแยกสารออกฤทธิ์ catechin ชนิดต่างๆ ในใบชาที่เป็นผลิตภัณฑ์จากโครงการหลวงให้ได้ปริมาณ (yield) คุณภาพ (quality) และศักยภาพ (potential) มากที่สุดเพื่อใช้ศึกษาสัมฤทธิ์ผลที่แตกต่างๆ ด้านวิทยาศาสตร์สุขภาพ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานและแนวทางที่จะนำมาประยุกต์ใช้เป็นอาหารเสริมหรือยาเพื่อการป้องกันหรือบรรเทาภาวะธาตุเหล็กเกินและภาวะอนุมูลอิสระมากเกินไปที่เป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดพยาธิ

สภาพต่างๆ ในผู้ป่วยโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียที่มีภาวะเหล็กเกินอันเป็นผลมาจากได้รับเติมเลือดเป็นประจำและการดูดซึมธาตุเหล็กที่บริเวณลำไส้เล็กมากเกินไป

2. วัตถุประสงค์

- 1) เพื่อตรวจวัดปริมาณสารเคเดซินที่เก็บในตำแหน่งต่างกันของต้นขาจากศูนย์ผลิตชาโครงการหลวง
- 2) เพื่อศึกษาเปรียบเทียบปริมาณสารเคเดซินในใบชาที่เตรียมโดยวิธีสากลกับวิธีอบด้วยเตาไมโครเวฟ
- 3) ศึกษาในหลอดทดลองเกี่ยวกับคุณสมบัติด้านการจับธาตุเหล็กและลดระดับอนุมูลอิสระโดยสารเคเดซินชนิด EGCG และ ECG ที่แยกได้จากใบชาของโครงการหลวงเทียบกับที่ได้จากใบชาของศูนย์อื่นๆ
- 4) ศึกษาความสามารถของสารสกัดชาในการลดภาวะธาตุเหล็กเกินในเซลล์ตับหนูทดลอง
- 5) ศึกษาสัมฤทธิ์ผลของสารสกัดชาเขียวชนิดเม็ดในการป้องกันและลดภาวะธาตุเหล็กเกินและภาวะอนุมูลอิสระมากเกินไปในหนูทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีภาวะเหล็กเกิน
- 6) ศึกษาของสารสกัดชาเขียวชนิดเม็ดในการต้านหรือป้องกันการเกิดโรคเบาหวานในหนูทดลอง

3. ระเบียบวิธีวิจัย

เป็นการนำใบชาตัวอย่างทั้งที่เป็นใบชาสดพันธุ์ต่างๆ และใบชาแห้งที่เป็นผลิตภัณฑ์ของศูนย์ผลิตชาโครงการหลวงทั้ง 4 แห่งมาทำการศึกษาหาปริมาณสารเคเดซินที่บริเวณตำแหน่งต่างกันบนต้นชา พัฒนาวิธีการอบด้วยเตาไมโครเวฟเพื่อเตรียมใบชาเขียวแห้ง ศึกษาความสามารถของสารเคเดซิน EC, EGC, EGCG และ ECG ในการลดภาวะธาตุเหล็กเกินและอนุมูลอิสระมากเกินไปในเลือด เซลล์ตับหนูและหนูทดลองที่มีภาวะธาตุเหล็กเกิน รวมทั้งผลของสารสกัดชาเขียวที่ช่วยเพิ่มการต้านทานการเกิดโรคเบาหวานในหนูทดลอง โดยมีการออกแบบและทดสอบวิธีการทดลองต่างๆ ดังต่อไปนี้

3.1 การเก็บตัวอย่างใบชา

ชาตัวอย่างเป็นใบชาสดพันธุ์ต่างๆ (ได้แก่ชาพันธุ์เบอร์ 12 หยวนจือ อุหลงและอัสสัม) จากศูนย์ผลิตชาของโครงการหลวงที่ดอยอ่างขาง ห้วยน้ำขุ่น ม่อนเงาะ ขุนวางและปางตะ รวมทั้งชาเขียวดอยคำที่เป็นผลิตภัณฑ์ของโครงการหลวง

3.2 การตรวจวัดปริมาณสารเคเดซินในใบชาแห้งด้วยวิธี HPLC

ซึ่งนำหนักใบชาสดที่เก็บได้ แบ่งใบชาสดที่เก็บได้เป็น 2 ส่วนๆ หนึ่งเตรียมเป็นผลิตภัณฑ์ใบชาเขียวแห้งโดยกรรมวิธีสากลที่ใช้อยู่ อีกส่วนหนึ่งนำไปอบด้วยเตาไมโครเวฟกำลังไฟฟ้า 500

วัดเป็นเวลานาน 3 นาที ทำการวัดน้ำหนักใบชาแห้งที่ได้เพื่อนำไปตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารคะเตชินต่างๆด้วยวิธี HPLC

การสกัดใบชาด้วยน้ำร้อน

ชั่งใบชาเขียวแห้งปริมาณ 2.0 กรัม นำมาบดให้ละเอียดด้วยครกที่ทำด้วยกระเบื้องเคลือบ เติงในน้ำร้อนอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสจำนวน 100 มิลลิลิตร ทำการสกัดบนเครื่อง magnetic stirrer นาน 10 นาที กรองน้ำชาที่สกัดได้ลงบนกระดาษกรอง Whatman No.1 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 125 มิลลิเมตร เก็บสารละลายใส่ที่กรองได้ไว้ใช้ในการทดลองอื่นๆต่อไป

การสกัดใบชาด้วยตัวทำละลายต่างๆ

ชั่งใบชาเขียวแห้งปริมาณ 2.0 กรัม นำมาบดให้ละเอียดด้วยครกที่ทำด้วยกระเบื้องเคลือบ เติงในน้ำร้อนอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ในสารละลายเอทานอล (ความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์) หรือในสารละลายเฮกเซนปริมาตร 100 มิลลิลิตร ทำการสกัดบนเครื่อง magnetic stirrer นาน 10 นาที กรองน้ำชาที่สกัดได้ลงบนกระดาษกรอง นำสารละลายใส่ที่กรองได้ไปทำให้แห้งด้วยวิธี lyophilization

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารคะเตชินด้วยเครื่องมือ Analytical HPLC

ทำการวิเคราะห์ปริมาณสารคะเตชินชนิดต่างๆ ได้แก่ catechin (C), epicatechin (EC), epigallocatechin (EGC), epicatechin gallate (ECG) และ epigallocatechin gallate (EGCG) ด้วยวิธี reverse-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) โดยนำสารสกัดชาที่เตรียมได้มากรองอีกครั้งหนึ่งด้วยกระดาษกรอง Whatman 0.45 ไมครอน จากนั้นจึงนำสารละลายที่กรองได้ไปฉีดเข้าเครื่องมือ HPLC ที่มีคอลัมน์ Spherosorb (ขนาดมิติ 4.7x250 mm, 5 μ m) ต่อกับ Spherosorb ODS2 guard column (ขนาดมิติ 4.7x10 mm, 5 μ m) เป็นตัวแยกวิเคราะห์ ทำการชะล้างด้วยตัวทำละลายเคลื่อนที่ (acetonitrile:ethyl acetate:0.05% sulphuric acid ด้วยอัตราส่วนโดยปริมาตร 12:2:86, v/v/v) ที่อัตราเร็วการไหลของตัวทำละลาย 1 มิลลิลิตรต่อนาที ติดตามวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร แล้วหาปริมาณสารคะเตชินโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานที่เตรียมได้จากการฉีดสารคะเตชินแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นต่างๆ

การเตรียมปริมาณสารคะเตชินด้วยเครื่องมือ Preparative HPLC

นำสารสกัดชาที่เตรียมได้จำนวน 0.5 มิลลิลิตรมาด้วยฉีดเข้าเครื่องมือ Preparative HPLC) ที่มีคอลัมน์ Spherosorb (ขนาดมิติ 10x250 mm, 5 μ m) ต่อกับ Spherosorb ODS2 guard column (ขนาดมิติ 10x10 mm, 5 μ m) ทำการชะล้างด้วยตัวทำละลายเคลื่อนที่ (methanol:H₂O ด้วยอัตราส่วนโดยปริมาตร 29:71, v/v/v) ที่อัตราเร็วการไหลของตัวทำละลาย 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ติดตามวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรและเก็บลำดับส่วนสารละลายที่วิเคราะห์ได้ด้วยเครื่องมือเก็บลำดับส่วนแยก (fraction collector) เพื่อนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงอีกครั้งหนึ่งที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร เก็บรวมลำดับส่วนสารละลาย C, EC, EGC, EGCG และ ECG ในแต่ละ peak ที่แยกได้ไปทำการตรวจซ้ำด้วยวิธี

Analytical HPLC เพื่อยืนยันความบริสุทธิ์ของสาร catechin species ต่างๆที่แยกได้ หลังจากนั้นจึงนำไปทำให้แห้งภายใต้สุญญากาศ

การตรวจวัดปริมาณสาร catechin ต่างๆในใบชาสดที่ตำแหน่งต่างกันของต้นชา

ทำการเก็บใบชาในตำแหน่งต่างกันของต้นชา (ระยะห่างกัน 1 นิ้ว) นำไปชั่งน้ำหนักใบชาสด อบด้วยเตาไมโครเวฟกำลังไฟฟ้า 500 วัตต์เป็นเวลานาน 3 นาที ทำการวัดน้ำหนักใบชาแห้งที่ได้ แล้วนำไปตรวจวิเคราะห์ปริมาณสาร catechin ด้วยวิธี High-performance liquid chromatography (HPLC) ทำการเปรียบเทียบปริมาณสาร catechin ต่างๆที่มีอยู่ในใบชาสดที่ตำแหน่งต่างๆของต้นชา

3.3 การตรวจวัดความสามารถในการดึงธาตุเหล็กในสารละลาย

นำสาร catechin ชนิดต่างๆที่แยกได้จากวิธี preparative HPLC ไปทำปฏิกิริยากับสารละลายธาตุเหล็กชนิดต่างๆ (ความเข้มข้น 0-200 ไมโครโมลาร์) ดังนี้สารละลาย ferric nitrate ค่าพีเอช 3.0 สารละลาย ferric nitrilotriacetate ค่าพีเอช 7.0 และสารละลาย ferric citrate ค่าพีเอช 7.0 จากนั้นทำการตรวจวัดสารประกอบเหล็กตัวใหม่ซึ่งเกิดขึ้นด้วยวิธี spectrophotometry ดังนี้

ผลของเวลาในการเกิดปฏิกิริยา

นำสารละลายสกัดชาและสาร catechin มาทำปฏิกิริยากับสารละลายธาตุเหล็กชนิดต่างๆที่ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 0, 5, 10, 20 และ 60 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่เหมาะสม นำผลมาเขียนกราฟที่แสดงค่าความเข้มข้นของสารกับค่าดูดกลืนแสง

ผลของความเข้มข้นต่อการเกิดปฏิกิริยา

นำสารละลายสกัดชาและสาร catechin มาทำปฏิกิริยากับสารละลายธาตุเหล็กชนิดต่างๆ (ความเข้มข้น 0-200 ไมโครโมลาร์) ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่เหมาะสม นำผลมาเขียนกราฟที่แสดงค่าความเข้มข้นของสารกับค่าดูดกลืนแสง

นำสารละลายสกัดชาและสาร catechin มาทำปฏิกิริยากับสารละลายธาตุเหล็กชนิดต่างๆที่ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่เหมาะสม นำผลมาเขียนกราฟที่แสดงค่าปริมาณธาตุเหล็กกับค่าดูดกลืนแสง

3.4 การตรวจวัดความสามารถดึงธาตุเหล็กในพลาสมาของผู้ป่วยธาลัสซีเมีย

นำสารละลายสกัดชาและสาร catechin มาทำปฏิกิริยากับพลาสมาผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมียที่มีธาตุเหล็กรูป non-transferrin bound iron (NTBI) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 0, 0.5, 1, 2, 4 และ 8 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นผ่าน ultrafiltration membrane (30-kilodalton molecular weight cut-off) ด้วยเครื่องปั่นที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 45 นาที เพื่อกำจัดโปรตีนต่างๆในพลาสมาออกไป นำสารละลายใสที่ปั่นได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณธาตุเหล็กรูป NTBI ด้วยวิธีของ Singh และคณะ [66, 67]

3.5 การตรวจวัดความสามารถต้านการออกซิเดชัน

การตรวจวัดปริมาณสาร thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)

สารเมทิลโมโกลบิเนร่งการเปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้สลายตัวกลายเป็นน้ำและสาร reactive oxygen ซึ่งสาร reactive oxygen ที่เกิดขึ้นจะไปออกซิไดซ์สาร ABTS (2,2'-azobis-(3-ethyl benzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt)) ให้กลายเป็น oxidized ABTS (ABTS⁺) ซึ่งมีสีน้ำเงินเขียวและให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 414 นาโนเมตร สารต้านออกซิเดชันที่มีอยู่ในใบชา (เช่น EGCG และอื่นๆ) จะยับยั้งกระบวนการออกซิไดซ์สาร ABTS ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 414 นาโนเมตรลดลง คำนวณหาระดับการต้านออกซิเดชันของสารตรวจสอบได้โดยเทียบจากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง %inhibition กับความเข้มข้นต่างๆของสารละลายโทรลอคซ์ (Trolox)

ปีเปตพลาสมาจำนวน 0.1 มิลลิลิตร น้ำกลั่นจำนวน 0.1 มิลลิลิตร สารละลายกรดบาบิทริก (1%) จำนวน 0.2 มิลลิลิตร และสารละลายพธาเลตบัพเฟอร์ (ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ค่าพีเอชเท่ากับ 3.5) จำนวน 0.4 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง เขย่าให้ผสมกันดี นำไปต้มในอ่างน้ำอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสนาน 1 ชั่วโมงแล้วทำให้เย็นลง ค่อยๆเติมกรดเกลือเข้มข้น 10 โมลาร์ลงไป 0.1 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมกันดี แล้วเติมนิวทานอลลงไป 1.5 มิลลิลิตร เขย่าแรงๆให้ผสมกันโดยใช้เครื่องมือ vortex mixer นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นที่อุณหภูมิ ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาทีก็จะได้สารละลายที่แยกชั้นกัน ทำการดูดสารละลายโปรตีนที่มีสีและเรืองแสงได้ในชั้นนิวทานอลเพื่อไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร

การวัดสารอนุมูลอิสระในเซลล์เม็ดเลือดแดงด้วยวิธีโฟลชียโตเมตรี

เอนไซม์ esterase ในเซลล์ที่มีชีวิตจะไฮโดรไลซ์สาร 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) ที่แพร่ซึมเข้าไปในเซลล์ให้กลายเป็นสาร 2'-7'-dichlorofluorescein (DCFH) ก่อน จากนั้นอนุมูลอิสระที่มีอยู่ภายในเซลล์จะออกซิไดซ์สาร DCFH ให้กลายเป็นสาร oxidized dichlorofluorescein (DCF) ที่มีคุณสมบัติเรืองแสงได้ ซึ่งความเข้มของแสงจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในเซลล์ การตรวจวัดภาวะ oxidative stress ด้วยวิธีการนี้มีข้อดีหลายอย่าง เช่นใช้เลือดตัวอย่างเพียง 2 ไมโครลิตร มีความไวและความเฉพาะเจาะจงในการตรวจวัดสูง สะดวกและรวดเร็ว

นำเลือด (heparinized whole blood) มาเจือจางด้วยสารละลาย phosphate buffered saline (PBS) เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นเติมสาร DCFH-DA ลงไป เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในตู้อบ 5% CO₂ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายใส่ชั้นบนทิ้ง ทำการปั่นล้างด้วยสารละลาย PBS อีกครั้งด้วยความเร็ว 2,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 10 เซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำเซลล์ที่ได้มาเติมสารละลาย PBS เพื่อให้ได้เซลล์ที่มีความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำไปตรวจวัดการเรืองแสงด้วยเครื่องโฟลชียโตมิเตอร์ที่มีหลอดอาร์กอนเป็น

แหล่งกำเนิดแสงเลเซอร์เพื่อกระตุ้นให้มีการเรืองแสง ทำการตรวจวัดความเข้มการเรืองแสงสีเขียวด้วยโปรแกรม CellQuest[®]

3.6 การศึกษาผลของสารสกัดชาต่อสภาวะธาตุเหล็กและอนุมูลอิสระในหนูทดลอง

สารสกัดชาที่ให้หนูทดลองกินเข้าไปจะถูกดูดซึมจากระบบทางเดินอาหารเข้าสู่กระแสโลหิต ลำเลียงไปยังส่วนต่างๆของร่างกาย สารสกัดชาที่ทดสอบนี้ควรมีศักยภาพในการจับและดึงธาตุเหล็กรูป NTBI ในพลาสมาได้ดี เมื่อผ่านเข้าไปในเซลล์เรติคิวโลเอนโดทีเลียม (เช่น ตับ ม้าม และไขกระดูก) แล้วสามารถจับและนำธาตุเหล็กรูป LIP ภายในเซลล์ออกมาได้สะดวก สารเชิงซ้อนระหว่างธาตุเหล็กกับยาขับเหล็กที่เกิดขึ้นนี้สามารถถูกขับออกจากร่างกายทางปัสสาวะหรืออุจจาระได้ง่าย ซึ่งสามารถทำการตรวจสอบสภาวะธาตุเหล็กในเลือดของหนูทดลองโดยทำการวัดปริมาณตัวชี้วัดปริมาณธาตุเหล็กรูปต่างๆ [68-71]

ทำการเลี้ยงหนูทดลองพันธุ์ Wistar เพศผู้ที่มีน้ำหนักตัวระหว่าง 170-200 กรัมในกรงที่ทำด้วยวัสดุโพลีโพรพิลีนภายในโรงเลี้ยงสัตว์ทดลองซึ่งได้ทำการควบคุมอุณหภูมิห้องไว้ที่ 25 องศาเซลเซียสและแสงสว่างวัฏจักรกลางวัน 12 ชั่วโมง/กลางคืน 12 ชั่วโมง ทำการเลี้ยงหนูทดลองทั้งหมดด้วยอาหารเลี้ยงมาตรฐานและน้ำดื่มสะอาด จากนั้นทำการแบ่งหนูทดลองออกเป็น 5 กลุ่มๆละ 12 ตัวดังนี้

- | | |
|---------------------|--|
| กลุ่มที่ 1 (Fe) | กลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำกลั่นอย่างเดียว |
| กลุ่มที่ 2 (PG-Fe) | กลุ่มที่กินสารสกัดชาเขียวความเข้มข้น 15 กรัมเปอร์เซ็นต์ (300 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อสัปดาห์) มาแล้ว 1 เดือนและได้รับการฉีดสารละลายธาตุเหล็ก |
| กลุ่มที่ 3 (IG-Fe) | กลุ่มที่กินสารสกัดชาเขียวความเข้มข้น 15 กรัมเปอร์เซ็นต์ (300 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อสัปดาห์) พร้อมกับการได้รับการฉีดสารละลายธาตุเหล็ก |
| กลุ่มที่ 4 (PoG-Fe) | กลุ่มที่ได้รับการฉีดสารละลายธาตุเหล็กมาแล้ว 1 เดือนและกินสารสกัดชาเขียวความเข้มข้น 15 กรัมเปอร์เซ็นต์ (300 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อสัปดาห์) |
| กลุ่มที่ 5 (L1-Fe) | กลุ่มที่กินยาขับเหล็กดีเฟอริโพรน (15 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน) พร้อมกับการได้รับการฉีดสารละลายธาตุเหล็ก |

กระตุ้นหนูทดลองให้เกิดภาวะเหล็กเกินโดยฉีดสารละลายธาตุเหล็ก (ferric citrate ในสารละลายบัฟเฟอร์ MOPS ค่าพีเอช 7.0) ปริมาณ 5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมเข้าไปบริเวณใต้ผิวหนังหน้าท้องในทุกๆสัปดาห์ติดต่อกันเป็นเวลานาน 4 เดือน ทำการเจาะเลือดทุกๆสัปดาห์จากเส้นเลือดดำที่บริเวณหางใส่หลอดทดลองที่มีสารป้องกันเลือดแข็งเฮพารินบรรจุอยู่นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 2,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลานาน

10 นาทีเพื่อแยกเก็บพลาสมาไว้ใช้วัดหาระดับ plasma iron (PI), transferrin saturation และ NTBI เป็นค่าบ่งชี้ภาวะธาตุเหล็กเกิน จนกระทั่งหนูทดลองมีภาวะธาตุเหล็กเกิน

การตรวจวัดปริมาณ plasma iron (PI)

นำพลาสมาจำนวน 0.1 มิลลิลิตรมาตกตะกอนโปรตีนด้วยสารละลาย trichloroacetic acid (TCA) (ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ที่มีสาร thioglycolic acid เป็นองค์ประกอบอยู่) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นที่ความเร็ว 2,500 รอบต่อนาที ณ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 20 นาที ตูตสารละลายใส่ชั้นบนที่ได้จำนวน 0.1 มิลลิลิตรใส่หลอดทดลองชุดใหม่ จากนั้นเติมสารละลาย bathophenanthroline sulfonate จำนวน 0.2 มิลลิลิตรลงไป ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 30 นาที และนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาปริมาณ PI ที่มีอยู่

การตรวจวัดค่า total iron binding capacity (TIBC)

เติมสารละลาย ammonium ferrous sulfate ปริมาณ 1 โมลลงไปในพลาสมา 0.2 มิลลิลิตรเพื่อทำให้ทรานส์เฟอร์รินในพลาสมาอ้อมตัวด้วยธาตุเหล็ก ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 30 นาที เติมผง magnesium carbonate ลงไป 30 มิลลิกรัมเพื่อดูดซับธาตุเหล็กที่เหลือมากเกินไป นำพลาสมาดังกล่าวจำนวน 0.1 มิลลิลิตรไปทำการตรวจวัดปริมาณธาตุเหล็กตามวิธีเดียวกับที่ใช้ในการตรวจวัดปริมาณ PI ซึ่งค่าปริมาณธาตุเหล็กที่ได้ในขั้นตอนนี้เป็นค่า TIBC จากนั้นนำไปคำนวณหาค่า %transferrin saturation ตามสูตรนี้

$$\% \text{Transferrin saturation} = \text{PI} / \text{TIBC} \times 100$$

การตรวจปริมาณ non-transferrin bound iron (NTBI)

นำพลาสมาทำปฏิกิริยากับสารละลาย nitrilotriacetic acid (NTA) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 30 นาที ธาตุเหล็กรูป NTBI จะถูกเปลี่ยนไปเป็นสารประกอบ $\text{Fe}^{3+} - (\text{NTA})_2$ นำไปปั่นแยกเอาโปรตีนในพลาสมาออกไป แล้วนำไปฉีดวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC แล้วทำการชะด้วยสารละลายเคลื่อนที่ (ประกอบด้วยสาร 1-propyl-2-methyl-3-hydroxypyridin-4-one (หรือ CP22) ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ในตัวทำละลาย 19% acetonitrile in 5 mM MOPS buffer, pH 7.0) ที่อัตราเร็ว 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

3.7 ผลของสารสกัดชาในการเพิ่มความต้านทานการเกิดโรคเบาหวานในหนูทดลอง

เลี้ยงหนูทดลองพันธุ์ Wistar เพศผู้ น้ำหนักตัว 170-200 กรัมจำนวน 15 ตัว ในกรงที่ทำด้วยวัสดุโพลีโพรพิลีน เลี้ยงหนูทดลองด้วยอาหารปกติ แบ่งหนูออกเป็น 4 กลุ่ม ดังนี้

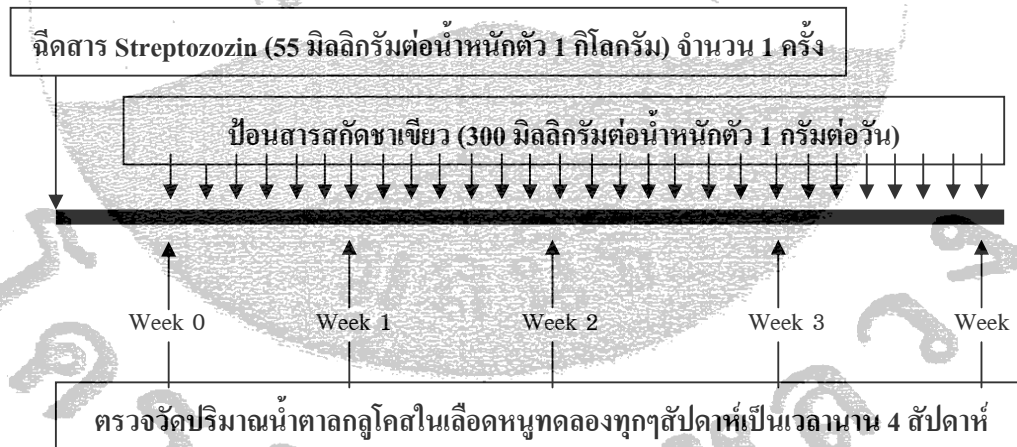
กลุ่มที่ 1 (Cont) กลุ่มควบคุมที่ได้รับสารละลาย citrate buffer ค่าพีเอช 5.0 ติดต่อกันเป็นเวลา 1 เดือน

กลุ่มที่ 2 (Cont+GT[#]) กลุ่มควบคุมที่กินสารสกัดชาเขียว 300 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน ติดต่อกันเป็นเวลา 1 เดือน

กลุ่มที่ 3 (STZ^{*}) กลุ่มที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดโรคเบาหวานชนิดเฉียบพลันโดยการฉีดสารละลายสเตรปโตโซติน (55 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม) ก่อน แล้วจึงได้รับสารละลาย citrate buffer ค่าพีเอช 5.0 ติดต่อกันเป็นเวลา 1 เดือน

กลุ่มที่ 4 (STZ^{*}+GT[#]) กลุ่มที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดโรคเบาหวานชนิดเฉียบพลันโดยการฉีดสารละลายสเตรปโตโซติน (55 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม) ก่อน แล้วให้สารสกัดชาเขียว (300 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน) ติดต่อกันเป็นเวลา 1 เดือน

ทำการตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูทดลองทุก 1 สัปดาห์ โดยก่อนเริ่มศึกษาให้หนูทดลองอดอาหารเป็นเวลา 8-12 ชั่วโมง เจาะเลือดจากหางหนูเวลา 8.00 น. โดยใช้ EDTA เป็นสารกันเลือดแข็งตัว นำเลือดที่ได้ไปปั่นแยกเก็บซีรัมเพื่อใช้ตรวจวัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสด้วยวิธี Glucose oxidase/peroxidase test (Biosub[®] Glucose enzymatic colorimetric test)



รูปที่ 6 แผนผังการทดลองในระยะเวลา 1 เดือน

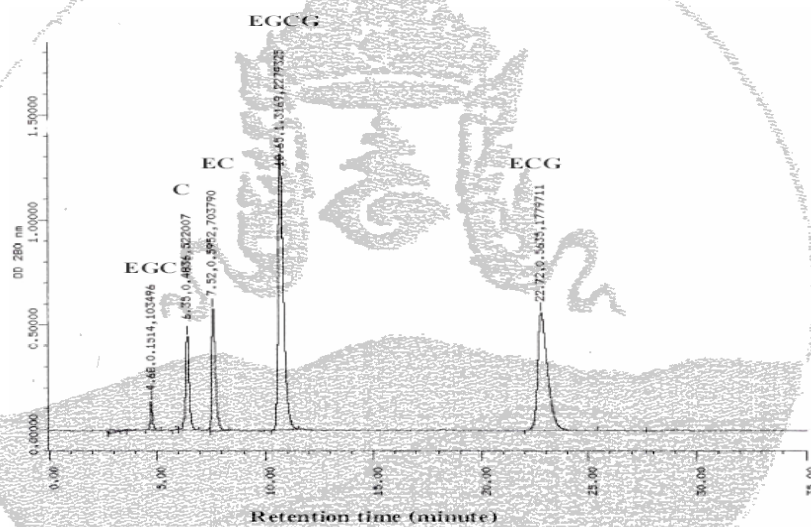
4. ผลการทดลอง

4.1 การตรวจวัดปริมาณสารเคเตซินในชาเขียว

การตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี Analytical HPLC

วิธี Reversed-phase HPLC ถูกพัฒนาขึ้นมาเพื่อใช้วิเคราะห์และแยกสารเคเตซินชนิดต่างๆอย่างน้อย 5 ชนิดซึ่งได้แก่ EGC, C, EC, EGCG และ ECG ออกมาได้โดยคุณสมบัติการมีขั้วของโมเลกุลสารที่แตกต่างกัน (ตามลำดับเวลาหรือ Retention time ที่สารเหล่านี้ถูกชะผ่านออกมาจากคอลัมน์) และปริมาณสารที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดชาเขียว (ตามความสูงและ

พื้นที่ใต้กราฟของสาร catechin แต่ละชนิด) [2, 72] โดยจะพบว่าสาร EGCG มีปริมาณสูงที่สุด รองลงมาคือ ECG, C, EC และ EGC ตามลำดับ (รูปที่ 7) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาที่แสดงให้เห็นว่าในสารสกัดชาเขียวมีสาร EGCG อยู่ในปริมาณสูงที่สุดและแสดงถึงการมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงที่สุด [4] [11] ผลการวิเคราะห์ปริมาณสาร catechin ต่าง ๆ ในผลิตภัณฑ์ชาชนิดต่าง ๆ ที่วางขายในประเทศไทยพบว่ามีปริมาณสาร EGCG อยู่ 1.4-103.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแห้ง 1 กรัม สาร EGC อยู่ 3.9-45.3 มิลลิกรัมต่อกรัม สาร ECG อยู่ 0.2-45.6 มิลลิกรัมต่อกรัม และสาร EC อยู่ 0.6-21.2 มิลลิกรัมต่อกรัม โดยชาเขียวมีสาร catechin อยู่ในปริมาณสูงกว่าชาอู่หลงและชาหมัก (ชาแดงและชาดำ) นอกจากนี้ยังพบว่ามีสารคาเฟอีนประกอบอยู่ในปริมาณ 7.5-86.6 มิลลิกรัมต่อกรัมซึ่งในชาเขียวและชาอู่หลงมีปริมาณต่ำกว่าในชาหมัก [73]



รูปที่ 7 แบบโครมาโตแกรมของสาร catechin epigallocatechin (EGC), catechin (C), epicatechin (EC), epigallocatechin 3-gallate (EGCG) และ epicatechin 3-gallate (ECG) ที่แยกได้จากสารสกัดชาเขียว (ความเข้มข้น 5 กรัมเปอร์เซ็นต์) ด้วยวิธี analytical HPLC

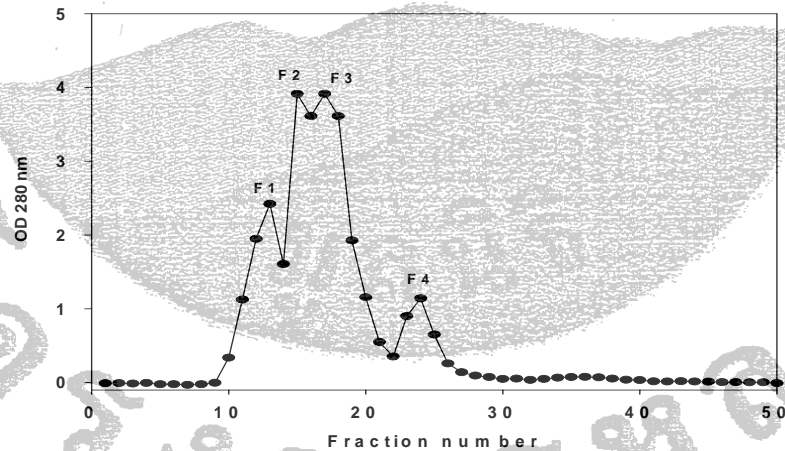
(วิธีการ : สกัดสารสกัดชาเขียวจำนวน 50 ไมโครลิตรผ่านเข้าเครื่องมือ HPLC ที่มีคอลัมน์ SpherosorbODS2 (ขนาดมิติ 4.7x250 mm, 5 μ m) ทำการชะล้างด้วยตัวทำละลายเคลื่อนที่ (acetonitrile:ethyl acetate:0.05% sulphuric acid ด้วยอัตราส่วนโดยปริมาตร 12:2:86, v/v/v) ที่อัตราเร็วการไหลของตัวทำละลาย 1 มิลลิตรต่อนาที ติดตามวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร)

การตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี Preparative HPLC

การศึกษาล่าสุด [55] ได้แสดงถึงการนำชาเขียวมาสกัดก่อนด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสนาน 40 นาที แล้วนำสารสกัดหยาบที่ได้ไปแยกแ่งการละลายในตัวทำละลายผสมน้ำ/คลอโรฟอร์มเพื่อกำจัดสารคาเฟอีนออกไป ต่อจากนั้นจึงนำส่วนสกัดที่ได้ไปแยกแ่งการละลายในตัวทำละลายผสมน้ำ/เอทิลอะซิเตทเพื่อทำให้สาร catechin EGC, EC, EGCG และ EGCG บริสุทธิ์มากยิ่งขึ้นและสามารถนำไปแยกส่วน EGCG ออกมาด้วยวิธี preparative HPLC ต่อไป อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้ เราได้ทำการแยกสาร catechin EGCG และ ECG ออกจาก

สารสกัดหยาบชาเขียวที่ผ่านการสกัดด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสแล้ว ซึ่งวิธีการนี้ เหมือนกับการต้มชาเขียวทั่วไปและสามารถแยกสกัดสาร catechin EGCG และ ECG ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

เมื่อนำสารสกัดชาเขียวมาทำการแยกด้วยวิธี preparative HPLC ทำให้ได้สาร catechin ชนิดต่างๆเป็น 4 กลุ่ม (Fractions) คือ Fraction 1 (F1), Fraction 2 (F2), Fraction 3 (F3) และ Fraction 4 (F4) ซึ่งมีตำแหน่งของการถูกชะออกมาตรงกับสารมาตรฐาน catechin GA และ EGC, EGCG, EC, และ ECG ตามลำดับ (รูปที่ 8) จากนั้นจึงทำการเก็บรวบรวมแต่ละ Fraction (F1-F4) แล้วนำไปตรวจวิเคราะห์ยืนยันอีกครั้งด้วยวิธี analytical HPLC พบว่าในแต่ละ Fraction เหล่านั้นมีสาร catechin EGC, EGCG, EC และ EGCG ประกอบอยู่ในปริมาณ 90-95 เปอร์เซ็นต์ ในปี พ.ศ. 2005 Kumar และ Rajapaksha [74] ได้ทำการแยกสาร catechin ต่างๆ ออกจากสารสกัดหยาบชาเขียว (*Camellia sinensis* L.) จำนวน 5 ตัวอย่างด้วยวิธี High-speed counter current chromatography และนำไปตรวจความบริสุทธิ์ของสาร catechin อีกครั้งหนึ่งพบว่า ได้สาร EGCG, ECG และ EGC ที่มีความบริสุทธิ์ 91-99 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นสาร catechin EGCG และ ECG ที่เราสามารถแยกได้จากชาเขียวด้วยวิธี preparative HPLC สามารถถูกนำไปใช้ในการศึกษาคุณสมบัติด้านการจับธาตุเหล็กและด้านการออกซิเดชันได้ต่อไป



รูปที่ 8 แบบโครมาโตแกรมของสาร catechin epigallocatechin (EGC), epigallocatechin 3-gallate (EGCG), epicatechin (EC), และ epicatechin 3-gallate (ECG) ที่แยกได้เป็นส่วนต่างๆ (F1-F4) จากสารสกัดชาเขียว (ความเข้มข้น 5 กรัมเปอร์เซ็นต์) ด้วยวิธี preparative HPLC โดยใช้ยอดดาที่เก็บรวบรวมจากศูนย์ผลิตชาขุนแม่วาง อำเภอแม่วาง ศูนย์ผลิตชาดอยอ่างขาง อำเภอฝางและศูนย์ผลิตชาปางตะ อำเภอสะเมิง จังหวัดเชียงใหม่)

(วิธีการ : ฉีดสารสกัดชาเขียวจำนวน 0.5 มิลลิลิตรผ่านเข้าเครื่องมือ Preparative HPLC ที่ต่อกับคอลัมน์ Spherosorb ODS2 (ขนาดมิติ 10x250 mm, 5 μ m) ทำการชะล้างด้วยตัวทำละลายเคลื่อนที่ (methanol:H₂O = 29:71, v/v/v) ที่อัตราเร็วการไหลของตัวทำละลาย 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที เก็บลำดับส่วนสารละลายที่วิเคราะห์ได้เพื่อนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร c) เก็บรวบรวมลำดับส่วน (Fractions) สารละลาย C, EC, EGC, EGCG และ ECG ในแต่ละ peak ที่แยกได้ไปทำการตรวจซ้ำด้วยวิธี Analytical HPLC อีกครั้งหนึ่ง)

ปริมาณสารcatechinในชาเขียวผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ

ผลการตรวจวิเคราะห์สารcatechin EGC, EC, EGCG และ ECG พบว่าในใบชาสดมีปริมาณสารcatechinต่าง ๆ เหล่านี้ต่ำกว่าในใบชาที่ผ่านการอบในตู้ไมโครเวฟ (ตารางที่ 1) เป็นที่น่าสังเกตว่าใบชาที่ผ่านความร้อนโดยการอบในตู้ไมโครเวฟด้วยกำลังไฟฟ้า 800 วัตต์เป็นเวลานาน 3 นาทีที่อุณหภูมิ 100 เซลเซียสมีสารcatechinแกลเลต (ได้แก่ EGC, EGCG และ ECG) อยู่ในปริมาณสูงกว่าใบชาที่ไม่ได้อบในตู้ไมโครเวฟ ดังนั้นความร้อนที่เกิดขึ้นในตู้อบไมโครเวฟสามารถทำลายหรือหยุดยั้งการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส (polyphenol oxidase, PPO) ที่เกิดขึ้นเมื่อโครงสร้างของเซลล์ใบชาถูกทำลาย จึงทำให้สารcatechinแกลเลตต่าง ๆ เหล่านี้ไม่ถูกออกซิไดซ์ให้กลายเป็นสารตัวอื่น ๆ (ได้แก่สาร quonines, bisflavanols, theaflavins, epigallocatechin gallate และ thearubigins) ต่อไปได้ [47, 75]

ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบปริมาณสารcatechinชนิดต่าง ๆ (EGC, EC, C, EGCG และ ECG ในใบชาสด (Fresh tea leaves, n = 20) และใบชาเขียวที่ผลิตจากตู้อบไมโครเวฟ (Microwave green tea, n = 20) ND = not determined.

ชาเขียว	ปริมาณสารcatechin (มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแห้ง 1 กรัม)					
	EGC	EC	C	EGCG	ECG	TC
Fresh tea leaves	14.6±28.1	22.2±35.3	17.5±27.8	13.8±21.6	0.8±1.6	ND
Microwave green tea	32.3±38.6	27.6±41.6	8.7±10.6	47.2±40.5	5.1±6.3	ND

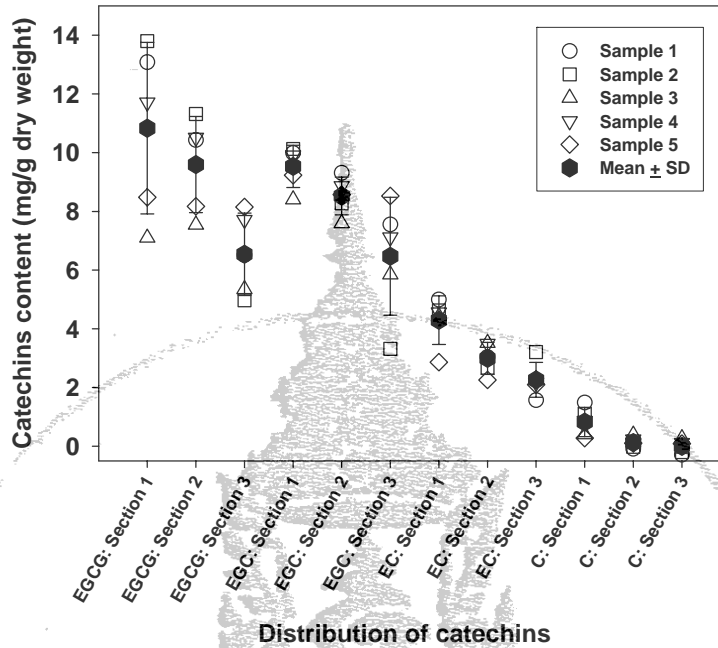
การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณสารcatechinต่าง ๆ ในใบชาเขียวทั้งสองผลิตภัณฑ์ พบว่าชาเขียวที่ผลิตโดยการอบผ่านในตู้ไมโครเวฟมีปริมาณสาร total catechin และ EGCG ใกล้เคียงกันมากกับใบชาเขียวที่วางขายในท้องตลาด และมีปริมาณของสาร EGC, EC, C และ ECG สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 2) วิธีการผลิตชาเขียวด้วยการอบในตู้ไมโครเวฟจึงเป็นวิธีการที่สะดวก รวดเร็วและมีประสิทธิภาพที่ช่วยรักษาปริมาณสารcatechin EGCG และ ECG ให้คงอยู่ได้ในที่ปริมาณสูง ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาของ Gulata และคณะ [76] อีกทั้งยังใช้ต้นทุนในการผลิตต่ำกว่าโดยไม่ต้องใช้เครื่องจักรกลราคาแพงมาก ใช้เวลาในการผลิตเพียง 3 นาทีเมื่อเทียบกับวิธีการสากที่ใช้อยู่ในปัจจุบันซึ่งต้องใช้เวลา 2-3 วัน อีกทั้งยังมีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้เป็นอุตสาหกรรมครัวเรือนและชุมชนในการผลิตชาเขียวที่มีอุดมด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและมีคุณค่าทางเภสัชวิทยาหลายอย่าง [3, 49, 77-79] การศึกษาระดับสารcatechinรวม (TC) ในชาพบว่ามียู่อประมาณ 102-418 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ตรวจไม่พบในกาแฟและเบียร์ [80] ผลการศึกษาปริมาณสารcatechinในชาถุงและใบชาที่มีขายตามท้องตลาดในประเทศสหราชอาณาจักรพบว่ามีค่า 5.6-47.5, 51.5-84.3 และ 8.5-13.9 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแห้ง 1 กรัมของชาดำ ชาเขียวและชาผลไม้ตามลำดับ ความเข้มข้นของสารcatechinต่าง ๆ ในใบชาเป็นดังนี้ EGCG>ECG>EC>EGC>C [81]

ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบปริมาณสาร catechin ทั้งหมด (TC) และชนิดต่างๆ (EGC, EC, C, EGCG และ ECG) ในชาเขียวที่วางขายตามท้องตลาด (commercial green tea, n = 5) และที่ผลิตจากตู้อบไมโครเวฟ (microwave-processed green tea, n = 5) และ $p < 0.05$

ชาเขียว	ปริมาณสาร catechin (มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแห้ง 1 กรัม)					
	EGC	EC	C	EGCG	ECG	TC
commercial green tea	36.8±0.4	46.9±0.1	2.0±0.1	133.9±1.5	5.2±0.2	235±2
microwave-processed green tea	43.4±0.4	47.3±0.2	4.1±0.1	136.9±2.4	6.7±0.7	239±4

ปริมาณสาร catechin ในใบชาสดที่ตำแหน่งต่างกันบนต้นชา

ตามปกติจะนิยมเก็บยอดใบชาเขียว 3 ยอดแรกเพื่อนำมาใช้ผลิตชาสำเร็จรูปต่างๆ โดยเชื่อว่าปริมาณสาร catechin อยู่ในปริมาณที่สูงเมื่อเทียบกับส่วนหรือบริเวณอื่นๆ อย่างไรก็ตามมีการตั้งข้อสงสัยเกี่ยวกับปริมาณสาร catechin (โดยเฉพาะอย่างยิ่ง EGCG และ ECG) ในใบชาที่อยู่ในบริเวณอื่นๆ ถัดลงมา ผลการศึกษาครั้งนี้พบว่าใบชาส่วนปลายยอดยังคงมีปริมาณสาร EGCG, EGC, EC และ C (10.8±2.8, 9.5±0.7, 4.3±0.8 และ 0.8±0.5 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ) สูงกว่าใบชาตำแหน่งถัดลงมา 10 เซนติเมตร (9.6±1.6, 8.5±0.6, 3.0±0.5 และ 0.1±0.2 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ) และใบชาตำแหน่งถัดลงมา 20 เซนติเมตร (6.5±1.4, 6.5±2.0, 2.3±0.6 และ 0.00±0.23 มิลลิกรัมต่อกรัมตามลำดับ) (รูปที่ 9) ซึ่งอาจอธิบายได้ว่าบริเวณปลายยอดใบชา มีการแบ่งตัวของเซลล์และการเจริญเติบโต รวมทั้งมีการสังเคราะห์สารต่างๆ (โดยเฉพาะอย่างยิ่งสาร EGCG) ในอัตราที่สูงกว่า งานวิจัยของ Sakata และคณะ [72] ที่ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณสาร catechin ในส่วนต่างๆ ของต้นชา (*Camellia sinensis* L.) ซึ่งพบว่าใบชาแรกมีปริมาณสาร EGCG สูงที่สุดและปริมาณสาร EGCG ลดลงตาม



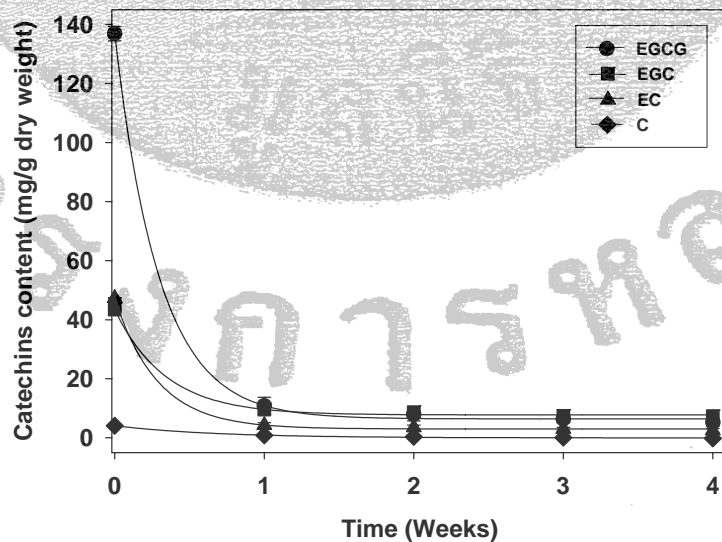
รูปที่ 9 ปริมาณสาร catechin EGCG, EGC, EC และ C ที่วิเคราะห์ได้ในใบชา (พันธุ์หยวนจื่อฮูลง จากศูนย์ผลิตชาปางตะ อำเภอสะเมิง จังหวัดเชียงใหม่) จากตัวอย่างชา 5 ต้น โดยกำหนดตำแหน่งปลายยอดชา (Section 1) ห่างจากปลายยอดชา 10 เซนติเมตร (Section 2) และห่างจากปลายยอดชา 20 เซนติเมตร (Section 3) ข้อมูลแสดงในรูปการกระจายตัว (สัญลักษณ์เปิด) และค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (สัญลักษณ์ปิด)

ความแก่ของใบชา นอกจากนี้ยังตรวจพบสารอนุพันธ์ O-methylated EGCG อีก 3 ชนิดซึ่งได้แก่ (-)-epigallocatechin-3-O-(3-O-methyl)gallate, (-)-epigallocatechin-3-O-(4-O-methyl)gallate และ (-)-4'-methyl epigallocatechin-3-O-(4-O-methyl)gallate ในใบชาที่เก็บมาจากต้นชาสายพันธุ์ ฤดูกาล อายุใบ และบริเวณปลูกแตกต่างกัน โดยพบปริมาณสารอนุพันธ์เหล่านี้ในช่วงฤดูใบไม้ร่วงและฤดูหนาวสูงกว่าในช่วงฤดูใบไม้ผลิและฤดูหนาว ใบชาอ่อนมีปริมาณสารอนุพันธ์เหล่านี้สูงกว่าใบแก่ [82] การศึกษาในประเทศออสเตรเลียเกี่ยวกับผลความแตกต่างด้านฤดูกาลกับปริมาณสาร catechin หลักในใบชาสดพบว่าสาร EGCG และ EGC ในยอดใบชาสดที่เก็บในช่วงอากาศอบอุ่นคือเดือนเมษายน (เท่ากับ 120.5 มิลลิกรัมต่อกรัมและ 34.5 มิลลิกรัมต่อกรัมตามลำดับ) และเดือนพฤษภาคม (เท่ากับ 128.6 มิลลิกรัมต่อกรัมและ 44.3 มิลลิกรัมต่อกรัมตามลำดับ) มีระดับสูงกว่าในยอดใบชาสดที่เก็บในช่วงอากาศเย็นคือเดือนกรกฎาคม (เท่ากับ 91.4 มิลลิกรัมต่อกรัมและ 35.2 มิลลิกรัมต่อกรัมตามลำดับ) เดือนสิงหาคม (เท่ากับ 91.3 มิลลิกรัมต่อกรัมและ 31.5 มิลลิกรัมต่อกรัมตามลำดับ) และเดือนกันยายน (เท่ากับ 96.1 มิลลิกรัมต่อกรัมและ 33.5 มิลลิกรัมต่อกรัมตามลำดับ) [83] ซึ่งการศึกษานี้ยังได้แสดงถึงว่าสาร EGCG และ EGC น่าจะถูกใช้เป็นสารแสดงคุณภาพใบชา รวมทั้งอัตราส่วนสาร

(EGCG+ECG)/สาร EGC น่าจะเป็นตัวชี้วัดคุณภาพใบชาที่เก็บเกี่ยวข้ามฤดูกาลด้วย อย่างไรก็ตาม การศึกษาของ Lin และคณะ [84] แสดงให้เห็นว่าระดับสาร EGCG และ TC ที่วิเคราะห์ได้ในใบชา เป็นลำดับดังนี้ ชาเขียว(ใบแก่)>ชาเขียว (ใบอ่อน) และชาอู่หลง>ชาดำ ใบชาที่ถูกสกัดด้วย เอทานอลความเข้มข้น 75 เปอร์เซ็นต์สามารถให้สาร EGCG และ TC ในปริมาณที่สูงกว่าใบชาที่ถูกสกัดด้วยน้ำร้อน

เสถียรภาพของสาร catechins ต่าง ๆ ในสารสกัดชาเขียว

แม้ว่าสาร EGCG ในใบชามีคุณสมบัติทำลายอนุมูลอิสระได้อย่างมีประสิทธิภาพ สารนี้ก็สามารถถูกออกซิไดซ์เอง (auto-oxidation) หรือโดยเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส (polyphenol oxidase catalysis) ที่มีอยู่ในใบชาซึ่งอาจมีผลทำให้ฤทธิ์ทางชีวภาพและทางเภสัชวิทยาของชาเขียวลดลง ผลการศึกษาเสถียรภาพของสาร catechins ในสารสกัดชาเขียวครั้งนี้ (รูปที่ 10) แสดงว่าปริมาณสาร EGCG ในสารสกัดชาเขียวลดลงอย่างรวดเร็ว (จาก 136.9 ± 2.4 มิลลิกรัมต่อกรัม เป็น 10.8 ± 2.9 มิลลิกรัมต่อกรัม) ภายในเวลา 1 สัปดาห์แม้ว่าได้ทำการเก็บแช่เย็นไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ส่วนปริมาณสาร EGC และ EC ก็ลดลงเช่นเดียวกัน (จาก 43.4 ± 0.4 มิลลิกรัมต่อกรัม เป็น 9.5 ± 0.7 มิลลิกรัมต่อกรัม และจาก 47.3 ± 0.2 มิลลิกรัมต่อกรัม เป็น 4.3 ± 0.8 มิลลิกรัมต่อกรัม) และสาร catechins เหล่านี้ก็จะมีความคงตัวหรือไวต่อการถูกทำลายเมื่ออยู่ในรูปที่เป็นสารละลาย



รูปที่ 10 ปริมาณสาร catechins EGCG, EGC, EC และ C ในสารสกัดชาเขียว 5 ตัวอย่างซึ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 28 วัน ข้อมูลที่ได้แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางที่ 3 ปริมาณสารเคเตชินต่างๆ (EGC, EC, C, EGCG และ ECG) และปริมาณสารเคเตชินรวมทั้งหมด (TC) ที่ตรวจวัดได้ในผลิตภัณฑ์ชาเขียว (GT) ซึ่งวางขายในท้องตลาดจำนวน 14 ตัวอย่าง

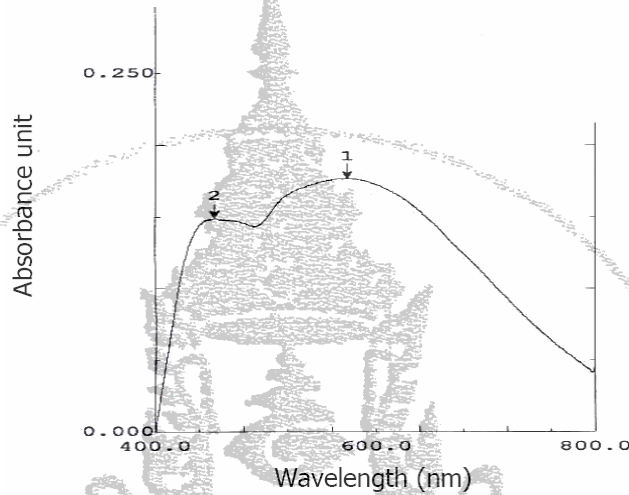
ตัวอย่างชาเขียว	ปริมาณสารเคเตชิน (มิลลิโมลาร์)					
	EGC	EC	C	EGCG	ECG	Total
GT1	0.00	1.77	0.00	0.00	0.43	2.42
GT2	0.00	1.39	0.00	0.00	0.00	1.75
GT3	0.00	0.76	0.00	0.15	0.00	1.07
GT4	0.00	0.95	0.00	0.14	0.00	1.38
GT5	0.00	1.34	0.00	0.00	0.00	1.64
GT6	0.00	0.98	0.00	0.00	0.00	1.35
GT7	0.00	1.30	0.00	0.00	0.00	1.52
GT8	0.01	1.18	0.00	0.27	0.00	1.63
GT9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
GT10	0.00	1.55	0.00	0.18	0.00	2.03
GT11	0.00	0.69	0.00	0.00	0.00	0.72
GT12	0.04	0.77	0.57	0.36	0.00	1.92
GT13	0.02	1.83	0.20	0.08	0.00	2.28
GT14	0.01	2.11	0.00	0.08	0.00	2.46

ผลการทดลองในตารางที่ 3 สนับสนุนแนวคิดเกี่ยวกับความไม่มีเสถียรภาพของสารเคเตชิน (โดยเฉพาะอย่างยิ่งสาร EGCG) ในสารสกัดชาหรือในเครื่องดื่มชาที่เก็บแช่เย็นไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาโดยพบว่ามีปริมาณสารเคเตชินต่างๆเหลืออยู่น้อยมากหรือตรวจไม่พบเลย งานวิจัยของ Manning และ Roberts [85] ที่ได้ทำการตรวจเช็คปริมาณสารเคเตชินในผลิตภัณฑ์ชาเขียวที่วางขายตามท้องตลาดพบว่ามีค่าเพียง 9-48 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณที่ระบุไว้บนฉลากของผลิตภัณฑ์ซึ่งเป็นค่าต่ำกว่าปริมาณที่ระบุไว้อย่างมีนัยสำคัญ (ค่า $p < 0.05$) และอาจแสดงถึงปัญหาด้านการควบคุมคุณภาพของอาหารเสริมและสมุนไพรแก่ผู้บริโภค สารเคเตชินในชาเขียวมีเสถียรภาพนานถึง 9 สัปดาห์ถ้าเก็บแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สาร EGCG และ ECG ไวต่อการถูกทำลายได้ง่ายกว่าสาร ECG และ EC [45] สารเคเตชินมีเสถียรภาพไม่ดีในสารละลายที่มีค่าพีเอชเป็นกลางหรือเบส [86] การศึกษาของ Chen และคณะ [11] ชี้ให้เห็นว่าสารเคเตชินในใบชามีเสถียรภาพในน้ำที่อุณหภูมิห้อง การต้มในน้ำที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส นาน 7 ชั่วโมงสามารถทำลายสารเคเตชินในใบชาได้ 20 เปอร์เซ็นต์ การนึ่งที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส นาน 20 นาทีสามารถทำให้สาร EGCG เกิดการ epimerization เปลี่ยนไปเป็นสาร gallocatechin gallate (GCG) รวมทั้งสารเคเตชินมีเสถียรภาพดีในสารละลายน้ำที่ค่าพีเอชต่ำๆ

[11] จึงต้องควรคำนึงถึงเสถียรภาพของสารคะเตชินในผลิตภัณฑ์ชาเขียวแห้ง ชาเขียวบรรจุกระป๋องและชาเขียวบรรจุขวดที่เก็บไว้เป็นเวลานาน ๆ ด้วย

4.2 การตรวจวัดความสามารถในการดั่งธาตุเหล็กในสารละลาย

การศึกษาสเปกตรัมของสารประกอบเชิงซ้อน



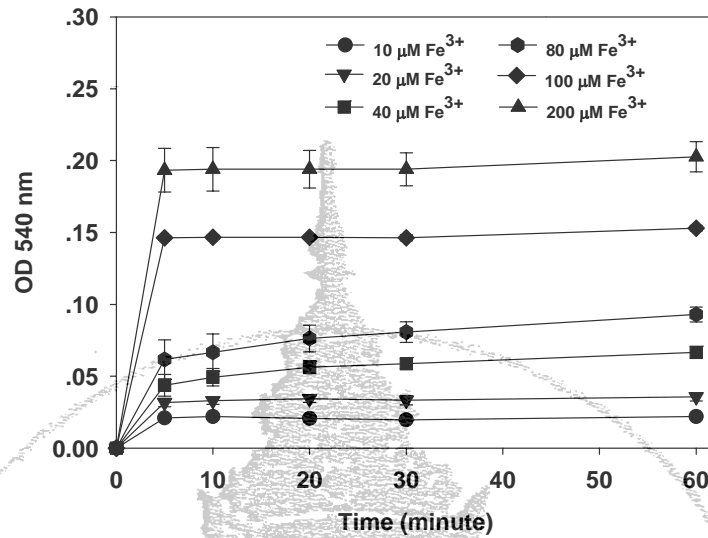
รูปที่ 11 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารประกอบเชิงซ้อน Fe^{3+} -green tea ที่ช่วงความยาวคลื่น 400-800 นาโนเมตร

(วิธีการ : เดิมสารสกัดชาเขียว (Microwave green tea) ความเข้มข้น 15 กรัมเปอร์เซ็นต์ลงไปนสารละลายธาตุเหล็กรูปเฟอร์ริกไนไตรโดรอะซิเตท (Fe^{3+}) ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ตั้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง แล้วนำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นระหว่าง 400-800 นาโนเมตร)

สารสกัดชาเขียวสามารถจับกับธาตุเหล็กรูปไอออนเฟอร์ริกแล้วเกิดสารประกอบเชิงซ้อน (Fe^{3+} -catechin) ที่มีคุณสมบัติดูดกลืนแสงสูงสุดที่ค่าความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร (major peak) และรองลงมาที่ค่าความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร (minor peak) (รูปที่ 11) โดยสารออกฤทธิ์ที่มีอยู่ในสารสกัดชาเขียวนั้นน่าจะเป็นสารคะเตชินที่โมเลกุลมีหมู่ไดออล (หรือหมู่ไดไฮดรอกซิล) เรียกว่าคะเตโกลเลต (catechol) ซึ่งอาจจะเป็นสาร EGCG, EGC หรือ ECG ก็ได้ ผลการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสารโพลีฟีนอลในชาเขียวและชาดำสามารถจับกับธาตุเหล็กและลดการดูดซึมธาตุเหล็กได้ [15, 87] การศึกษาด้วยวิธีโครมาโตกราฟีและอิเล็กโตรโฟเรซิสแสดงถึงปฏิกิริยาระหว่างธาตุเหล็กกับส่วน Fractions ต่าง ๆ ของสารสกัดโพลีฟีนอลธรรมชาติ [88]

ผลของเวลาในการเกิดปฏิกิริยา

สารสกัดชาเขียวมีความสามารถจับกับธาตุเหล็กรูปเฟอร์ริกอย่างรวดเร็วภายในระยะเวลา 5 นาทีในลักษณะที่เป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณธาตุเหล็ก (dose response) ได้สารประกอบเชิงซ้อนดังกล่าวขึ้นมา (รูปที่ 12) ซึ่งมีความคงตัวอย่างน้อย 1 ชั่วโมง

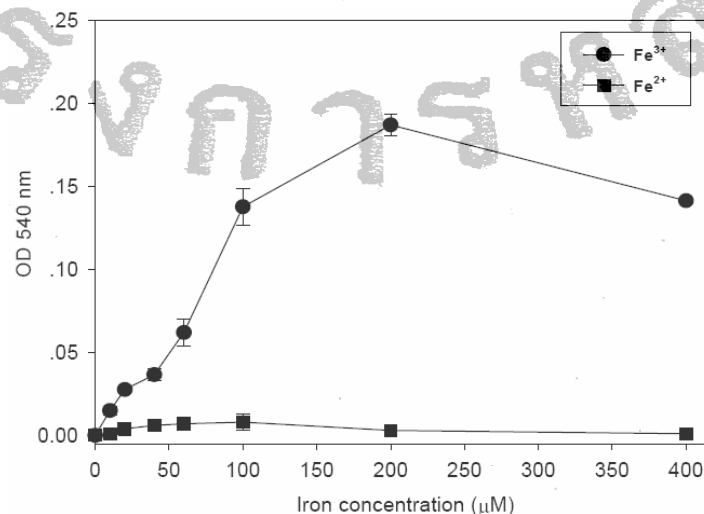


รูปที่ 12 ผลของระยะเวลาในการจับไอออนธาตุเหล็กรูปเฟอร์ริก (ความเข้มข้น 0-200 ไมโครโมลาร์) โดยสารสกัดชาเขียว (ความเข้มข้น 15 กรัมเปอร์เซ็นต์) ผลข้อมูลที่ได้จากการทำ triplicate experiments แสดงในรูป mean \pm SEM

(วิธีการ : เดิมสารสกัดชาเขียว (Microwave green tea) ความเข้มข้น 15 กรัมเปอร์เซ็นต์ลงไปนึ่งในสารละลายธาตุเหล็กรูปเฟอร์ริกไนโตรโลไดรอะซิเตท (Fe³⁺) ความเข้มข้น 0-200 ไมโครโมลาร์ ตั้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องนาน 0-60 นาที แล้วนำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร)

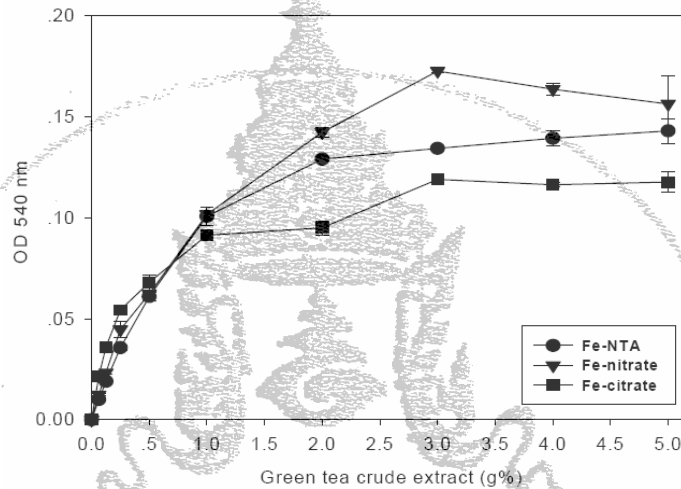
ผลของความเข้มข้นสารในการเกิดปฏิกิริยา

สารตะเตชินในสารสกัดชาเขียวจับกับธาตุเหล็กที่จำเพาะกับธาตุเหล็กรูปไอออนเฟอร์ริก มากกว่ารูปเฟอร์รัส และสามารถเห็นลักษณะการจับกับไอออนเฟอร์รัสที่อิ่มตัว (saturation region) เมื่อใช้สารละลายธาตุเหล็กที่มีความเข้มข้นเกิน 200 ไมโครโมลาร์ จะเห็นว่าสารสกัดชาเขียวไม่มีความสามารถจับไอออนเฟอร์รัสได้ (รูปที่ 13) สารสกัดชาเขียวจับกับไอออนเฟอร์ริก



รูปที่ 13 ความสามารถของสารสกัดชาเขียว (ความเข้มข้น 15 กรัมเปอร์เซ็นต์) ในการจับไอออนธาตุเหล็กรูปเฟอร์รัส (Fe^{2+}) และรูปเฟอร์ริก (Fe^{3+}) (ความเข้มข้น 0-400 ไมโครโมลาร์) ผลข้อมูลที่ได้จากการทำ triplicate experiments แสดงในรูป mean \pm SEM

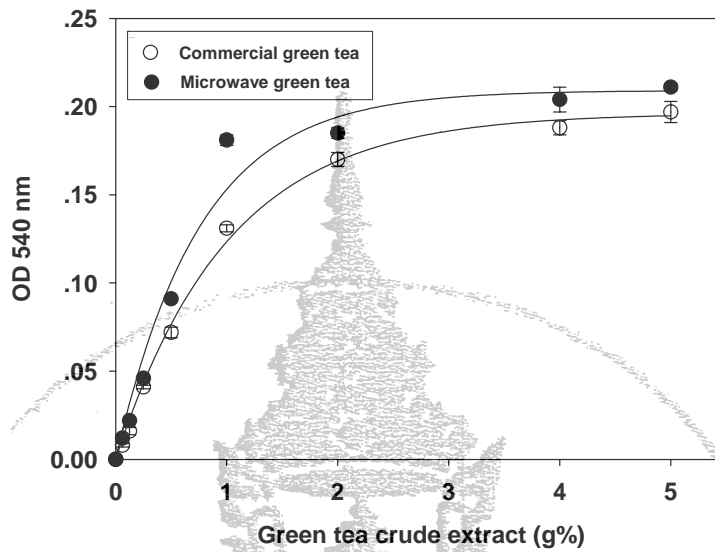
(วิธีการ : เติมสารสกัดชาเขียว (Microwave green tea) ความเข้มข้น 15 กรัมเปอร์เซ็นต์ลงในสารละลายธาตุเหล็กรูปเฟอร์ริกไนโตรโลไตรอะซิเตท (Fe^{3+}) และรูปแอมโมเนียมเฟอร์รัสซัลเฟต (Fe^{2+}) ความเข้มข้น 0-400 ไมโครโมลาร์ ตั้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง แล้วนำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร)



รูปที่ 14 ผลความเข้มข้นของสารสกัดชาเขียว (0-5 กรัมเปอร์เซ็นต์) ต่อการจับสารละลายธาตุเหล็ก (Fe-NTA, Fe-nitrate และ Fe-citrate) (ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์) ผลข้อมูลที่ได้จากการทำ triplicate experiments แสดงในรูป mean \pm SEM

(วิธีการ : เติมสารสกัดชาเขียว (Microwave green tea) ความเข้มข้น 0-5 กรัมเปอร์เซ็นต์ลงในสารละลายธาตุเหล็กรูปเฟอร์ริกไนโตรโลไตรอะซิเตท (Fe-NTA), เฟอร์ริไนเตรท (Fe-nitrate) และเฟอร์ริกซิเตรท (Fe-citrate) ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ตั้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง นำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร) แบบต่างๆ (ferric nitrate, ferric citrate และ ferric nitrilotriacetate) ได้ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้นของสารสกัดชาเขียวอีกด้วย และสามารถเห็นบริเวณอิมิตัวของการจับที่ความเข้มข้นของสารสกัดชาเขียวมากกว่า 3 กรัมเปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 14) อย่างไรก็ตามสารสกัดชาเขียวมีความสามารถจับไอออนเฟอร์ริกได้ตามลำดับดังนี้ ferric nitrate > ferric nitrilotriacetate > ferric citrate อันเป็นผลมาจากค่า binding affinity (K_a) ของไอออนซิเตรท ($K_a = 10^{24}$) และไอออนไนโตรโลไตรอะซิเตท ($K_a = 10^{15}$) ที่แตกต่างกัน จึงทำให้สารคะเคซินในสารสกัดชาเขียวเข้าถึงไอออนเฟอร์ริกได้ง่ายและยากต่างกัน

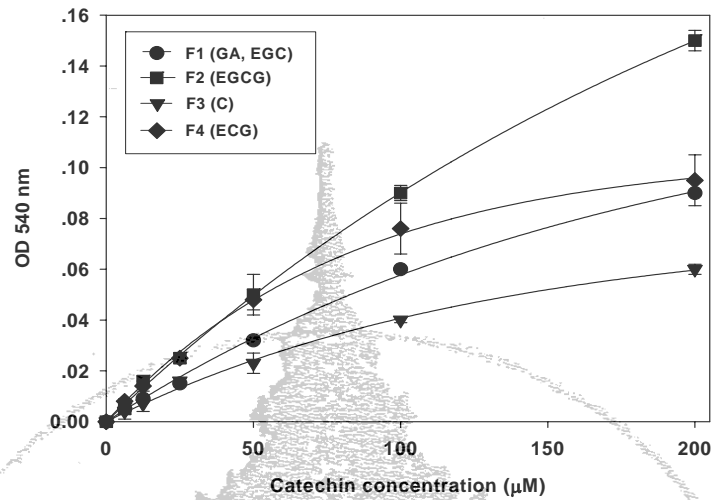
การเปรียบเทียบความสามารถของสารสกัดเตรียมจากชาเขียวที่วางขายตามท้องตลาด (commercial green tea) และจากชาเขียวที่ผ่านการอบแห้งจากตู้อไมโครเวฟ (microwave green tea) ในปริมาณความเข้มข้นที่เท่ากันในการจับธาตุเหล็กรูปไอออนเฟอร์ริก แสดงให้เห็นว่าชาเขียวผลิตจากตู้อไมโครเวฟมีศักยภาพสูงกว่าชาเขียวที่วางขายตามท้องตลาด โดยชาเขียวทั้งสองชนิดนี้ยังคงมีคุณสมบัติจับเหล็กได้ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้นของสารสกัดชา (0-2 กรัมเปอร์เซ็นต์) และมีความอิมิตัวในการจับที่ความเข้มข้นของสารสกัดชาไม่เกิน 2 กรัมเปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 15)



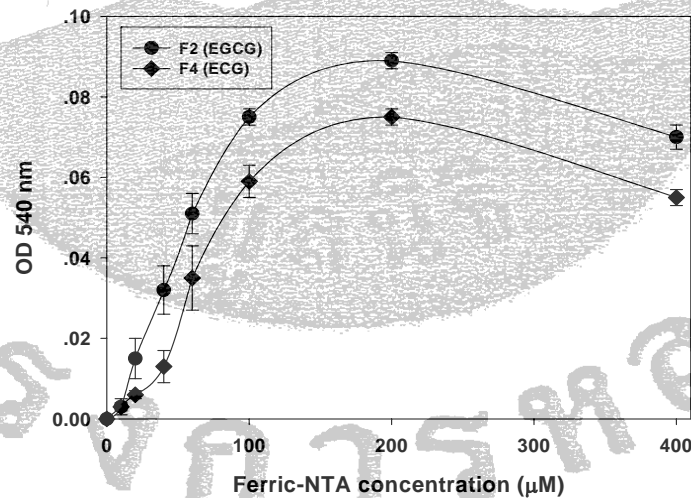
รูปที่ 15 ประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ชาเขียว (ความเข้มข้น 0-5 กรัมเปอร์เซ็นต์) ที่ขายในท้องตลาด (commercial green tea) และผลิตจากตูบไมโครเวฟ (microwave green tea) ในการจับสารละลายธาตุเหล็ก Fe-NTA (ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์) ผลข้อมูลที่ได้จากการทำ triplicate experiments แสดงในรูป mean \pm SEM

(วิธีการ : เติมสารสกัดชาเขียว (Commercial green tea และ Microwave green tea) ความเข้มข้น 0-5 กรัมเปอร์เซ็นต์ลงไปในการละลายเฟอร์ริกไนโตรโลไตรอะซิเตท (ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์) ตั้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง แล้วนำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร)

เมื่อพิจารณาความสามารถในการจับกับธาตุเหล็กของสารเคเตชินต่างๆ (EGC, EGCG, C และ ECG) ที่แยกออกเป็นลำดับส่วนต่างๆ (F1, F2, F3 และ F4 ตามลำดับ) ที่ความเข้มข้นเทียบเท่ากัน พบว่าสาร EGCG มีความสามารถสูงสุด รองลงมาคือสาร ECG, EGC และ C ตามลำดับ ลักษณะในการจับธาตุเหล็กยังคงขึ้นกับความเข้มข้นของสารเคเตชินและเริ่มเห็นการอิ่มตัวเมื่อใช้สารเคเตชินปริมาณมากกว่า 200 ไมโครโมลาร์ (รูปที่ 16 และรูปที่ 17)



รูปที่ 16 การจับไอออนธาตุเหล็กกับเฟอรริก (ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์) โดยสาร catechin ต่างๆ (GA, EGC, EGCG, C และ ECG) (ความเข้มข้น 0-200 ไมโครโมลาร์) ที่แยกได้จาก สารสกัดชาเขียว (F1-F4) ผลข้อมูลจาก triplicate experiments แสดงในรูป mean \pm SEM (วิธีการ : เติมน้ำ EGCG, EGCG, C และ ECG (ความเข้มข้น 0-200 ไมโครโมลาร์) ที่แยกจากสารสกัดชาเขียวลงใน สารละลายเฟอรริกไนโตรโลไนโตรอะซิเตท (ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์) ตั้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง แล้วนำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร)



รูปที่ 17 ความสามารถของสาร EGCG (ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์) ในส่วนแยก F2 และ ECG (ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์) ใน F4 จากสารสกัดชาเขียวในการจับกับสารละลายเฟอรริกไนโตรโลไนโตรอะซิเตท (ความเข้มข้น 0-400 ไมโครโมลาร์) ผลข้อมูลจาก triplicate experiments แสดงในรูป mean \pm SEM

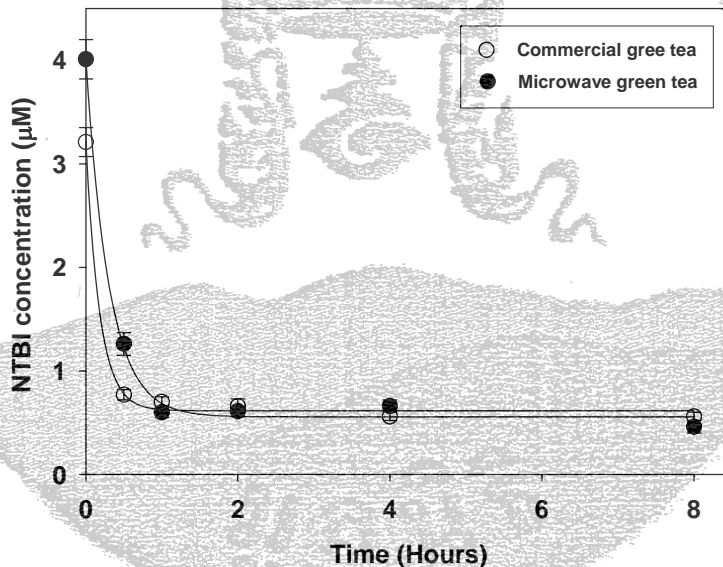
(วิธีการ : เติมน้ำ EGCG และ ECG ที่แยกจากสารสกัดชาเขียวลงในสารละลายเฟอรริกไนโตรโลไนโตรอะซิเตท (ความเข้มข้น 0-400 ไมโครโมลาร์) ตั้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง นำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร)

Mandel และคณะ [89, 90] ได้อธิบายการทำหน้าที่สาร catechin ต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง สาร EGCG ในสารสกัดชาเขียวที่สามารถผ่านเข้าไปในเซลล์สมองได้และมีฤทธิ์จับเหล็กและยับยั้ง

การเกิดอนุมูลอิสระ ทำให้สามารถช่วยป้องกันภาวะออกซิเดทีฟสเตรสในเซลล์ประสาทของผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ โรคพาคินสันและโรคฮันติงตันได้ งานวิจัยของ Hayakawa และคณะแสดงให้เห็นว่าหมู่แกโลลิลในโมเลกุลสาร EGCG สามารถจับกับไอออนโลหะ Cu^{2+} และ Fe^{2+} ได้ [91]

ดังนั้นจึงสามารถกล่าวได้ว่าสารคะเตชินที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดชาเขียวและที่แยกออกเป็นลำดับส่วนมีบทบาทสำคัญในการจับกับธาตุเหล็กโดยอาศัยหมู่แกโลลิล (galloyl group) ในโมเลกุล EGCG, ECG และ EGC เป็นหมู่ฟังก์ชันหลัก สาร C ไม่มีหมู่แกโลลิลประกอบในโมเลกุล ดังนั้นจึงมีประสิทธิภาพต่ำสุดในการจับกับธาตุเหล็ก

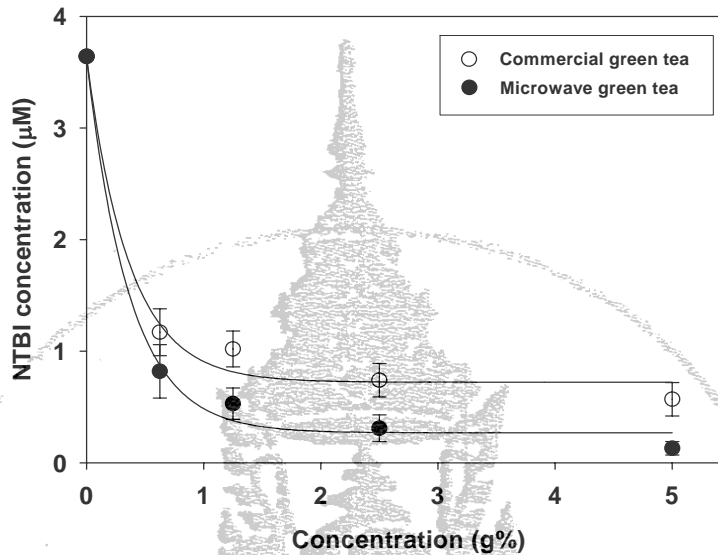
4.3 การตรวจวัดความสามารถในการดึงธาตุเหล็กในพลาสมาของผู้ป่วยอัลสซีเมีย ผลของสารสกัดชาเขียวในการลดปริมาณ NTBI



รูปที่ 18 ความสามารถของสารสกัดชาเขียว 2 ตัวอย่าง (commercial green tea และ microwave green tea) (ความเข้มข้น 5 กรัมเปอร์เซ็นต์) ในการลดปริมาณธาตุเหล็กกลุ่ม NTBI ในพลาสมาของผู้ป่วยอัลสซีเมีย ($n = 10$) ที่ช่วงเวลา 0-8 ชั่วโมง ผลข้อมูลที่ได้แสดงในรูป mean \pm SEM (วิธีการ : เติมสารสกัดชาเขียว (Commercial green tea และ Microwave green tea) ลงในพลาสมาจากผู้ป่วยอัลสซีเมีย ตั้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องนาน 0-8 ชั่วโมง นำไปตรวจวัดปริมาณ NTBI ที่เหลืออยู่ในพลาสมาด้วยวิธี NTA chelation/HPLC)

ผลการทดลองในรูปที่ 18 แสดงให้เห็นว่าสารสกัดชาเขียว commercial green tea และ microwave green tea สามารถลดปริมาณธาตุเหล็กกลุ่ม non-transferrin bound iron (NTBI) ในซีรัมของผู้ป่วยอัลสซีเมียได้อย่างรวดเร็วภายในเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นระดับ NTBI ไม่เปลี่ยนแปลงหรือลดลงต่อไปอีกแม้ว่าจะใช้เวลานานถึง 8 ชั่วโมง เป็นที่น่าสังเกตว่าสารสกัดชาเขียวไม่สามารถกำจัด NTBI ได้อย่างสมบูรณ์ สารสกัดชาเขียวความเข้มข้น 0-1.25 กรัมเปอร์เซ็นต์สามารถกำจัด NTBI ได้ในลักษณะที่ขึ้นอยู่กับความเข้มข้น การเพิ่มปริมาณสารสกัดชาเขียวเกินกว่า 2.5 กรัมเปอร์เซ็นต์ก็ไม่สามารถกำจัด NTBI ให้หมดสิ้นสมบูรณ์ได้เช่นกัน (รูปที่

19) จึงอาจจะอธิบายได้ว่า NTBI ในพลาสมา มีอยู่หลายรูปแบบ ซึ่งมีอยู่รูปแบบหนึ่งที่ยาขับเหล็กสามารถเข้าไปกำจัดได้เรียกว่า desferrioxamine-chelatable iron (DCI) [31]

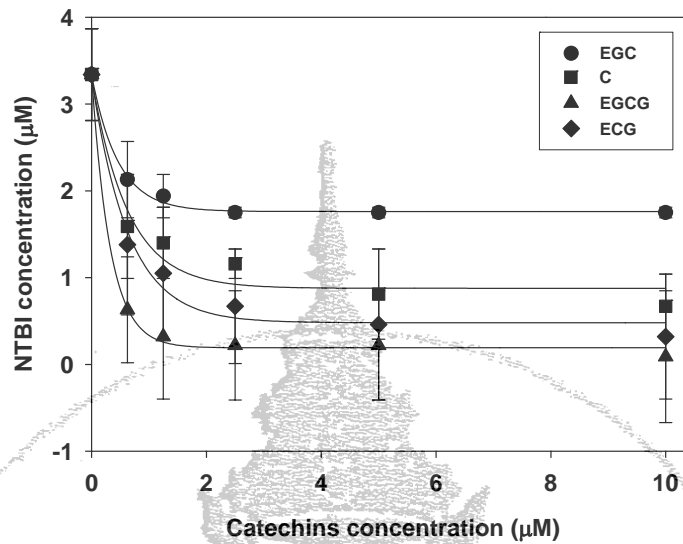


รูปที่ 19 ความสามารถของสารสกัดชาเขียว 2 ตัวอย่าง (commercial green tea และ microwave green tea) (ความเข้มข้น 0-5 กรัมเปอร์เซ็นต์) ในการลดปริมาณธาตุเหล็กกลุ่ม NTBI ในพลาสมาของผู้ป่วยธาลัสซีเมีย (n = 10) เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง ผลข้อมูลที่ได้แสดงในรูป mean \pm SD

(วิธีการ : เติมสารสกัดชาเขียวลงในพลาสมาจากผู้ป่วยธาลัสซีเมีย ตั้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง แล้วนำไปตรวจวัดปริมาณ NTBI ที่เหลืออยู่ในพลาสมาด้วยวิธี NTA chelation/HPLC)

ผลของสารคะเตชินในการลดปริมาณ NTBI

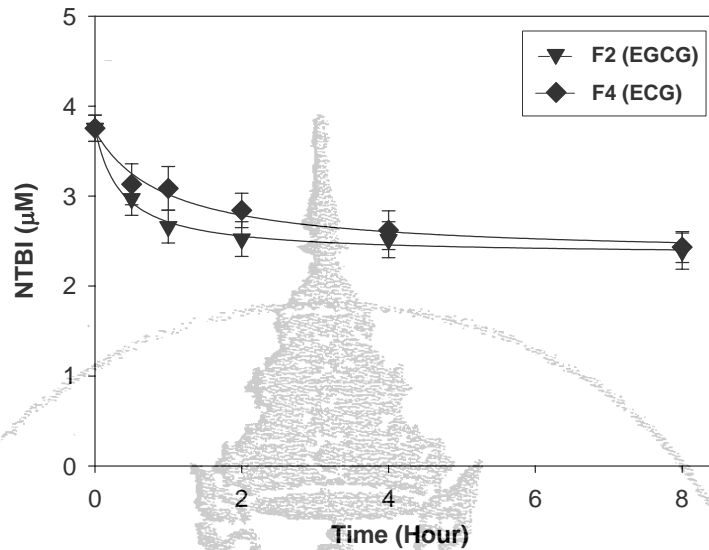
สารคะเตชิน EGC, EGCG, C และ ECG ที่แยกจากชาเขียวสามารถลดระดับ NTBI ในซีรัมของผู้ป่วยธาลัสซีเมียได้ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้น (ระหว่าง 0-1.25 มิลลิโมลาร์) และในสัดส่วนที่แตกต่างกันโดยพบว่าสาร EGCG มีความสามารถมากที่สุด รองลงมาคือสาร ECG ส่วนสาร C มีฤทธิ์น้อยที่สุด การใช้สารคะเตชินปริมาณมากกว่า 2.5 ไมโครโมลาร์ก็ไม่สามารถกำจัด NTBI ให้มีระดับกว่านี้ได้อีกแล้ว (รูปที่ 20) เป็นที่น่าสังเกตว่าสาร EGCG สามารถกำจัด NTBI ได้เกือบสมบูรณ์เมื่อเทียบกับสารคะเตชินตัวอื่นๆ และกับสารสกัดชาเขียว (รูปที่ 19)



รูปที่ 20 ความสามารถของสาร catechins EGC, C, EGCG และ ECG (ความเข้มข้น 0-10 ไมโครโมลาร์) ที่แยกจากสารสกัดชาเขียวในการลดปริมาณธาตุเหล็กรูป NTBI ในพลาสมาของผู้ป่วยธาลัสซีเมีย (pooled thalassemic plasmas) ที่ช่วงเวลา 1 ชั่วโมง ผลข้อมูลที่แสดงในรูป mean \pm SEM จากการทดลองจำนวน 5 ครั้ง

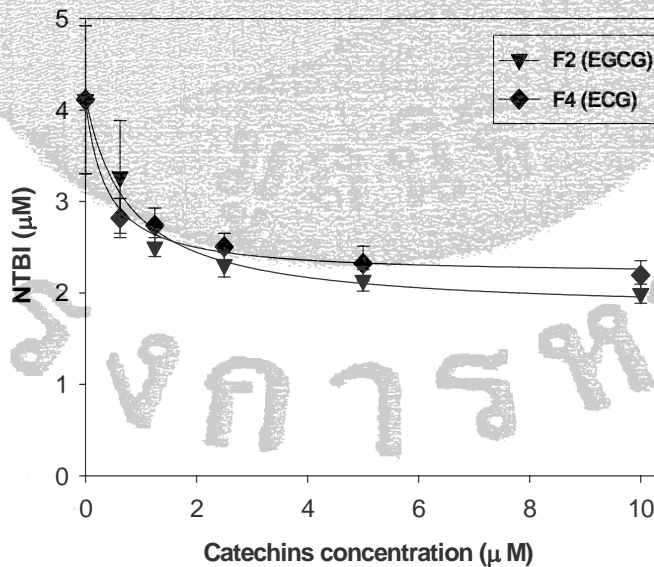
(วิธีการ : เติมน้ำ catechins EGC, C, EGCG และ ECG ลงในพลาสมาจากผู้ป่วยธาลัสซีเมีย ตั้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง แล้วนำไปตรวจวัดปริมาณ NTBI ที่เหลืออยู่ในพลาสมาด้วยวิธี NTA chelation/HPLC)

สาร EGCG และ ECG ซึ่งมีหมู่แก๊กลีโอลเป็นส่วนประกอบในโมเลกุลมีความสามารถลดปริมาณ NTBI ได้อย่างมีประสิทธิภาพดีกว่าสาร EGC และ C อย่างไรก็ตามเมื่อทำการเปรียบเทียบสัมฤทธิ์ผลของสาร EGCG และ ECG (ความเข้มข้น 2.5 ไมโครโมลาร์) ในการกำจัด NTBI พบว่าสาร EGCG มีความประสิทธิภาพที่ดีกว่าและสามารถลด NTBI ได้ในอัตราที่เร็วกว่าสาร ECG โดยจะลดปริมาณ NTBI ลงไปเรื่อยๆภายในช่วงเวลา 0-2 ชั่วโมง หลังจากนั้นระดับ NTBI จะไม่ลดลงอีกต่อไปจนหมดสิ้นสมบูรณ์ภายในระยะเวลา 8 ชั่วโมง (รูปที่ 21) สาร EGCG และ ECG สามารถกำจัด NTBI ได้ในลักษณะที่ขึ้นกับปริมาณสาร (0-2.5 ไมโครโมลาร์) ที่ใช้ด้วย อย่างไรก็ตามสาร EGCG ยังคงมีความสามารถลดระดับ NTBI ต่อไปได้อีกเมื่อทำการเพิ่มปริมาณสารไปจนถึง 10 ไมโครโมลาร์ (รูปที่ 22)



รูปที่ 21 ความสามารถของสาร EGCG และ ECG (ความเข้มข้น 2.5 ไมโครโมลาร์) ที่แยกจากสารสกัดชาเขียวในการลดปริมาณธาตุเหล็กรูป NTBI ในพลาสมาของผู้ป่วยธาลัสซีเมีย (n = 10) ที่ช่วงเวลา 0-8 ชั่วโมง ผลข้อมูลที่ได้แสดงในรูปแบบ mean \pm SEM

(วิธีการ : เติมสาร EGCG และ ECG ลงในพลาสมาจากผู้ป่วยธาลัสซีเมีย ตั้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องนาน 0-8 ชั่วโมง แล้วนำไปตรวจวัดปริมาณ NTBI ที่เหลืออยู่ในพลาสมาด้วยวิธี NTA chelation/HPLC)



รูปที่ 22 ความสามารถของสาร EGCG และ ECG (ความเข้มข้น 0-10 ไมโครโมลาร์) ที่แยกจากสารสกัดชาเขียวในการลดปริมาณธาตุเหล็กรูป NTBI ในพลาสมาของผู้ป่วยธาลัสซีเมีย (n = 10) เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง ผลข้อมูลที่ได้แสดงในรูปแบบ mean \pm SEM

(วิธีการ : เติมสาร EGCG และ ECG ลงในพลาสมาจากผู้ป่วยธาลัสซีเมีย ตั้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง แล้วนำไปตรวจวัดปริมาณ NTBI ที่เหลืออยู่ในพลาสมาด้วยวิธี NTA chelation/HPLC)

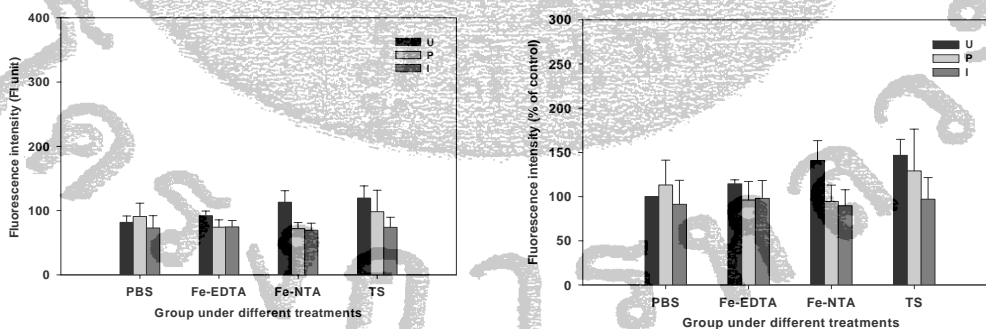
ในขั้นตอนนี้จึงสามารถสรุปได้ว่าสาร catechin EGCG และ ECG เป็นสารออกฤทธิ์ (active ingredients) สำคัญที่มีอยู่ในชาเขียวมีความสามารถในการจับกับธาตุเหล็กรูป Fe^{3+} ได้ดีกว่ารูป Fe^{2+} แล้วเกิดสารประกอบเชิงซ้อน (Fe^{3+} -catechin complex) ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตรและรองลงมาคือที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร การจับกันระหว่างสารสกัดชาเขียวกับธาตุเหล็กเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วภายในเวลา 10 นาทีและคงที่เป็นเวลานานอย่างน้อย 1 ชั่วโมง ลักษณะการทำปฏิกิริยาขึ้นอยู่กับปริมาณสารสกัดชาเขียวและธาตุเหล็กที่ใช้อีกด้วย สาร EGCG และ ECG ในสารสกัดชาเขียวยังมีความสามารถในการลดระดับ NTBI ในซีรัมผู้ป่วยธาลัสซีเมียได้อย่างมีประสิทธิภาพในลักษณะที่ขึ้นกับปริมาณสารและเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาอีกด้วย สาร catechin ทั้งสองตัวนี้จึงมีลักษณะการทำงานคล้ายกับยาขับเหล็กที่พบตามธรรมชาติ (natural iron chelator)

4.4 การตรวจวัดฤทธิ์สารสกัดชาเขียวในการต้านออกซิเดชัน

การศึกษาในหลอดทดลอง

ผลของสารสกัดชาเขียว

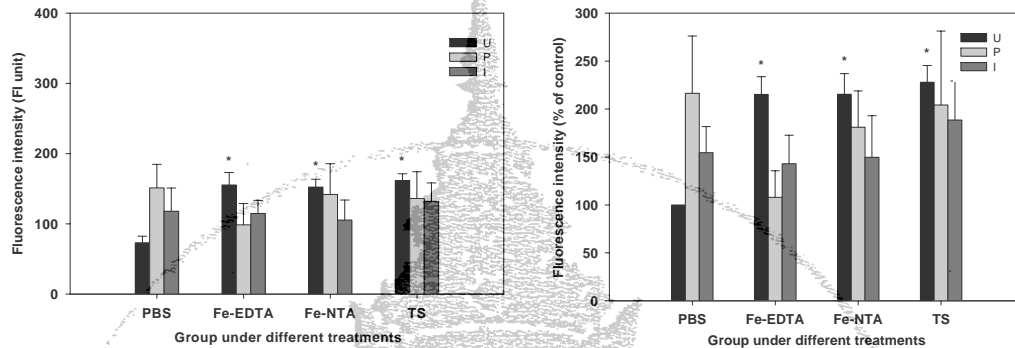
คุณลักษณะที่สำคัญและรู้จักเป็นอย่างดีของชาเขียวคือฤทธิ์เป็นสารแอนติออกซิเดนต์ (anti-oxidant) ที่สามารถทำลายอนุมูลอิสระได้ (free-radical scavenging activity) ซึ่งเป็นผลมาจากในใบชาที่มีสารโพลีฟีนอลกลุ่ม catechin (ได้แก่ EGC, EC, C, EGCG และ ECG) เป็นส่วนประกอบสำคัญ โดยพบว่าในชาเขียวมีสาร EGCG อยู่ในปริมาณสูงที่สุด ผลการศึกษาในรูปที่ 23 แสดงให้เห็นว่าเมื่อเติมสารประกอบเหล็ก (Fe-EDTA, Fe-NTA และ TS) ลงไปในเซลล์เม็ดเลือดแดงของคน สาร Fe-NTA และ TS ทำให้ระดับอนุมูลอิสระในเซลล์เม็ดเลือดแดงสูงขึ้นกว่ากลุ่ม



รูปที่ 23 ผลของการให้สารสกัดชาเขียว Commercial green tea ก่อน (P) และร่วมกับ (I) การกระตุ้นด้วยสารละลายธาตุเหล็ก (Fe-EDTA และ Fe-NTA) และซีรัมผู้ป่วยธาลัสซีเมียชนิดบีต้า (TS) ต่อระดับออกซิเดทีฟสเตรสในเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติของมนุษย์ ข้อมูลความเข้มของการเรืองแสง (ชี้วัดภาวะอนุมูลอิสระมากเกินไป) แสดงเป็นค่า mean \pm SEM

(วิธีการ : เติมน้ำชาเขียว Commercial green tea (ความเข้มข้น 5 กรัมเปอร์เซ็นต์) ลงไปยังเซลล์เม็ดเลือดแดง (10% human red cell suspension) ก่อน (P) และพร้อมกับ (I)การเติมน้ำละลาย Fe-EDTA (ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์) สารละลาย Fe-NTA (ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์) และซีรัมผู้ป่วยธาลัสซีเมีย (มีธาตุเหล็กรูป NTBI อยู่ในปริมาณ 4.5 ไมโครโมลาร์) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมน้ำละลาย DCFH ลงไป และนำไปวัดค่าความเข้มของการเรืองแสงสีเขียว (green fluorescent intensity, FI) ในเซลล์เม็ดเลือดแดงด้วยวิธีโฟลโซโตเมตรี)

ควบคุม (PBS) การเติมสารสกัดหยาบชาเขียว commercial green tea ลงไปสามารถช่วยลดปริมาณอนุมูลอิสระที่สูงขึ้นจากการถูกกระตุ้นด้วยสารประกอบเหล็กได้ (รูปที่ 23) ในทำนองเดียวกันการเติมสารสกัดหยาบชาเขียว microwave green tea ก็สามารถลดปริมาณอนุมูลอิสระที่สูงเพิ่มมากขึ้นจากการกระตุ้นด้วยสารประกอบเหล็กได้เช่นกัน (รูปที่ 24)



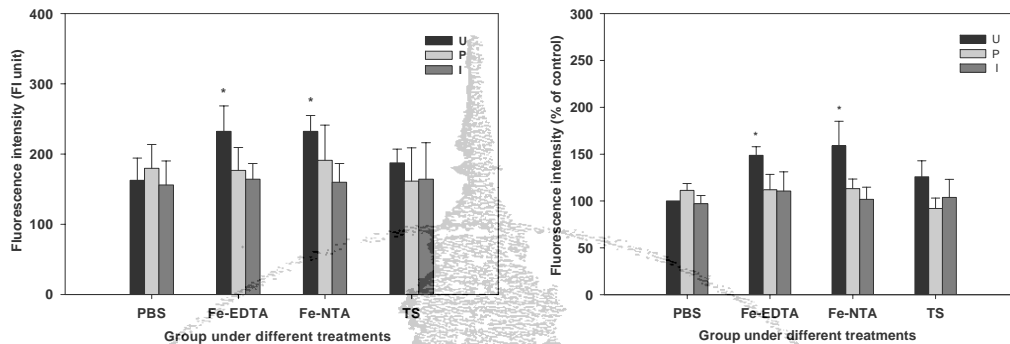
รูปที่ 24 ผลของการให้สารสกัดหยาบชาเขียว Microwave green tea ก่อน (P) และร่วมกับ (I) การกระตุ้นด้วยสารละลายธาตุเหล็ก (Fe-EDTA และ Fe-NTA) และซีรัมผู้ป่วยธาลัสซีเมียชนิดบีต้า (TS) ต่อระดับออกซิเดทีฟสเตรสในเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติของมนุษย์ ข้อมูลความเข้มของการเรืองแสง (ชีวิตภาวะอนุมูลอิสระมากเกินไป) แสดงเป็นค่า mean \pm SEM และ * $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัดชาเขียว (U)

(วิธีการ : เติมสารสกัดชาเขียว Microwave green tea (ความเข้มข้น 5 กรัมเปอร์เซ็นต์) ลงไปยังเซลล์เม็ดเลือดแดง (10% human red cell suspension) ก่อน (P) และพร้อมกับ (I) การเติมสารละลาย Fe-EDTA (ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์) สารละลาย Fe-NTA (ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์) และซีรัมผู้ป่วยธาลัสซีเมีย (มีธาตุเหล็กรูป NTBI อยู่ในปริมาณ 4.5 ไมโครโมลาร์) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย DCFH ลงไป และนำไปวัดค่าความเข้มของการเรืองแสงสีเขียว (FI) ในเซลล์เม็ดเลือดแดงด้วยวิธีโฟลโซโตเมตรี)

ผลของสาร EGCG และ ECG จากสารสกัดชาเขียว

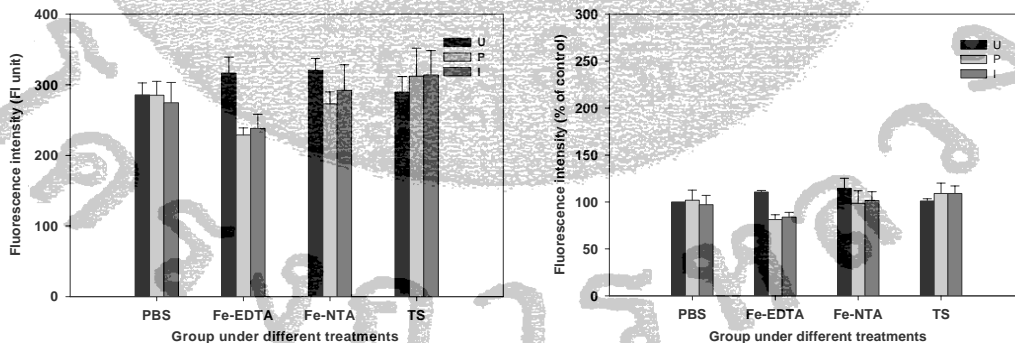
ผลการทดลองในรูปที่ 25 แสดงให้เห็นว่าสาร EGCG สามารถลดระดับอนุมูลอิสระในเม็ดเลือดแดงที่ถูกกระตุ้นด้วยสารประกอบเหล็ก Fe-EDTA และ Fe-NTA ได้อย่างมีประสิทธิภาพ การกระตุ้นด้วย TS (มีธาตุเหล็กรูป NTBI เป็นส่วนประกอบอยู่ 4.7 ไมโครโมลาร์) ทำให้มีปริมาณอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นเล็กน้อย และสาร EGCG ที่เติมลงไปก็ไม่สามารถลดระดับอนุมูลอิสระในเม็ดเลือดแดงที่ถูกกระตุ้นได้ เมื่อพิจารณาผลของสาร ECG จะเห็นได้ว่าสาร ECG สามารถลดระดับอนุมูลอิสระในเม็ดเลือดแดงที่ถูกกระตุ้นด้วยสารประกอบเหล็ก Fe-EDTA ได้อย่างมีประสิทธิภาพเช่นเดียวกัน และลดระดับอนุมูลอิสระในเม็ดเลือดแดงที่ถูกกระตุ้นด้วยสารประกอบเหล็ก Fe-NTA ได้เพียงเล็กน้อย (รูปที่ 26) จึงสามารถสรุปผลในขั้นตอนนี้ได้ว่าสารประกอบเหล็ก Fe-EDTA และ Fe-NTA ที่เติมลงไปทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเคมีในการสร้างอนุมูลอิสระได้อย่างมากเมื่อเทียบกับ TS ที่เติมลงไป โดยธาตุเหล็กรูป NTBI ที่มีอยู่ในซีรัมผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมีย (TS) ก็สามารถเหนี่ยวนำให้มีการสร้างอนุมูลอิสระขึ้นได้เล็กน้อย อย่างไรก็ตามสารประกอบธาตุเหล็กรูป NTBI (ความเข้มข้น 4.7 ไมโครโมลาร์) มีปริมาณน้อยกว่าเมื่อ

เทียบกับสารประกอบเหล็กกลุ่ม Fe-EDTA และ Fe-NTA (ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์) จึงทำให้เห็นผลกระตุ้นการสร้างอนุมูลอิสระที่ไม่ชัดเจน



รูปที่ 25 ผลของการให้สาร EGCG ก่อน (P) และร่วมกับ (I) การกระตุ้นด้วยสารละลายธาตุเหล็ก (Fe-EDTA และ Fe-NTA) และซีรัมผู้ป่วยธาลัสซีเมียชนิดบีต่ำ (TS) ต่อระดับออกซิเดทีฟสเตรสในเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติของมนุษย์ ข้อมูลความเข้มการเรืองแสง (ชีวิตภาวะอนุมูลอิสระมากเกินไป) แสดงเป็นค่า mean + SEM และ * $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัดชาเขียว (U)

(วิธีการ : เติมน้ำ EGCG ที่แยกจากสารสกัดชาเขียว Microwave green tea (ความเข้มข้น 5 กรัมเปอร์เซ็นต์) ลงไปยังเซลล์เม็ดเลือดแดง (10% human red cell suspension) ก่อน (P) และพร้อม (I) การเติมน้ำสารละลาย Fe-EDTA (ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์) สารละลาย Fe-NTA (ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์) และซีรัมผู้ป่วยธาลัสซีเมีย (มีธาตุเหล็กกลุ่ม NTBI อยู่ในปริมาณ 4.5 ไมโครโมลาร์) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมน้ำสารละลาย DCFH ลงไป และนำไปวัดค่าความเข้มของการเรืองแสงสีเขียว (FI) ในเซลล์เม็ดเลือดแดงด้วยวิธีฟลูออโรสโตเมตรี)



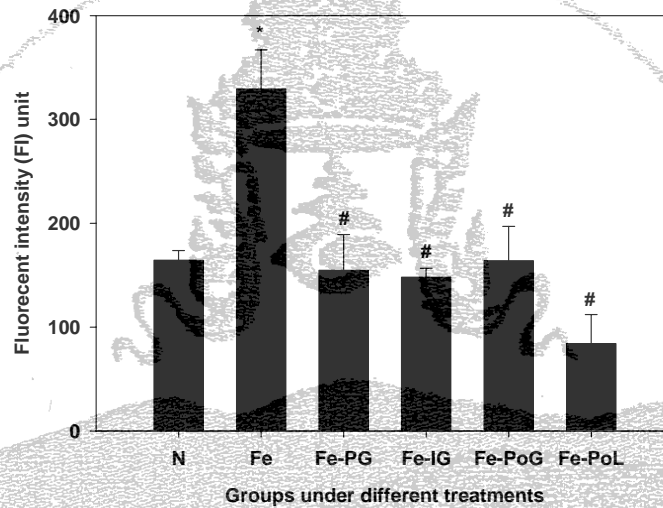
รูปที่ 26 ผลของการให้สาร ECG ก่อน (P) และร่วมกับ (I) การกระตุ้นด้วยสารละลายธาตุเหล็ก (Fe-EDTA และ Fe-NTA) และซีรัมผู้ป่วยธาลัสซีเมีย (TS) ต่อระดับออกซิเดทีฟสเตรสในเม็ดเลือดแดงปกติของมนุษย์ ข้อมูลความเข้มการเรืองแสง (ภาวะอนุมูลอิสระมากเกินไป) แสดงเป็นค่า mean+SEM และ * $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัดชาเขียว (U)

(วิธีการ : เติมน้ำ ECG ที่แยกจากสารสกัดชาเขียว Microwave green tea (ความเข้มข้น 5 กรัมเปอร์เซ็นต์) ลงไปยังเซลล์เม็ดเลือดแดง (10% human red cell suspension) ก่อน (P) และพร้อม (I) กับการเติมน้ำสารละลาย Fe-EDTA (ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์) สารละลาย Fe-NTA (ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์) และซีรัมผู้ป่วยธาลัสซีเมีย (มีธาตุเหล็กกลุ่ม NTBI อยู่ในปริมาณ 4.5 ไมโครโมลาร์) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมน้ำสารละลาย DCFH ลงไป และนำไปวัดค่าความเข้มของการเรืองแสงสีเขียว (FI) ในเซลล์เม็ดเลือดแดงด้วยวิธีฟลูออโรสโตเมตรี)

ผลของสารสกัดชาเขียวต่อสภาวะธาตุเหล็กและอนุมูลอิสระในหนูทดลอง

ระดับออกซิเดทีฟสเตรสในเซลล์เม็ดเลือดแดง

การฉีดสารละลายธาตุเหล็กมีผลกระตุ้นให้มีการสร้างอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้นในเม็ดเลือดแดงของหนูทดลอง สารสกัดชาเขียวสามารถป้องกันการสร้างอนุมูลอิสระอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัดชาเขียว การให้สารสกัดสกัดชาเขียวก่อนหรือพร้อมกับการได้รับธาตุเหล็กมีผลดีกว่าการให้สารสกัดชาเขียวภายหลังเล็กน้อย ยาขับเหล็กดีเฟอริโพรนหรือ L1 มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างอนุมูลอิสระได้อย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน (รูปที่ 27)



รูปที่ 27 ฤทธิ์ของสารสกัดชาเขียวในการป้องกันการสร้างอนุมูลอิสระในเซลล์เม็ดเลือดแดงของหนูทดลอง (n = 12) ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารละลายธาตุเหล็กเป็นเวลานาน 4 เดือน ข้อมูลที่ได้แสดงเป็นค่า mean \pm SD, $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม N, $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Fe คำย่อ : N = กลุ่มควบคุมปกติ

Fe = กลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วยสารละลายธาตุเหล็กอย่างเดียว

Fe-PG = กลุ่มที่ได้รับสารสกัดหยาบชาเขียวมาก่อน 1 เดือนแล้วจึงได้รับสารละลายธาตุเหล็ก

Fe-IG = กลุ่มที่ได้รับสารสกัดหยาบชาเขียวร่วมกับการได้รับสารละลายธาตุเหล็ก

Fe-PoG = กลุ่มที่ได้รับสารละลายธาตุเหล็กเป็นเวลานาน 1 เดือนแล้วจึงได้รับสารสกัดหยาบชาเขียว

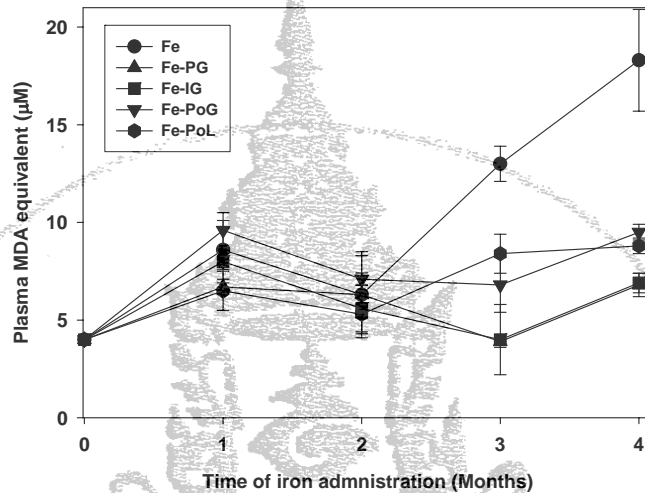
Fe-PoL = กลุ่มที่ได้รับสารละลายธาตุเหล็กเป็นเวลานาน 1 เดือนแล้วจึงได้รับยาขับเหล็ก L1

(วิธีการ : หนูทดลอง Wistar rats เพศผู้ได้รับสารสกัดหยาบชาเขียวความเข้มข้น 5 กรัมเปอร์เซ็นต์หรือยาขับเหล็ก L1 ปริมาณ 5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม และได้รับการฉีดสารละลายธาตุเหล็ก Fe-NTA ปริมาณ 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมเข้าที่บริเวณหน้าท้องเป็นเวลานาน 4 เดือน ทำการเจาะเลือดดำบริเวณปลายหางหนูเพื่อนำไปตรวจวัดระดับอนุมูลอิสระในเซลล์เม็ดเลือดแดง)

ระดับสารมาลอนไดอัลดีไฮด์ในพลาสมา

การฉีดสารละลายธาตุเหล็กกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation เพิ่มมากขึ้นในหนูทดลองและทำให้ตรวจพบระดับสารมาลอนไดอัลดีไฮด์ (MDA) ในพลาสมาเพิ่มมากขึ้นด้วย สารสกัดชาเขียวมีผลยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ได้อย่างชัดเจนช่วงเดือนที่ 3 และ 4 ของการ

ได้รับสารละลายธาตุเหล็กเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัดชาเขียว การให้หนูทดลองกินสารสกัดชาเขียวก่อนได้รับการกระตุ้นด้วยสารละลายธาตุเหล็กเป็นวิธีที่ได้ผลมากที่สุดในการยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ยาขับเหล็กดีเฟอร์โรนก็สามารถยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ได้เช่นเดียวกัน (รูปที่ 28)



รูปที่ 28 ระดับสารมาลอนไดอัลดีไฮด์ (malondialdehyde, MDA) ในพลาสมาหนูทดลอง (n = 12) ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารละลายธาตุเหล็กเป็นเวลา 4 เดือน ข้อมูลแสดงเป็นค่า mean \pm SD

คำย่อ : Fe = กลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วยสารละลายธาตุเหล็กอย่างเดียว

Fe-PG = กลุ่มที่ได้รับสารสกัดหยาบชาเขียวมาก่อน 1 เดือนแล้วจึงได้รับสารละลายธาตุเหล็ก

Fe-IG = กลุ่มที่ได้รับสารสกัดหยาบชาเขียวร่วมกับการได้รับสารละลายธาตุเหล็ก

Fe-PoG = กลุ่มที่ได้รับสารละลายธาตุเหล็กเป็นเวลานาน 1 เดือนแล้วจึงได้รับสารสกัดหยาบชาเขียว

Fe-L = กลุ่มที่ได้รับสารละลายธาตุเหล็กเป็นเวลานาน 1 เดือนแล้วจึงได้รับยาขับเหล็ก L1

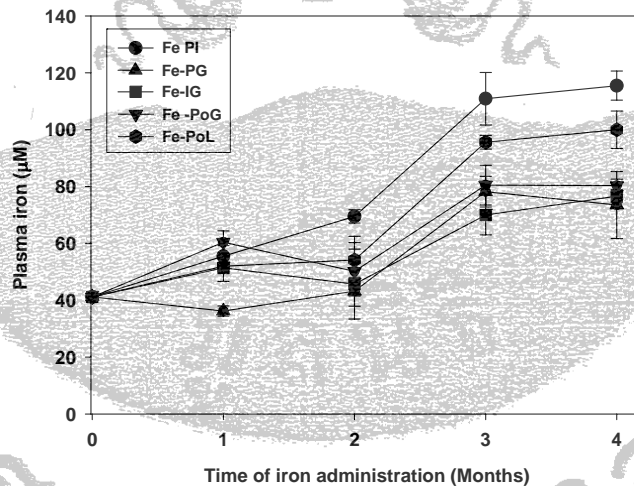
(วิธีการ : หนูทดลอง Wistar rats เพศผู้ได้รับสารสกัดหยาบชาเขียวความเข้มข้น 5 กรัมเปอร์เซ็นต์หรือยาขับเหล็ก L1 ปริมาณ 5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม และได้รับการฉีดสารละลายธาตุเหล็ก Fe-NTA ปริมาณ 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมเข้าที่บริเวณหน้าท้องเป็นเวลานาน 4 เดือน ทำการเจาะเลือดดำบริเวณปลายหางหนูทุก ๆ เดือนเพื่อนำไปตรวจวัดปริมาณสารชนิดต่าง ๆ)

ผลการศึกษาของ Toschi และคณะแสดงว่าสารสกัดชาเขียวที่มีสาร EGCG และ ECG ในปริมาณที่สูงสามารถป้องกันการทำลายเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจโดยอนุมูลอิสระได้ [4] สาร EGCG จากสารสกัดชาเขียวสามารถยับยั้งการสร้างอนุมูลอิสระที่ผิวหนังของหนูทดลองและคนได้ [92, 93] สาร EGCG ออกฤทธิ์ป้องกันการเกิดออกซิเดทีฟสเตรสในเซลล์ตับ [94, 95] ในเซลล์ประสาทที่เพาะเลี้ยง [1] สาร EGCG ที่ความเข้มข้นสูง ๆ ช่วยป้องกันการเกิด lipid oxidation ที่สมองส่วนซีรีบรัมของ gerbil ได้แต่ไม่ค่อยมีผลที่ความเข้มข้นต่ำ ๆ [1] แม้ว่าสารสกัดชาเขียวและสาร EGCG มีคุณสมบัติเป็นสารแอนติออกซิแดนซ์ที่ดีเมื่อถูกใช้ในปริมาณที่เหมาะสม แต่เมื่อถูกใช้ในปริมาณที่สูงก็ไม่มีคุณสมบัติเป็นสารแอนติออกซิแดนซ์และไม่สามารถทำลายอนุมูลไฮดรอกซิลได้ [96] สารคะเตชินในชาเขียวช่วยป้องกันเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 อนุมูลอิสระ [97] สารสกัดชาเขียวและสารคะเตชินสามารถบรรเทาอาการเมื่อยล้าในหนูทดลองได้

[98] สาร EGCG ป้องกันการตายของเซลล์ประสาทแบบอะพอพโตซิสโดยไปทำลายอนุมูลอิสระ
 [99] การดื่มชาเขียวที่มีสารคะเตชินเป็นส่วนประกอบอยู่ 690 มิลลิกรัมทุกวันเป็นเวลา 12 สัปดาห์สามารถลดปริมาณ MDA-modified LDL ในพลาสมาได้ [100, 101] สารโพลีฟีนอลในไวน์แดงช่วยลดการเกิด lipid oxidation ได้ [102] ดังนั้นจึงสามารถกล่าวได้ว่าสารสกัดชาเขียวที่มีสารคะเตชิน (โดยเฉพาะอย่างยิ่งสาร EGCG) เป็นองค์ประกอบสามารถป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระและการเกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

สภาวะธาตุเหล็กในพลาสมา

สารสกัดชาเขียวสามารถลดระดับธาตุเหล็กรูป nonheme iron ในพลาสมาของหนูทดลองที่ถูกกระตุ้นด้วยการฉีดธาตุเหล็กได้ โดยพบว่าในช่วงเดือนที่ 2-4 ระดับธาตุเหล็กในพลาสมาของหนูทดลองมีค่าต่ำกว่าในพลาสมาของหนูทดลองกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัดชาเขียว วิธีการให้สารสกัดชาเขียวก่อน พร้อม ๆ กันหรือภายหลังการกระตุ้นด้วยธาตุเหล็กไม่ได้ทำให้ระดับธาตุเหล็กรูป nonheme iron ลดลงแตกต่างกัน ยาตีเฟอริโพรนก็สามารถลดระดับธาตุเหล็กรูป nonheme ในพลาสมาได้เช่นกันแต่มีประสิทธิภาพน้อยกว่า (รูปที่ 29)



รูปที่ 29 ระดับ Plasma iron ในพลาสมาของหนูทดลอง (n = 12) ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารละลายธาตุเหล็กเป็นเวลานาน 4 เดือน ข้อมูลที่ได้แสดงเป็นค่า mean ± SD

คำย่อ : Fe = กลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วยสารละลายธาตุเหล็กอย่างเดียว

Fe-PG = กลุ่มที่ได้รับสารสกัดชาเขียวมาก่อน 1 เดือนแล้วจึงได้รับสารละลายธาตุเหล็ก

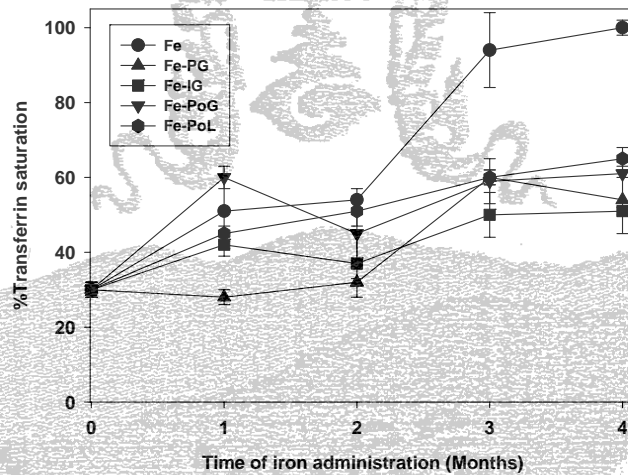
Fe-IG = กลุ่มที่ได้รับสารสกัดชาเขียวร่วมกับการได้รับสารละลายธาตุเหล็ก

Fe-PoG = กลุ่มที่ได้รับสารละลายธาตุเหล็กเป็นเวลานาน 1 เดือนแล้วจึงได้รับสารสกัดชาเขียว

Fe-L = กลุ่มที่ได้รับสารละลายธาตุเหล็กเป็นเวลานาน 1 เดือนแล้วจึงได้รับยาขับเหล็ก L1

(วิธีการ : หนูทดลอง Wistar rats เพศผู้ได้รับสารสกัดชาเขียวความเข้มข้น 5 กรัมเปอร์เซ็นต์หรือยาขับเหล็ก L1 ปริมาณ 5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม และได้รับการฉีดสารละลายธาตุเหล็ก Fe-NTA ปริมาณ 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมเข้าที่บริเวณหน้าท้องเป็นเวลานาน 4 เดือน ทำการเจาะเลือดดำบริเวณปลายหางหนูทุก ๆ เดือนเพื่อนำไปตรวจวัดปริมาณสารชี้วัดต่าง ๆ)

สารสกัดชาเขียวและยาตีเฟอร์ริโพรนช่วยปกป้องทำให้ทรานส์เฟอร์รินในพลาสมาอิมด้วยด้วยธาตุเหล็กช้าลงเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัดชาเขียว ภายหลังจากหนูทดลองถูกกระตุ้นด้วยการฉีดธาตุเหล็กเข้าไปแล้วอย่างน้อย 2 เดือน (รูปที่ 30) การที่หนูทดลองได้รับธาตุเหล็กโดยการฉีดเข้าสู่ร่างกายเป็นประจำ มีผลทำให้ปริมาณธาตุเหล็กรูป nonheme iron เพิ่มขึ้น โปรตีนทรานส์เฟอร์รินอิมตัวด้วยธาตุเหล็กมากขึ้น ส่งผลทำให้มีธาตุเหล็กรูป NTBI ปรากฏและตรวจพบได้ในพลาสมา การให้หนูทดลองกินสารสกัดชาเขียว จะมีผลทำให้สามารถช่วยป้องกันหรือชะลอให้มีธาตุเหล็กรูป NTBI ปรากฏขึ้นในพลาสมาซ้ำกว่าในของหนูทดลองที่ถูกกระตุ้นด้วยธาตุเหล็กแต่ไม่ได้รับสารสกัดชาเขียว การให้หนูทดลองดื่มสารสกัดชาเขียวมา 1 เดือนก่อนที่จะได้รับการกระตุ้นด้วยธาตุเหล็กให้ผลดีที่สุดเมื่อเทียบกับวิธีการให้สารสกัดชาเขียวพร้อมกันหรือภายหลังได้รับธาตุเหล็กมาแล้ว 1 เดือน ยาตีเฟอร์ริโพรนมีสัมฤทธิ์ผลดีในการป้องกันการเกิดธาตุเหล็กรูป NTBI ขึ้นในพลาสมา (รูปที่ 31)



รูปที่ 30 ระดับ Total iron-binding capacity (TIBC) ในพลาสมาของหนูทดลอง (n = 12) ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารละลายธาตุเหล็กเป็นเวลานาน 4 เดือน ข้อมูลที่ได้แสดงเป็นค่า mean + SD

คำย่อ : Fe = กลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วยสารละลายธาตุเหล็กอย่างเดียว

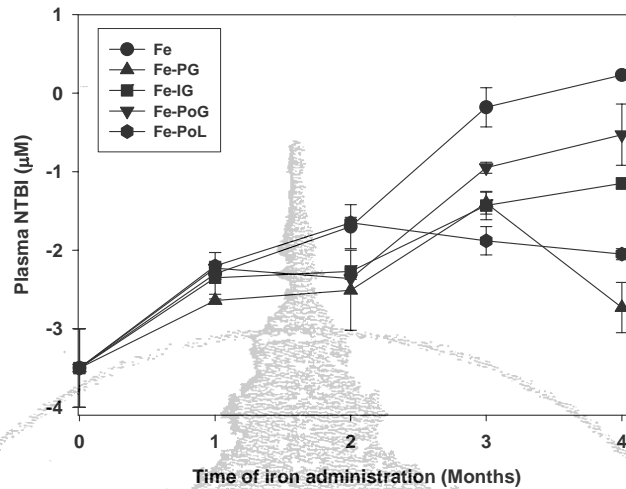
Fe-PG = กลุ่มที่ได้รับสารสกัดหยาบชาเขียวมาก่อน 1 เดือนแล้วจึงได้รับสารละลายธาตุเหล็ก

Fe-IG = กลุ่มที่ได้รับสารสกัดหยาบชาเขียวร่วมกับการได้รับสารละลายธาตุเหล็ก

Fe-PoG = กลุ่มที่ได้รับสารละลายธาตุเหล็กเป็นเวลานาน 1 เดือนแล้วจึงได้รับสารสกัดหยาบชาเขียว

Fe-L = กลุ่มที่ได้รับสารละลายธาตุเหล็กเป็นเวลานาน 1 เดือนแล้วจึงได้รับยาขับเหล็ก L1

(วิธีการ : หนูทดลอง Wistar rats เพศผู้ได้รับสารสกัดหยาบชาเขียวความเข้มข้น 5 กรัมเปอร์เซ็นต์หรือยาขับเหล็ก L1 ปริมาณ 5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม และได้รับการฉีดสารละลายธาตุเหล็ก Fe-NTA ปริมาณ 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมเข้าที่บริเวณหน้าท้องเป็นเวลานาน 4 เดือน ทำการเจาะเลือดดำบริเวณปลายหางหนูทุก ๆ เดือนเพื่อนำไปตรวจวัดปริมาณสารชี้วัดต่าง ๆ)



รูปที่ 31 ระดับ Non-transferrin bound iron (NTBI) ในพลาสมาของหนูทดลอง (n = 12) ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารละลายธาตุเหล็กเป็นเวลานาน 4 เดือน ข้อมูลที่ได้แสดงเป็นค่า mean \pm SD

คำย่อ : Fe = กลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วยสารละลายธาตุเหล็กอย่างเดียว

Fe-PG = กลุ่มที่ได้รับสารสกัดหยาบชาเขียวมาก่อน 1 เดือนแล้วจึงได้รับสารละลายธาตุเหล็ก

Fe-IG = กลุ่มที่ได้รับสารสกัดหยาบชาเขียวร่วมกับการได้รับสารละลายธาตุเหล็ก

Fe-PoG = กลุ่มที่ได้รับสารละลายธาตุเหล็กเป็นเวลานาน 1 เดือนแล้วจึงได้รับสารสกัดหยาบชาเขียว

Fe-L = กลุ่มที่ได้รับสารละลายธาตุเหล็กเป็นเวลานาน 1 เดือนแล้วจึงได้รับยาขับเหล็ก L1

(วิธีการ : หนูทดลอง Wistar rats เพศผู้ได้รับสารสกัดหยาบชาเขียวความเข้มข้น 5 กรัมเปอร์เซ็นต์หรือยาขับเหล็ก L1 ปริมาณ 5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม และได้รับการฉีดสารละลายธาตุเหล็ก Fe-NTA ปริมาณ 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมเข้าที่บริเวณหน้าท้องเป็นเวลานาน 4 เดือน ทำการเจาะเลือดดำบริเวณปลายหางหนูทุก ๆ เดือนเพื่อนำไปตรวจวัดปริมาณสารชนิดต่าง ๆ)

การศึกษาหลายปีที่ผ่านมาชี้ให้เห็นว่ายาโซเดียมเฟอร์รัสซิเตรท (เฟอร์โรเมีย) มีผลทำให้ระดับธาตุเหล็ก (serum iron) และ total iron binding capacity (TIBC) ในซีรัมมีค่าสูงขึ้นในสตรีตั้งครรภ์ที่มีภาวะโลหิตจาง [103] การศึกษาต่อมาในปี ค.ศ. 1997 แสดงให้เห็นว่าสารคะเตชินกลุ่มโพลีฟีนอลมีคุณสมบัติจับกับธาตุเหล็กและต้านการออกซิเดชันที่เชื่อมหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ [15] การให้สารคะเตชินปริมาณ 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมเป็นเวลา 4 วันแก่หนูทดลองที่มีภาวะเหล็กเกินสามารถช่วยทำให้เกร็ดเลือดซึ่งทำหน้าที่มากกว่าปกติ (platelet hyperactivity) กลับคืนสู่ปกติได้ [104] สารโพลีฟีนอลที่มีอยู่ในชาเขียวและโรสเมรี่สามารถลดการดูดซึมธาตุเหล็ก nonheme iron ได้ [87] อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาผลของสารสกัดหยาบและสารคะเตชินของชาเขียวต่อระดับธาตุเหล็ก NTBI ในพลาสมาของผู้ป่วยที่มีภาวะเหล็กเกิน ในการศึกษาครั้งนี้สารสกัดหยาบชาเขียวซึ่งอุดมด้วยสารคะเตชินต่าง ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสาร EGCG สามารถช่วยชะลอการเกิดภาวะธาตุเหล็กเกินในพลาสมาของหนูทดลองที่ได้รับธาตุเหล็กเข้าไปได้อย่างมีประสิทธิภาพ ส่งผลทำให้ทรานส์เฟอร์รินในพลาสมามีความอิ่มตัวด้วยธาตุเหล็กน้อยกว่ากลุ่มควบคุม และที่สำคัญมากคือทำให้มีธาตุเหล็ก NTBI เกิดขึ้นในพลาสมา

กว่าที่ควรเป็น อาจมีผลช่วยป้องกันการเกิดออกซิเดทีฟสเตรส ตลอดจนทำลายเซลล์และอวัยวะสำคัญในร่างกาย

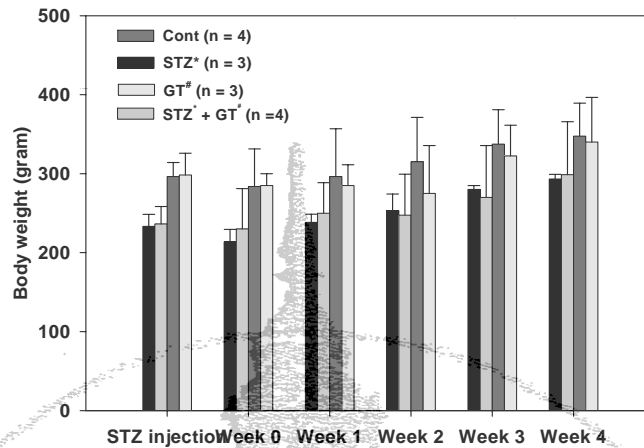
4.5 ผลของสารสกัดชาในการเพิ่มความต้านทานการเกิดโรคเบาหวานในหนูทดลอง

ตามปกติเซลล์บีต้า (β -cells) บริเวณ Islets of Langerhan ของตับอ่อนในร่างกายทำหน้าที่สร้างและหลั่งฮอร์โมนอินซูลินออกมาทำหน้าที่เร่งการนำน้ำตาลกลูโคสเข้าไปในเซลล์ตับและกล้ามเนื้อเพื่อนำไปใช้สลายแล้วสร้างเป็นสารพลังงานสูงรูปเอทีพี (ATP ย่อจาก adenosine triphosphate) เมื่อเซลล์บีต้ามีความผิดปกติจากกรรมพันธุ์ (genetic defect) หรือจากสาเหตุอื่น ๆ (เช่นการชราภาพของเซลล์ การได้รับสารเคมีและยาที่เป็นพิษต่อเซลล์บีต้า) ก็ส่งผลให้การทำหน้าที่ผิดปกติไป และเกิดพยาธิสภาพที่เรียกว่าโรคเบาหวานชนิดที่ 1 (Type I Diabetic mellitus) และโรคเบาหวานชนิดที่ 2 (Type II Diabetic mellitus) ขึ้นมาได้ สารเคมีที่นิยมใช้ในการเหนี่ยวนำให้สัตว์ทดลองเกิดเป็นโรคเบาหวานคือสารสเตรปโตโซโตซิน (streptozocin) หรือสารแอลลือกแซน (alloxan) ในการศึกษาที่ผ่านมาสารสเตรปโตโซโตซินที่ฉีดเข้าไปในหนูทดลองมีผลเร่งการเกิด lipid peroxidation และเพิ่มกัมมันตภาพของเอนไซม์ phospholipase A_2 การให้สารคะเตชินเข้าไปมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์ phospholipase A_2 และลดการสร้างสารลิปิดเพอรอกไซด์ [21] สารคะเตชินจากชาเขียวช่วยลดการสังเคราะห์สารพอสตาซัยคลินบริเวณเส้นเลือดแดง aorta ของหนูทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยสารสเตรปโตโซโตซินให้เกิดโรคเบาหวานได้ [105] สารโพลีฟีนอลจากชาเขียว (500 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม) มีผลช่วยเพิ่มการทนต่อน้ำตาลกลูโคส (glucose tolerance) ในหนูทดลองปกติอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.001$) และสารโพลีฟีนอลที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมยังช่วยลดระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดลงได้อย่างมีนัยสำคัญในหนูทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยการฉีดสารแอลลือกแซนให้เกิดเป็นโรคเบาหวานขึ้นมา [28] ชาเขียวสามารถยับยั้งการเกิดต่อกระดูกและลดระดับไขมันไตรกลีเซอไรด์ในเลือดของหนูทดลองโรคเบาหวานที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยการฉีดสารสเตรปโตโซโตซินได้อย่างมีนัยสำคัญ [106, 107] การศึกษาในหนูทดลองที่เป็นโรคเบาหวานโดย Mustata และคณะล่าสุดที่ผ่านมานในปี ค.ศ.2005 แสดงให้เห็นว่าน้ำหนักหนูทดลองลดลง ความดันเลือดซิสโตลิกเพิ่มขึ้นและระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดเพิ่มสูงขึ้น การให้ชาเขียวช่วยปรับปรุงการทำงานของเรตินาให้ดีขึ้น ความดันเลือดซิสโตลิกลดลงและระดับน้ำตาลกลูโคสลดลง [22, 107]

ในการทดลองนี้ได้ใช้สารสเตรปโตโซโตซินฉีดเข้าไปในหนูทดลองเพื่อไปทำลายเซลล์บีต้าของตับอ่อน ทำให้หนูทดลองเกิดเป็นโรคเบาหวานขึ้นมา ผลการทดลองในตารางที่ 4 และรูปที่ 32 แสดงให้เห็นว่าเมื่อฉีดสารสเตรปโตโซโตซินปริมาณ 55 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมเพื่อไปทำลายเซลล์บีต้าของตับอ่อนในหนูทดลอง น้ำหนักตัวของหนูทดลองในทุก ๆ กลุ่ม และจะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นทั้งในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดชาเขียวและไม่ได้รับสารสกัดชาเขียว

ตารางที่ 4 ข้อมูลน้ำหนักตัวหนูทดลองกลุ่มควบคุม (Cont) กลุ่มที่ได้รับสารสเตโรปโตโซโตซิน (STZ*) (55 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม) กลุ่มที่ได้รับสารสกัดชาเขียว (GT#) (300 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน) และกลุ่มที่ได้รับสารสเตโรปโตโซโตซินร่วมกับสารสกัดชาเขียว (STZ*+GT#) เป็นเวลานาน 4 สัปดาห์ ข้อมูลที่ได้แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

หนูทดลอง	น้ำหนักตัวหนูทดลอง (กรัม)					
	ภายหลังฉีดสาร STZ (*)	ภายหลังกินสารสกัดชาเขียว (#)				
		สัปดาห์ 0	สัปดาห์ 1	สัปดาห์ 2	สัปดาห์ 3	สัปดาห์ 4
Cont1	310	325	345	350	370	385
Cont2	305	315	340	370	380	380
Cont3	270	275	285	295	300	325
Cont4	300	220	215	245	300	300
Mean \pm SD	296 \pm 18	284 \pm 47	296 \pm 60	315 \pm 56	337 \pm 43	347 \pm 42
STZ1*	250	231	250	260	280	300
STZ2*	230	210	230	230	285	290
STZ3*	220	200	235	270	275	290
Mean \pm SD	233 \pm 15	214 \pm 16	238 \pm 10	253 \pm 21	280 \pm 5	293 \pm 6
GT1#	325	300	315	340	350	380
GT2#	270	285	275	220	-	-
GT3#	300	270	265	265	295	300
Mean \pm SD	298 \pm 27	285 \pm 15	285 \pm 26	275 \pm 61	322 \pm 39	340 \pm 56
STZ* + GT1#	215	240	260	250	285	320
STZ* + GT2#	260	265	270	270	295	325
STZ* + GT3#	220	155	185	175	175	200
STZ* + GT4#	250	260	285	295	325	350
Mean \pm SD	236 \pm 22	230 \pm 51	250 \pm 38	247 \pm 52	270 \pm 65	299 \pm 67



รูปที่ 32 ข้อมูลน้ำหนักตัวหนูทดลองกลุ่มควบคุม (Cont) กลุ่มที่ได้รับสารสเตรบิโตโซโดซิน (STZ*) (55 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม) กลุ่มที่ได้รับสารสกัดชาเขียว (GT#) (300 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน) และกลุ่มที่ได้รับสารสเตรบิโตโซโดซินร่วมกับสารสกัดชาเขียว (STZ*+GT#) เป็นเวลานาน 4 สัปดาห์ ข้อมูลที่ได้แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

(วิธีการ : เลี้ยงหนูทดลองจำนวน 15 ตัวในกรงที่ทำด้วยวัสดุโพลีโพรพิลีนด้วยน้ำและอาหารปกติแล้วแบ่งออกเป็น กลุ่มควบคุมที่ได้รับสารละลาย citrate buffer ค่าพีเอช 5.0 ติดต่อกันเป็นเวลา 1 เดือน (Cont), กลุ่มที่กินสารสกัดชาเขียวติดต่อกันเป็นเวลา 1 เดือน (Cont + GT#), กลุ่มที่ได้รับการฉีดสารสเตรบิโตโซโดซิน (STZ*) และกลุ่มที่ได้รับการฉีดสารสเตรบิโตโซโดซินก่อนแล้วให้สารสกัดชาเขียวติดต่อกันเป็นเวลา 1 เดือน (STZ* + GT#) จากนั้นทำการเจาะเลือดจากเส้นเลือดดำบริเวณหางทุก 1 สัปดาห์ เพื่อตรวจวัดระดับน้ำตาลกลูโคสในพลาสมา)

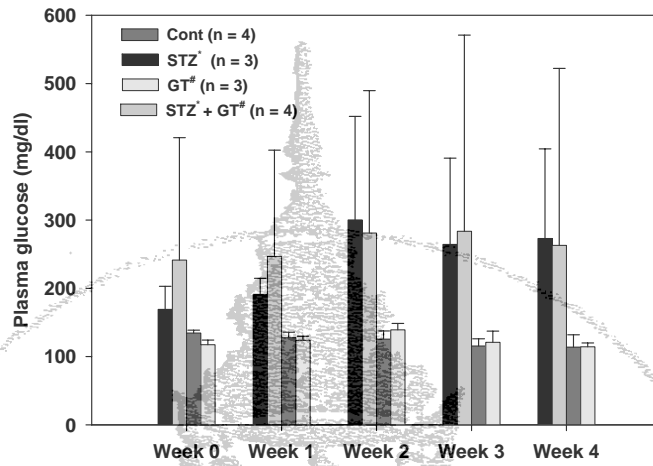
ผลการทดลองในตารางที่ 5 และรูปที่ 33 แสดงให้เห็นว่า เมื่อฉีดสารสเตรบิโตโซโดซินปริมาณ 55 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมเข้าไปเพื่อไปทำลายเซลล์เบต้าของตับอ่อนในหนูทดลอง จะสังเกตเห็นว่าระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดของหนูสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างชัดเจน เมื่อให้สารสกัดชาเขียว 300 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมติดต่อกันเป็นเวลา 1 เดือนพบว่าสามารถควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดได้ ในขณะที่กลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัดชาเขียว ระดับน้ำตาลในเลือดสูงชันอย่างเห็นได้ชัด ส่วนหนูกลุ่มควบคุมที่ได้รับและไม่ได้รับสารสกัดชาเขียว ระดับน้ำตาลในเลือดค่อนข้างคงที่ ในขณะที่หนูกลุ่มควบคุมที่ได้และไม่ได้รับสารสกัดชาเขียว ระดับน้ำตาลกลูโคสในกระแสเลือดค่อนข้างคงที่

การฉีดสารสเตรบิโตโซโดซินเพื่อไปทำลายเซลล์เบต้าของตับอ่อนในหนูทดลอง มีผลทำให้ไม่สามารถสร้างฮอร์โมนอินซูลินได้ ทำให้ระดับน้ำตาลกลูโคสในกระแสเลือดเพิ่มขึ้นและเกิดพยาธิสภาพของโรคเบาหวาน ระดับน้ำตาลกลูโคสเพิ่มขึ้นเรื่อยๆเมื่อเวลาผ่านไป แต่เมื่อให้สารสกัดชาเขียว 300 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมช่วยควบคุมระดับน้ำตาลกลูโคสได้ให้อยู่ในระดับที่ค่อนข้างคงที่ นอกจากนี้สารสกัดชาเขียวไม่มีผลต่อระดับน้ำตาลกลูโคสในกระแสเลือดของหนูกลุ่มควบคุมด้วย จึงสรุปได้ว่าสารสกัดชาเขียวสามารถควบคุมระดับน้ำตาลกลูโคสในกระแส

เลือดในกลุ่มเบาหวานได้ ทั้งนี้ควรมีการศึกษาผลของสารสกัดชาเขียวในกลุ่มผู้ป่วยโรคเบาหวาน เพื่อนำไปใช้เป็นในการรักษาพยาธิสภาพของโรคเบาหวานต่อไป

ตารางที่ 5 ระดับน้ำตาลกลูโคสในพลาสมาของหนูทดลองกลุ่มควบคุม (Cont) กลุ่มที่ได้รับ สารสเตรบิโตโซโดซิน (STZ*) (55 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม) กลุ่มที่ได้รับสารสกัดชาเขียว (GT#) (300 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน) และกลุ่มที่ได้รับสารสเตรบิโตโซโดซิน ร่วมกับสารสกัดชาเขียว (STZ*+GT#) เป็นเวลานาน 4 สัปดาห์ ข้อมูลที่ได้แสดงเป็นค่าเฉลี่ย + ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

หนูทดลอง	ระดับน้ำตาลกลูโคสในพลาสมา (มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร)				
	สัปดาห์ 0	สัปดาห์ 1	สัปดาห์ 2	สัปดาห์ 3	สัปดาห์ 4
Cont1	138	134	131	126	118
Cont2	132	134	118	117	109
Cont3	138	118	113	117	135
Cont4	130	123	140	101	92
Mean ± SD	134 ± 4	127 ± 8	125 ± 12	115 ± 11	114 ± 18
STZ1*	206	208	407	410	386
STZ2*	158	174	193	193	200
STZ3*	143	119	175	189	233
Mean ± SD	169 ± 34	191 ± 23	300 ± 151	264 ± 126	273 ± 131
GT1#	118	130	136	139	110
GT2#	110	118	131	107	118
GT3#	124	124	150	117	-
Mean ± SD	117 ± 7	124 ± 6	139 ± 9	121 ± 16	114 ± 6
STZ* + GT1#	182	227	256	154	155
STZ* + GT2#	152	154	162	162	153
STZ* + GT3#	508	473	582	713	649
STZ* + GT4#	123	134	123	105	94
Mean ± SD	241 ± 179	247 ± 156	281 ± 208	283 ± 287	263 ± 259



รูปที่ 33 ระดับน้ำตาลกลูโคสในพลาสมาของหนูทดลองกลุ่มควบคุม (Cont) กลุ่มที่ได้รับสารสเตโรปโตโซไดซิน (STZ) (55 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม) กลุ่มที่ได้รับสารสกัดชาเขียว (GT*) (300 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน) และกลุ่มที่ได้รับสารสเตโรปโตโซไดซินร่วมกับสารสกัดชาเขียว (STZ + GT*) เป็นเวลานาน 4 สัปดาห์ ข้อมูลที่ได้แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

(วิธีการ : เลี้ยงหนูทดลองจำนวน 15 ตัวในกรงที่ทำด้วยวัสดุโพลีโพรพิลีนด้วยน้ำและอาหารปกติแล้วแบ่งออกเป็น กลุ่มควบคุมที่ได้รับสารละลาย citrate buffer ค่าพีเอช 5.0 ติดต่อกันเป็นเวลา 1 เดือน (Cont), กลุ่มที่กินสารสกัดชาเขียวติดต่อกันเป็นเวลา 1 เดือน (Cont + GT*), กลุ่มที่ได้รับการฉีดสารสเตโรปโตโซไดซิน (STZ) และกลุ่มที่ได้รับการฉีดสารสเตโรปโตโซไดซินก่อนแล้วให้สารสกัดชาเขียวติดต่อกันเป็นเวลา 1 เดือน (STZ + GT*) จากนั้นทำการเจาะเลือดจากเส้นเลือดดำบริเวณหางทุก 1 สัปดาห์ เพื่อตรวจวัดระดับน้ำตาลกลูโคสในพลาสมา)

จึงอาจสรุปผลได้ว่าสารสกัดชาเขียวช่วยปรับน้ำหนักหนูทดลองโรคเบาหวานที่ลดลงให้มีระดับสูงขึ้นเรื่อยๆ เทียบเท่ากับหนูทดลองปกติกลุ่มควบคุมตลอดระยะเวลา 4 สัปดาห์ที่ทำการศึกษา สารสกัดชาเขียวมีผลช่วยควบคุมระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดให้มีความใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม สารสเตโรปโตโซไดซินเหนี่ยวนำให้มีระดับน้ำตาลในเลือดสูงเพิ่มมากขึ้น การให้หนูทดลองที่เป็นโรคเบาหวานกินสารสกัดชาเขียวเป็นเวลานาน 4 สัปดาห์ไม่มีผลทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดลดลงได้

สรุปผลการทดลอง

ชาเขียว (*Camellia sinensis*) มีองค์ประกอบหลักเป็นสารโพลีฟีนอลกลุ่มคะเตชิน ได้แก่ epigallocatechin (EGC), epicatechin (EC), catechin (C), epigallocatechin 3-gallate (EGCG), gallicocatechin 3-gallate (GCG) และ epicatechin gallate (ECG) โดยพบสาร EGCG เป็นปริมาณสูงที่สุดและมีคุณสมบัติเป็นสารแอนติออกซิแดนท์แรงที่สุด สารคะเตชินเหล่านี้มีเสถียรภาพที่ดีสภาวะเป็นกรดและถูกเปลี่ยนแปลงไปเป็นสารผลิตภัณฑ์อื่น ๆ อย่างรวดเร็ว โดยเอนไซม์ polyphenol oxidase (PPO) ที่มีอยู่แล้วในใบชาสด การแปรรูปใบชาให้เป็นผลิตภัณฑ์ชาเขียว ชาอู่หลง ชาดำและชาเมี่ยงโดยการหมักเป็นเวลานานจำเพาะทำให้สาร EGCG ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพและเภสัชวิทยาหลายอย่างมีปริมาณลดลงอย่างมาก การนำใบชาสดมาผ่านกระบวนการหนึ่ง การอบไอน้ำ การคั่วหรือการอบแห้งในตู้อบไมโครเวฟสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ PPO ได้อย่างมีประสิทธิภาพ การผลิตชาเขียวเชิงพาณิชย์ที่ใช้กันอย่างแพร่หลายมาจนถึงปัจจุบันต้องอาศัยเครื่องมือขนาดใหญ่และมีราคาแพง รวมถึงต้องผ่านขั้นตอนต่างๆที่ต้องใช้เวลานาน 2-3 วัน ในการศึกษาครั้งนี้ได้พัฒนาวิธีการผลิตชาเขียวโดยการทำให้แห้งในตู้อบไมโครเวฟปรุงอาหารที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส กำลังไฟฟ้า 800 วัตต์เป็นเวลานาน 3 นาที วิธีการนี้สามารถช่วยทำลายเอนไซม์ PPO ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้ได้ชาเขียวแห้งที่อุดมด้วยสารคะเตชินต่างๆ (โดยเฉพาะอย่างยิ่งสาร EGCG และ ECG) (เรียกว่า microwave green tea) ซึ่งมีปริมาณใกล้เคียงกับชาเขียวที่วางขายตามท้องตลาดทั่วไป (commercial green tea) แต่ใช้เวลาในการผลิตที่สั้นกว่า สะดวกกว่าและประหยัดกว่า

สารสกัดหยาบของผลิตภัณฑ์ชาเขียวไมโครเวฟนี้มีคุณสมบัติในการจับกับธาตุเหล็กได้เป็นอย่างดี ทำให้เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร รองลงมาคือที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร โดยจุลศาสตร์การจับตัวกันระหว่างสารคะเตชินในชาเขียว (green tea catechins) กับไอออนธาตุเหล็กรูปเฟอร์ริก (Fe^{3+}) (ได้แก่ ferric nitrate, ferric citrate และ ferric nitrilotriacetate) เป็นไปในลักษณะที่ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสาร (dose response) และเวลาในการทำปฏิกิริยา (time course) สารคะเตชินในชาเขียวมีการเลือกจำเพาะที่จับกับไอออนเฟอร์ริกมากกว่าไอออนเฟอร์รัส (Fe^{2+}) หากใช้ความเข้มข้นไอออนเฟอร์ริกเกิน 200 ไมโครโมลาร์ การจับตัวกันระหว่างธาตุเหล็กกับสารคะเตชินจะลดลง ซึ่งอาจจะเป็นเพราะว่าสารคะเตชินที่ความเข้มข้นสูงมาก ๆ มีคุณสมบัติเป็น pro-oxidant มากกว่าที่เป็น anti-oxidant และทำให้เกิด redox cycling ขึ้น สารคะเตชินต่างๆที่แยกจากสารสกัดหยาบชาเขียวสามารถจับกับธาตุเหล็กรูปไอออนเฟอร์ริกได้ดีตามลำดับดังนี้ EGCG>ECG>EGC>C ทำให้ได้สารประกอบเชิงซ้อนที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด 560 นาโนเมตร (วัดที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร) และลักษณะการจับตัวกันนี้ก็ขึ้นอยู่กับปริมาณสารคะเตชินต่างๆที่ใช้ การที่สารคะเตชินต่างๆในชาเขียว (โดยเฉพาะอย่างยิ่งสาร EGCG และ ECG) สามารถจับกับธาตุเหล็กได้โดยอาศัยหมู่ไดออล (หรือหมู่ไดไฮดรอกซิล) ที่อยู่บนวงแหวน B และ C ในโมเลกุลฟลาโวนอล นอกจากนี้หมู่แกโลอิลยังมีความสำคัญและมีส่วนร่วมในการจับธาตุเหล็กด้วย

สารสกัดหยาบและสารเคเตซินต่าง ๆ จากชาเขียวสามารถกำจัดธาตุเหล็กกลุ่ม NTBI ที่มีอยู่ในซีรัมผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมียได้ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบชาเขียวและสารเคเตซินต่างๆที่แยกได้ สิ่งหนึ่งที่น่าสนใจคือสาร EGCG และสาร ECG สามารถกำจัด NTBI ได้อย่างมีประสิทธิภาพ สารสกัดหยาบชาเขียว รวมทั้งสาร EGCG และสาร ECG สามารถลดระดับ NTBI ได้อย่างรวดเร็วภายในเวลา 1 ชั่วโมง ภายหลังจากนั้นระดับ NTBI เกือบจะไม่เปลี่ยนแปลงจนถึงเวลา 8 ชั่วโมง สารสกัดหยาบชาเขียว (ความเข้มข้น 0-2.5 กรัมเปอร์เซ็นต์) รวมทั้งสาร EGCG และ ECG (ความเข้มข้น 0-2.5 ไมโครโมลาร์) สามารถกำจัด NTBI ได้ในลักษณะขึ้นอยู่กับความเข้มข้น เป็นที่น่าสังเกตว่าสารสกัดหยาบชาเขียว สาร EGCG และสาร ECG ไม่สามารถกำจัดธาตุเหล็กกลุ่ม NTBI ให้หมดสิ้นสมบูรณ์ได้ แม้ว่าจะใช้เวลาจนถึง 8 ชั่วโมง สารสกัดหยาบชาเขียวที่ความเข้มข้นสูง 5 กรัมเปอร์เซ็นต์ สาร EGCG และ ECG ที่ความเข้มข้นสูง 10 ไมโครโมลาร์ไม่สามารถกำจัดธาตุเหล็กกลุ่ม NTBI ให้หมดสิ้นสมบูรณ์ได้เช่นกัน โดยอธิบายได้ว่าธาตุเหล็ก NTBI มีอยู่หลายรูปแบบในพลาสมาของผู้ป่วยธาลัสซีเมีย ซึ่งอาจมีทั้งรูปที่มีขนาดโมเลกุลเล็ก (low-molecular-weight NTBI) (ได้แก่ ferric citrate และ ferric phosphate) ซึ่งง่ายต่อสาร EGCG และ ECG เข้าจับ และรูปที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ (high-molecular-weight NTBI) (ได้แก่ albumin-bound iron และ ferric oxyhydroxide polymer) ซึ่งยากต่อการเข้าจับโดยสาร EGCG และ ECG อันเนื่องมาจากการบดบังระหว่างโมเลกุลสาร (steric hindrance)

ผลการศึกษาในหลอดทดลองแสดงให้เห็นว่าการเติมสารสกัดหยาบชาเขียวลงไปก่อนและพร้อมกับการกระตุ้นด้วยสารละลายเหล็ก (ferric nitrilotriacetate, ferrous-EDTA และ NTBI) สามารถช่วยป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระในเซลล์เม็ดเลือดแดงของคนได้เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้เติมสารสกัดชาเขียว สาร EGCG และ ECG จากชาเขียวที่เติมลงไปก่อนและพร้อมกับการกระตุ้นด้วยสารละลายเหล็ก (ferric nitrilotriacetate และ ferrous-EDTA) ก็สามารถลดระดับอนุมูลอิสระในเม็ดเลือดแดงได้อย่างมีประสิทธิภาพ การศึกษาในหนูทดลองชี้ให้เห็นว่าการฉีดสารละลายธาตุเหล็กเข้าที่บริเวณช่องท้องเหนี่ยวนำให้มีการสร้างอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมปกติที่ไม่ได้รับสารละลายธาตุเหล็ก การให้หนูทดลองกินสารสกัดหยาบชาเขียว (ความเข้มข้น 5 กรัมเปอร์เซ็นต์) เข้าไปก่อนล่วงหน้า 1 เดือน พร้อมๆกันหรือภายหลัง 1 เดือนที่ได้รับสารละลายธาตุเหล็กเข้าไปมีผลทำให้ระดับอนุมูลอิสระในเม็ดเลือดแดงต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัดชาเขียวอย่างมีนัยสำคัญ และให้ผลเช่นเดียวกับหนูทดลองที่กินยาดีเฟอรัฟิโพรนเข้าไปเป็นเวลานาน 4 เดือน สารสกัดชาเขียวที่ให้หนูทดลองกินเข้าไปก่อนล่วงหน้า 1 เดือน พร้อมๆกันหรือภายหลัง 1 เดือนที่ได้รับสารละลายธาตุเหล็กสามารถลดระดับสารมาลอนไดอัลดีไฮด์ในพลาสมาที่เป็นสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการเกิด lipid peroxidation ได้อย่างชัดเจนเช่นเดียวกับผลในหนูทดลองที่ได้รับยาดีเฟอรัฟิโพรนเข้าไป

เมื่อพิจารณาถึงสภาวะธาตุเหล็กในหนูทดลองที่ถูกกระตุ้นด้วยการฉีดสารละลายธาตุเหล็กเข้าที่บริเวณช่องท้องพบว่า สารสกัดชาเขียวและยาดีเฟอรัฟิโพรนสามารถลดระดับธาตุเหล็ก (plasma iron) และความอิ่มตัวของทรานส์เฟอร์ริน (transferrin saturation) ในพลาสมาของหนูทดลองได้เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัดชาเขียวและยาดีเฟอรัฟิโพรน นอกจากนี้ยังช่วย

ยับยั้งหรือชะลอการปรากฏธาตุเหล็กรูป NTBI ขึ้นในพลาสมาได้อีกด้วย ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่าการกระตุ้นด้วยสารละลายธาตุเหล็กมีผลทำให้ปริมาณอนุมูลอิสระและระดับธาตุเหล็กในหนูทดลองเพิ่มมากขึ้น สารสกัดชาเขียวช่วยยับยั้งหรือป้องกันการเกิดภาวะเหล็กเกินและการสร้างอนุมูลอิสระมากเกินไปในหนูทดลองได้ ทำให้มี NTBI ปรากฏขึ้นในพลาสมาลงได้

สารสเตรบิโตโซซินที่ฉีดเข้าไปในหนูทดลองเหนียวทำให้เซลล์บีตาของตับอ่อนถูกทำลายจนเกิดพยาธิสภาพโรคเบาหวานขึ้นตามมา น้ำหนักตัวของหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับสารสเตรบิโตโซซินอย่างเดียวและกลุ่มที่ได้รับสารสเตรบิโตโซซินร่วมกับสารสกัดชาเขียวมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ แต่ก็ยังมีระดับที่ต่ำกว่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารสกัดชาเขียวอย่างเดียว นอกจากนี้น้ำตาลกลูโคสในพลาสมาของหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับสารสเตรบิโตโซซินอย่างเดียวและกลุ่มที่ได้รับสารสเตรบิโตโซซินร่วมกับสารสกัดชาเขียวมีระดับสูงกว่าในพลาสมาของหนูทดลองกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารสกัดชาเขียวอย่างเดียวกายในระยะเวลา 4 สัปดาห์ จึงสรุปได้ว่าสารสกัดชาเขียวที่หนูทดลองกินเข้าไปไม่สามารถลดหรือควบคุมระดับน้ำตาลกลูโคสในพลาสมาของหนูทดลองที่เป็นโรคเบาหวานได้ภายในช่วงเวลา 4 สัปดาห์ที่ทำการศึกษานี้ และอาจจำเป็นต้องทำการศึกษาผลดังกล่าวในช่วงระยะเวลาที่ยาวนานกว่านี้

การศึกษาวิจัยที่น่าสนใจและดำเนินการต่อไป ควรจะได้ทำการศึกษาชั้นยับยั้งการเกิดภาวะเหล็กเกินและอนุมูลอิสระมากเกินไปโดยสารสกัดชาเขียว สาร EGCG และ ECG ในเซลล์ตับและเซลล์หัวใจซึ่งเป็นอวัยวะสำคัญและมีส่วนได้รับอันตรายตามมา รวมทั้งทำการศึกษาลดน้ำตาลในหนูทดลองที่เป็นโรคธาลัสซีเมีย (thalassemic mice) เพื่อยืนยันและเปรียบเทียบผลที่ได้กับผลการศึกษาในหนูทดลองปกติที่ถูกเหนียวทำให้เกิดภาวะเหล็กเกิน (iron-induced rats) รวมถึงการประเมินผลการศึกษา iron-chelating และ free-radical scavenging activities ของสารสกัดชาเขียว สาร EGCG และ ECG ที่ได้เพื่อนำไปใช้ศึกษาในผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมียต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

1. Lee, S.F., Y.C. Liang, and J.K. Lin, *Inhibition of 1,2,4-benzenetriol-generated active oxygen species and induction of phase II enzymes by green tea polyphenols*. Chem Biol Interact, 1995. 98(3): p. 283-301.
2. Bronner, W.E. and G.R. Beecher, *Method for determining the content of catechins in tea infusions by high-performance liquid chromatography*. J Chromatogr A, 1998. 805(1-2): p. 137-42.
3. Nakagawa, K., et al., *Tea catechin supplementation increases antioxidant capacity and prevents phospholipid hydroperoxidation in plasma of humans*. J Agric Food Chem, 1999. 47(10): p. 3967-73.

4. Toschi, T.G., et al., *The protective role of different green tea extracts after oxidative damage is related to their catechin composition*. J Agric Food Chem, 2000. 48(9): p. 3973-8.
5. Subramanian, N., et al., *Role of polyphenol oxidase and peroxidase in the generation of black tea theaflavins*. J Agric Food Chem, 1999. 47(7): p. 2571-8.
6. Imai, N., et al., [*Protective effect of nitric oxide on ischemic retina*]. Nippon Ganka Gakkai Zasshi, 1997. 101(8): p. 639-43.
7. Sadzuka, Y., T. Sugiyama, and T. Sonobe, *Efficacies of tea components on doxorubicin induced antitumor activity and reversal of multidrug resistance*. Toxicol Lett, 2000. 114(1-3): p. 155-62.
8. Henry, J.P. and P. Stephens-Larson, *Reduction of chronic psychosocial hypertension in mice by decaffeinated tea*. Hypertension, 1984. 6(3): p. 437-44.
9. Dulloo, A.G., et al., *Green tea and thermogenesis: interactions between catechin-polyphenols, caffeine and sympathetic activity*. Int J Obes Relat Metab Disord, 2000. 24(2): p. 252-8.
10. Halder, J. and A.N. Bhaduri, *Protective role of black tea against oxidative damage of human red blood cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. 244(3): p. 903-7.
11. Zhu, Q.Y., et al., *Regeneration of alpha-tocopherol in human low-density lipoprotein by green tea catechin*. J Agric Food Chem, 1999. 47(5): p. 2020-5.
12. Yang, M., C. Wang, and H. Chen, *Green, oolong and black tea extracts modulate lipid metabolism in hyperlipidemia rats fed high-sucrose diet*. J Nutr Biochem, 2001. 12(1): p. 14-20.
13. Ikeda, I., et al., *Tea catechins decrease micellar solubility and intestinal absorption of cholesterol in rats*. Biochim Biophys Acta, 1992. 1127(2): p. 141-6.
14. Yang, T.T. and M.W. Koo, *Hypocholesterolemic effects of Chinese tea*. Pharmacol Res, 1997. 35(6): p. 505-12.
15. Grinberg, L.N., et al., *Protective effects of tea polyphenols against oxidative damage to red blood cells*. Biochem Pharmacol, 1997. 54(9): p. 973-8.
16. Salah, N., et al., *Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants*. Arch Biochem Biophys, 1995. 322(2): p. 339-46.
17. Miura, S., et al., *Effects of various natural antioxidants on the Cu(2+)-mediated oxidative modification of low density lipoprotein*. Biol Pharm Bull, 1995. 18(1): p. 1-4.
18. Miura, Y., et al., *Tea catechins prevent the development of atherosclerosis in apoprotein E-deficient mice*. J Nutr, 2001. 131(1): p. 27-32.

19. Zhang, A., et al., *Inhibitory effects of jasmine green tea epicatechin isomers on free radical-induced lysis of red blood cells*. Life Sci, 1997. 61(4): p. 383-94.
20. Proniuk, S., B.M. Liederer, and J. Blanchard, *Preformulation study of epigallocatechin gallate, a promising antioxidant for topical skin cancer prevention*. J Pharm Sci, 2002. 91(1): p. 111-6.
21. Choi, J.H., B.K. Cha, and S.J. Rhee, *Effects of green tea catechin on hepatic microsomal phospholipase A2 activities and changes of hepatic phospholipid species in streptozotocin-induced diabetic rats*. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo), 1998. 44(5): p. 673-83.
22. Gershbein, L.L. and K. Baburao, *Effect of feeding coffee and its lipids on regenerating and intact liver*. Res Commun Chem Pathol Pharmacol, 1980. 28(3): p. 457-72.
23. Tsuneki, H., et al., *Effect of green tea on blood glucose levels and serum proteomic patterns in diabetic (db/db) mice and on glucose metabolism in healthy humans*. BMC Pharmacol, 2004. 4: p. 18.
24. Murase, T., et al., *Green tea extract improves endurance capacity and increases muscle lipid oxidation in mice*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2005. 288(3): p. R708-15.
25. Murase, T., et al., *Beneficial effects of tea catechins on diet-induced obesity: stimulation of lipid catabolism in the liver*. Int J Obes Relat Metab Disord, 2002. 26(11): p. 1459-64.
26. Waltner-Law, M.E., et al., *Epigallocatechin gallate, a constituent of green tea, represses hepatic glucose production*. J Biol Chem, 2002. 277(38): p. 34933-40.
27. Koyama, Y., et al., *Effects of green tea on gene expression of hepatic gluconeogenic enzymes in vivo*. Planta Med, 2004. 70(11): p. 1100-2.
28. Kooistra, M.P., et al., *Nontransferrin-bound iron in the plasma of haemodialysis patients after intravenous iron saccharate infusion*. Eur J Clin Invest, 2002. 32 Suppl 1: p. 36-41.
29. Cutter, H., et al., *Is the cancer protective effect correlated with growth inhibitions by green tea (-)-epigallocatechin gallate mediated through an antioxidant mechanism?* Cancer Lett, 2001. 162(2): p. 149-54.
30. Garbisa, S., et al., *Tumor gelatinases and invasion inhibited by the green tea flavanol epigallocatechin-3-gallate*. Cancer, 2001. 91(4): p. 822-32.
31. Esposito, B.P., et al., *Labile iron in parenteral iron formulations and its potential for generating plasma nontransferrin-bound iron in dialysis patients*. Eur J Clin Invest, 2002. 32 Suppl 1: p. 42-9.

32. Hershko, C., G. Link, and I. Cabantchik, *Pathophysiology of iron overload*. Ann N Y Acad Sci, 1998. 850: p. 191-201.
33. Kushner, J.P., J.P. Porter, and N.F. Olivieri, *Secondary iron overload*. Hematology (Am Soc Hematol Educ Program), 2001: p. 47-61.
34. Brittenham, G.M., et al., *Clinical Consequences of New Insights in the Pathophysiology of Disorders of Iron and Heme Metabolism*. Hematology (Am Soc Hematol Educ Program), 2000: p. 39-50.
35. Lyon, E. and E.L. Frank, *Hereditary hemochromatosis since discovery of the HFE gene*. Clin Chem, 2001. 47(7): p. 1147-56.
36. Samuni, A., et al., *On the cytotoxicity of vitamin C and metal ions. A site-specific Fenton mechanism*. Eur J Biochem, 1983. 137(1-2): p. 119-24.
37. Chevion, M., *A site-specific mechanism for free radical induced biological damage: the essential role of redox-active transition metals*. Free Radic Biol Med, 1988. 5(1): p. 27-37.
38. Gutteridge, J.M. and B. Halliwell, *Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future*. Ann N Y Acad Sci, 2000. 899: p. 136-47.
39. Rachmilewitz, E.A., *The role of intracellular hemoglobin precipitation, low MCHC, and iron overload on red blood cell membrane peroxidation in thalassemia*. Birth Defects Orig Artic Ser, 1976. 12(8): p. 123-33.
40. Heibel, R.P., et al., *Spontaneous oxygen radical generation by sickle erythrocytes*. J Clin Invest, 1982. 70(6): p. 1253-9.
41. Angelucci, E., et al., *Liver iron overload and liver fibrosis in thalassemia*. Bone Marrow Transplant, 1993. 12 Suppl 1: p. 29-31.
42. Angelucci, E., et al., *Hepatic iron concentration and total body iron stores in thalassemia major*. N Engl J Med, 2000. 343(5): p. 327-31.
43. Cazzola, M., et al., *Biologic and clinical significance of red cell ferritin*. Blood, 1983. 62(5): p. 1078-87.
44. Rocchi, E., et al., *Serum ferritin in the assessment of liver iron overload and iron removal therapy in porphyria cutanea tarda*. J Lab Clin Med, 1986. 107(1): p. 36-42.
45. Wangruangsathit, S., et al., *The correlation of transferrin saturation and ferritin in non-splenectomized thalassemic children*. J Med Assoc Thai, 1999. 82 Suppl 1: p. S74-6.
46. Borgna-Pignatti, C. and A. Castriota-Scanderbeg, *Methods for evaluating iron stores and efficacy of chelation in transfusional hemosiderosis*. Haematologica, 1991. 76(5): p. 409-13.

47. Hershko, C., et al., *Non-specific serum iron in thalassaemia: an abnormal serum iron fraction of potential toxicity*. Br J Haematol, 1978. 40(2): p. 255-63.
48. Halliwell, B., et al., *Bleomycin-detectable iron in serum from leukaemic patients before and after chemotherapy. Therapeutic implications for treatment with oxidant-generating drugs*. FEBS Lett, 1988. 241(1-2): p. 202-4.
49. Bradley, S.J., et al., *Non-transferrin-bound iron induced by myeloablative chemotherapy*. Br J Haematol, 1997. 99(2): p. 337-43.
50. Durken, M., et al., *Nontransferrin-bound iron in serum of patients receiving bone marrow transplants*. Free Radic Biol Med, 1997. 22(7): p. 1159-63.
51. Wickramasinghe, S.N., et al., *Determinants of iron status and bilirubin levels in congenital dyserythropoietic anaemia type I*. Br J Haematol, 1999. 107(3): p. 522-5.
52. Hider, R.C., *Nature of nontransferrin-bound iron*. Eur J Clin Invest, 2002. 32 Suppl 1: p. 50-4.
53. Rooyackers, T.M., et al., *Ferric saccharate induces oxygen radical stress and endothelial dysfunction in vivo*. Eur J Clin Invest, 2002. 32 Suppl 1: p. 9-16.
54. Goddard, J.G. and G.D. Sweeney, *Ferric nitrilotriacetate: a potent stimulant of in vivo lipid peroxidation in mice*. Biochem Pharmacol, 1983. 32(24): p. 3879-82.
55. Gutteridge, J.M., et al., *Low-molecular-weight iron complexes and oxygen radical reactions in idiopathic haemochromatosis*. Clin Sci (Lond), 1985. 68(4): p. 463-7.
56. Porter, J.B., et al., *Kinetics of removal and reappearance of non-transferrin-bound plasma iron with deferoxamine therapy*. Blood, 1996. 88(2): p. 705-13.
57. Kontoghiorghes, G.J., et al., *Deferiprone for thalassaemia*. Lancet, 2000. 356(9227): p. 428-9.
58. Giardina, P.J. and R.W. Grady, *Chelation therapy in beta-thalassemia: an optimistic update*. Semin Hematol, 2001. 38(4): p. 360-6.
59. Wapnick, A.A., et al., *The effect of ascorbic acid deficiency on desferrioxamine-induced urinary iron excretion*. Br J Haematol, 1969. 17(6): p. 563-8.
60. De Luca d'Alessandro, E., S. Chiaradia, and L. Martinoli, *Serum iron in young athletes: preliminary results*. Ann Ig, 1999. 11(3): p. 187-91.
61. Cighetti, G., et al., *Oxidative status and malondialdehyde in beta-thalassaemia patients*. Eur J Clin Invest, 2002. 32 Suppl 1: p. 55-60.
62. Pippard, M.J., *Desferrioxamine-induced iron excretion in humans*. Baillieres Clin Haematol, 1989. 2(2): p. 323-43.
63. Hussain, M.A., et al., *Effect of dose, time, and ascorbate on iron excretion after subcutaneous desferrioxamine*. Lancet, 1977. 1(8019): p. 977-9.

64. Nisbet-Brown, E., et al., *Effectiveness and safety of ICL670 in iron-loaded patients with thalassaemia: a randomised, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation trial*. *Lancet*, 2003. 361(9369): p. 1597-602.
65. Neufeld, E.J., *Oral chelators deferasirox and deferiprone for transfusional iron overload in thalassemia major: new data, new questions*. *Blood*, 2006.
66. Singh, S., R.C. Hider, and J.B. Porter, *Separation and identification of desferrioxamine and its iron chelating metabolites by high-performance liquid chromatography and fast atom bombardment mass spectrometry: choice of complexing agent and application to biological fluids*. *Anal Biochem*, 1990. 187(2): p. 212-9.
67. Porter, J.B., et al., *Recent insights into interactions of deferoxamine with cellular and plasma iron pools: implications for clinical use*. *Ann N Y Acad Sci*, 2005. 1054: p. 155-68.
68. Gyparaki, M., et al., *In vivo evaluation of hydroxypyridone iron chelators in a mouse model*. *Acta Haematol*, 1987. 78(2-3): p. 217-21.
69. Kontoghiorghes, G.J., *2-Hydroxypyridine-N-oxides: effective new chelators in iron mobilisation*. *Biochim Biophys Acta*, 1987. 924(1): p. 13-8.
70. Kontoghiorghes, G.J., *The effect of 2,4-dihydroxypyridine-N-oxide, a new orally active iron chelator, on iron excretion in mice*. *Clin Chim Acta*, 1987. 163(2): p. 137-41.
71. Hoyes, K.P., et al., *In vivo and in vitro effects of 3-hydroxypyridin-4-one chelators on murine hemopoiesis*. *Exp Hematol*, 1993. 21(1): p. 86-92.
72. Sakata, I., et al., *[Quantitative analysis of (-)-epigallocatechin gallate in tea leaves by high-performance liquid chromatography]*. *Yakugaku Zasshi*, 1991. 111(12): p. 790-3.
73. Cabrera, C., R. Gimenez, and M.C. Lopez, *Determination of tea components with antioxidant activity*. *J Agric Food Chem*, 2003. 51(15): p. 4427-35.
74. Kumar, N.S. and M. Rajapaksha, *Separation of catechin constituents from five tea cultivars using high-speed counter-current chromatography*. *J Chromatogr A*, 2005. 1083(1-2): p. 223-8.
75. Baruah, A.M. and P.K. Mahanta, *Fermentation characteristics of some assamica clones and process optimization of black tea manufacturing*. *J Agric Food Chem*, 2003. 51(22): p. 6578-88.
76. Gulati, A., et al., *Application of microwave energy in the manufacture of enhanced-quality green tea*. *J Agric Food Chem*, 2003. 51(16): p. 4764-8.

77. Nakai, M., et al., *Inhibitory effects of oolong tea polyphenols on pancreatic lipase in vitro*. J Agric Food Chem, 2005. 53(11): p. 4593-8.
78. Garg, A.K., T.A. Buchholz, and B.B. Aggarwal, *Chemosensitization and radiosensitization of tumors by plant polyphenols*. Antioxid Redox Signal, 2005. 7(11-12): p. 1630-47.
79. Xu, C., C.Y. Li, and A.N. Kong, *Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics*. Arch Pharm Res, 2005. 28(3): p. 249-68.
80. Arts, I.C., B. van De Putte, and P.C. Hollman, *Catechin contents of foods commonly consumed in The Netherlands. 2. Tea, wine, fruit juices, and chocolate milk*. J Agric Food Chem, 2000. 48(5): p. 1752-7.
81. Khokhar, S. and S.G. Magnúsdóttir, *Total phenol, catechin, and caffeine contents of teas commonly consumed in the United Kingdom*. J Agric Food Chem, 2002. 50(3): p. 565-70.
82. Chiu, F.L. and J.K. Lin, *HPLC analysis of naturally occurring methylated catechins, 3'- and 4'-methyl-epigallocatechin gallate, in various fresh tea leaves and commercial teas and their potent inhibitory effects on inducible nitric oxide synthase in macrophages*. J Agric Food Chem, 2005. 53(18): p. 7035-42.
83. Yao, L., et al., *Seasonal variations of phenolic compounds in Australia-grown tea (Camellia sinensis)*. J Agric Food Chem, 2005. 53(16): p. 6477-83.
84. Lin, Y.S., et al., *Factors affecting the levels of tea polyphenols and caffeine in tea leaves*. J Agric Food Chem, 2003. 51(7): p. 1864-73.
85. Manning, J. and J.C. Roberts, *Analysis of catechin content of commercial green tea products*. J Herb Pharmacother, 2003. 3(3): p. 19-32.
86. Stach, D. and O.J. Schmitz, *Decrease in concentration of free catechins in tea over time determined by micellar electrokinetic chromatography*. J Chromatogr A, 2001. 924(1-2): p. 519-22.
87. Samman, S., et al., *Green tea or rosemary extract added to foods reduces nonheme-iron absorption*. Am J Clin Nutr, 2001. 73(3): p. 607-12.
88. Anghileri, L.J. and P. Thouvenot, *Natural polyphenols-iron interaction: its biological importance*. Biol Trace Elem Res, 2000. 73(3): p. 251-8.
89. Mandel, S.A., et al., *Multifunctional activities of green tea catechins in neuroprotection. Modulation of cell survival genes, iron-dependent oxidative stress and PKC signaling pathway*. Neurosignals, 2005. 14(1-2): p. 46-60.

90. Mandel, S., et al., *Green tea catechins as brain-permeable, natural iron chelators-antioxidants for the treatment of neurodegenerative disorders*. *Mol Nutr Food Res*, 2006. 50(2): p. 229-34.
91. Hayakawa, F., et al., *Prooxidative activities of tea catechins in the presence of Cu²⁺*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2004. 68(9): p. 1825-30.
92. Katiyar, S.K., et al., *Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate treatment of human skin inhibits ultraviolet radiation-induced oxidative stress*. *Carcinogenesis*, 2001. 22(2): p. 287-94.
93. Katiyar, S.K. and H. Mukhtar, *Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate treatment to mouse skin prevents UVB-induced infiltration of leukocytes, depletion of antigen-presenting cells, and oxidative stress*. *J Leukoc Biol*, 2001. 69(5): p. 719-26.
94. Skrzydlewska, E., et al., *Protective effect of green tea against lipid peroxidation in the rat liver, blood serum and the brain*. *Phytomedicine*, 2002. 9(3): p. 232-8.
95. Jimenez-Lopez, J.M. and A.I. Cederbaum, *Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate protects HepG2 cells against CYP2E1-dependent toxicity*. *Free Radic Biol Med*, 2004. 36(3): p. 359-70.
96. Elbling, L., et al., *Green tea extract and (-)-epigallocatechin-3-gallate, the major tea catechin, exert oxidant but lack antioxidant activities*. *Faseb J*, 2005. 19(7): p. 807-9.
97. Rizvi, S.I., et al., *Protective role of tea catechins against oxidation-induced damage of type 2 diabetic erythrocytes*. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2005. 32(1-2): p. 70-5.
98. Singal, A., et al., *Green tea extract and catechin ameliorate chronic fatigue-induced oxidative stress in mice*. *J Med Food*, 2005. 8(1): p. 47-52.
99. Choi, Y.T., et al., *The green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate attenuates beta-amyloid-induced neurotoxicity in cultured hippocampal neurons*. *Life Sci*, 2001. 70(5): p. 603-14.
100. Nagao, T., et al., *Ingestion of a tea rich in catechins leads to a reduction in body fat and malondialdehyde-modified LDL in men*. *Am J Clin Nutr*, 2005. 81(1): p. 122-9.
101. Hirano-Ohmori, R., et al., *Green tea consumption and serum malondialdehyde-modified LDL concentrations in healthy subjects*. *J Am Coll Nutr*, 2005. 24(5): p. 342-6.

102. Gorelik, S., et al., *Lipid peroxidation and coupled vitamin oxidation in simulated and human gastric fluid inhibited by dietary polyphenols: health implications*. J Agric Food Chem, 2005. 53(9): p. 3397-402.
103. Mitamura, T., et al., [*The influence of green tea upon the improvement of iron deficiency anemia with pregnancy treated by sodium ferrous citrate*]. Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi, 1989. 41(6): p. 688-94.
104. Blache, D., et al., (+)-Catechin inhibits platelet hyperactivity induced by an acute iron load in vivo. Free Radic Biol Med, 2002. 33(12): p. 1670-80.
105. Yang, J.A., J.H. Choi, and S.J. Rhee, *Effects of green tea catechin on phospholipase A2 activity and antithrombus in streptozotocin-diabetic rats*. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo), 1999. 45(3): p. 337-46.
106. Vinson, J.A. and J. Zhang, *Black and green teas equally inhibit diabetic cataracts in a streptozotocin-induced rat model of diabetes*. J Agric Food Chem, 2005. 53(9): p. 3710-3.
107. Mustata, G.T., et al., *Paradoxical effects of green tea (Camellia sinensis) and antioxidant vitamins in diabetic rats: improved retinopathy and renal mitochondrial defects but deterioration of collagen matrix glycoxidation and cross-linking*. Diabetes, 2005. 54(2): p. 517-26.

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้ทำการวิจัยขอขอบคุณมูลนิธิโครงการหลวงที่ได้อนุมัติจัดสรรงบประมาณทุนวิจัยในการศึกษาทำวิจัยนี้ รวมทั้งขอแสดงความขอบคุณเจ้าหน้าที่มูลนิธิโครงการหลวงแผนกการเงิน ฝ่ายวิจัย ศูนย์ผลิตชาดอยอ่างขางและปางตะ ตลอดจนแผนกยานพาหนะทุกท่านที่ได้มีส่วนร่วมและอำนวยความสะดวก ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงลงได้ตามเวลาและวัตถุประสงค์ทุกประการ