

3. ผลการทดลองและวิจารณ์

3.1 การเตรียม LDL จากพลาสมา

3.1.1 การเตรียมพลาสมาจากเลือดคนปกติ

จากตัวอย่างเลือดคนปกติปริมาตร 20 มิลลิลิตร สามารถแยกพลาสมาโดยวิธีการปั่นเหวี่ยงตามที่ระบุไว้ในหัวข้อ 2.1.1 ออกมาได้ 9 ± 0.8 มิลลิลิตร ($X \pm S.D.$, $n = 20$) หรือประมาณ 45% โดยปริมาตรของเลือดที่นำมาใช้แยก พลาสมาเหล่านี้มีระดับคอเลสเตอรอลเฉพาะที่อยู่ใน LDL ของผู้ชายระหว่าง 152 ถึง 196 mg% และของผู้หญิงระหว่าง 130 ถึง 184 mg% ซึ่งนับว่าอยู่ในเกณฑ์ปกติทั้งหมด เมื่อเทียบกับค่าปกติที่ใช้อ้างอิงจากห้องปฏิบัติการเคมีคลินิก โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ คือ 66-202 mg% และ 57-186 mg% สำหรับผู้ชาย และผู้หญิง ที่มีอายุ 20-49 ปี ตามลำดับ

3.1.2 การแยก LDL จากพลาสมา

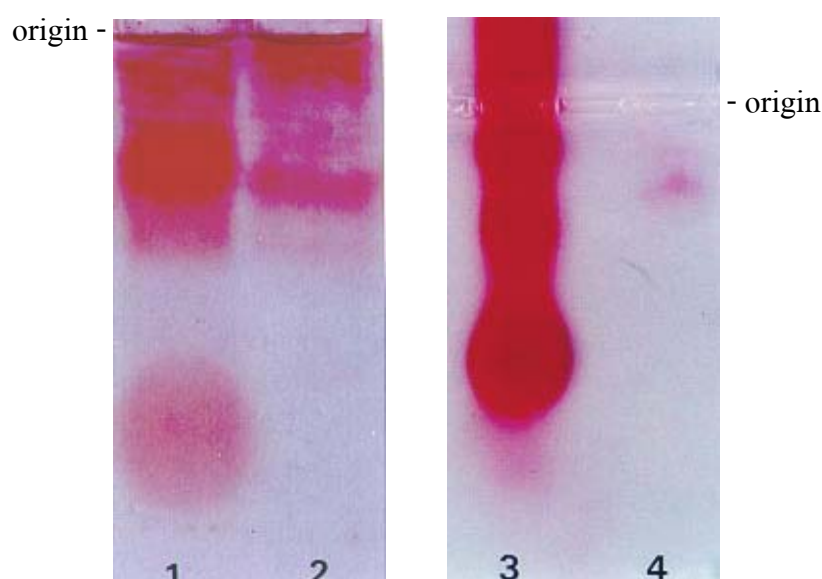
เมื่อนำพลาสมา มาแยก LDL ตามวิธีการที่ระบุในหัวข้อ 2.1.2 ซึ่งใช้เวลาปั่นแยกพลาสมาสั้นกว่าวิธีการแบบเดิม (conventional sequential-ultracentrifugation method) ของ Havel และคณะ (1955) มาก ทำให้ LDL ที่แยกได้ไม่สูญเสียสารต้านออกซิเดชันต่าง ๆ ที่อยู่ภายในโมเลกุล (endogenous antioxidants) โดยเฉพาะวิตามินอีไปมากในระหว่างขั้นตอนการแยก (Kleinvelde *et al.*, 1992) จากการศึกษาที่พบว่า เมื่อนำพลาสมา มาแยก LDL โดยวิธีของ Kleinvelde และคณะ (1992) สามารถเตรียมเป็นสารละลาย LDL ปริมาตร 6.5 ± 0.7 มิลลิลิตร ที่มีปริมาณโปรตีน และ คอเลสเตอรอลอยู่ 5.3 ± 1.9 และ 9.3 ± 1.3 มิลลิกรัม ตามลำดับ หรือเทียบเป็นอัตราส่วนได้ 1 : 1.75 ซึ่งใกล้เคียงกับค่าอัตราส่วนของโปรตีนต่อคอเลสเตอรอลที่พบใน LDL คนปกติคือ 1 : 1.8 [มีโปรตีน และ คอเลสเตอรอล อยู่ในปริมาณ 25 และ 45% ตามลำดับ (มนตรี จุฬาวัดนทล และคณะ, 2542)] ดังนั้น ถ้าตัวอย่างที่เตรียมได้เหล่านี้ประกอบด้วย LDL เพียงอย่างเดียว เมื่อนำค่าของปริมาณคอเลสเตอรอลในแต่ละตัวอย่างที่เตรียมได้มาคำนวณ

เทียบเป็นปริมาณ LDL แล้วหาค่าเฉลี่ย พบว่า เท่ากับ 20.7 ± 4.8 มิลลิกรัม จากพลาสมาของผู้ชาย และ 18.6 ± 2.3 มิลลิกรัม จากพลาสมาของผู้หญิง หรือประมาณ 85% และ 84% ของปริมาณ LDL ทั้งหมดในพลาสมา (ปริมาตร 6.4 มิลลิลิตร) ที่นำมาใช้เตรียมตามลำดับ โดยเทียบจากค่าเฉลี่ยของระดับ LDL ในพลาสมาของกลุ่มผู้ชายคือ 378 ± 31 mg% และของกลุ่มผู้หญิงคือ 344 ± 18 mg%

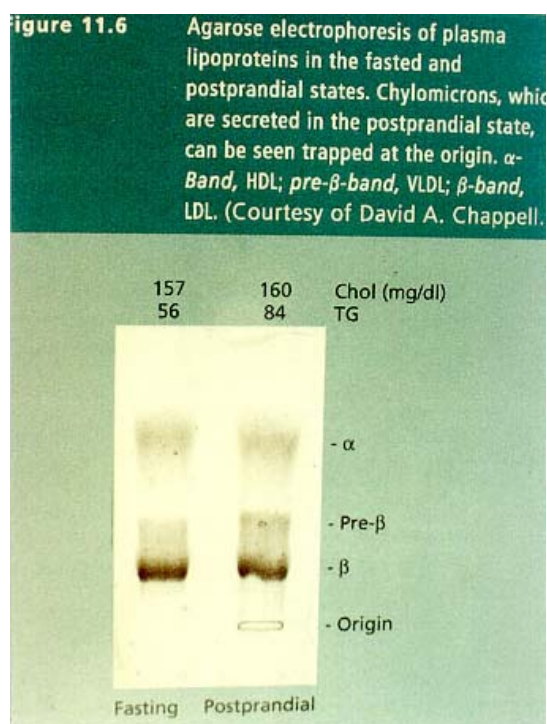
3.2 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ LDL ที่เตรียมได้

เมื่อนำสารละลาย LDL ที่เตรียมได้จากหัวข้อ 3.1.2 มาทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส เพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ ตามวิธีการที่ระบุไว้ในหัวข้อ 2.5.1 ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 13 ซึ่งพบว่า ในตัวอย่าง LDL มีแถบที่ติดสีแดงเข้มเมื่อย้อมแผ่นเจลด้วย Fat red 7B และ Ponceau S อยู่ตรงกันเพียงแถบเดียว ขณะที่ในพลาสมาปรากฏแถบโปรตีนที่ติดสี Ponceau S ชัดเจนหลายแถบ แต่มีแถบที่ติดสี Fat red 7B ซึ่งแสดงว่าเป็นแถบของไลโปโปรตีนอยู่เพียง 3 แถบเท่านั้น โดยแถบที่อยู่บนสุดและติดสีย้อมเข้มที่สุดได้แก่ LDL ส่วนที่อยู่ถัดลงมาซึ่งไม่ปรากฏเป็นแถบชัดเจนเหมือนกับ LDL คือ VLDL และ HDL ตามลำดับ ในขณะที่โคโลไมครอนซึ่งประกอบด้วยไขมันที่ไม่มีหัวเป็นจำนวนมาก และมีปริมาณโปรตีนอยู่เพียง 2% (พรทิพย์ โล่ห์เลขา, 2536) ไม่สามารถเคลื่อนที่ลงมาได้โดยสังเกตจากการติดสีแดงของ Fat red 7B ณ บริเวณจุดเริ่มต้น เช่นเดียวกับผลการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของไลโปโปรตีนในพลาสมาที่ปรากฏในเอกสารอ้างอิง (Montgomery *et al.*, 1996) ดังแสดงในรูปที่ 14 อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบตำแหน่งของแถบ LDL ในตัวอย่างที่แยกได้กับแถบ LDL ในพลาสมาแล้ว พบว่า อยู่ตรงบริเวณเดียวกัน ต่อมาเมื่อนำตัวอย่างทั้งสองชนิดดังกล่าวมาทดลองแยกด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสซึ่งเป็นวิธีการที่แยกโปรตีนออกจากกันตามขนาดโมเลกุลได้ละเอียดกว่าการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (บังอร ณ พัทลุง, 2526) พบว่า สามารถแยกแถบ LDL กับ แถบ VLDL ในตัวอย่างพลาสมาออกจากกันได้ โดย VLDL สามารถเคลื่อนที่ได้ไกลกว่า LDL เล็กน้อย ทั้งนี้เนื่องจาก LDL ประกอบด้วย Apo B-100 ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงถึง 550,000 ดาลตัน (Dalton) (Knott *et al.*, 1986) เป็นส่วนใหญ่ จึงทำให้สามารถเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าได้ช้ากว่า

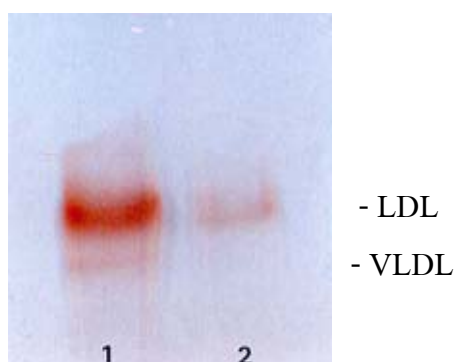
นั่นเอง อย่างไรก็ตาม ในตัวอย่าง LDL ที่แยกได้ยังคงปรากฏแถบย้อมติดสีส้มของ Oil red O เพียงแถบเดียวอยู่ที่ตำแหน่งตรงกับแถบ LDL ในตัวอย่างพลาสมา ดังแสดงในรูปที่ 15 ซึ่งแสดงว่า LDL ที่เตรียมได้มีความบริสุทธิ์เพียงพอที่จะใช้ในการทดลองต่อไป



รูปที่ 13 แบบแผนของแถบไลโปโปรตีนจากการทำอะกาโรสเจลอเล็กโทรโฟริซิสของพลาสมาที่มี LDL อยู่ประมาณ 65 ไมโครกรัม และมีปริมาณโปรตีนรวม 1,050 ไมโครกรัม (แถวที่ 1) กับตัวอย่าง LDL ที่เตรียมได้ปริมาณ 43 ไมโครกรัม (มีโปรตีนอยู่ 10.75 ไมโครกรัม) (แถวที่ 2) ซึ่งย้อมด้วยสี Fat red 7B เปรียบเทียบกับ แบบแผนที่ได้จากการย้อมแถบโปรตีนด้วยสี Ponceau S ของพลาสมาตัวอย่างเดียวกันกับแถวที่ 1 (แถวที่ 3) กับ LDL ตัวอย่างเดียวกันกับแถวที่ 2 (แถวที่ 4)



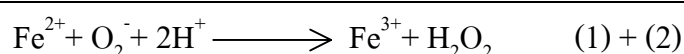
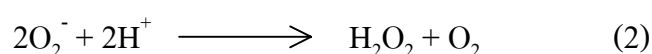
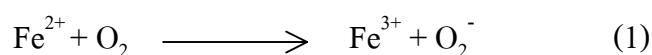
รูปที่ 14 ตัวอย่างของแบบแผนแถบไลโปโปรตีนจากการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของพลาสมาคนปกติที่อดอาหารเป็นเวลา 8-12 ชั่วโมง (fasting) และไม่ได้อดอาหาร (postprandial) (Montgomery *et al.*, 1996)



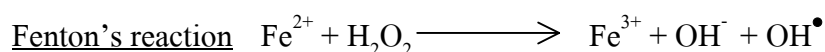
รูปที่ 15 แบบแผนของแถบไลโปโปรตีนจากการทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสซึ่งย้อมด้วยสี Oil red O เปรียบเทียบระหว่างพลาสมาที่มี LDL อยู่ประมาณ 57 ไมโครกรัม (แถวที่ 1) กับตัวอย่าง LDL ที่เตรียมได้ ปริมาณ 34 ไมโครกรัม (แถวที่ 2)

3.3 การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาออกซิเดชันของ LDL โดยมี Fe^{2+} เป็นตัวเหนี่ยวนำ

จากหลักฐานที่แสดงว่า Fe^{2+} ที่อยู่ภายใน intima อาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการออกซิเดชันของไขมันใน LDL ที่สะสมอยู่ในผนังหลอดเลือดได้ (Kritharides *et al.*, 1995 อ้างโดย Abuja *et al.*, 1999) เนื่องจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของ Fe^{2+} (Fe^{2+} auto-oxidation) จะให้ H_2O_2 (ดังสมการข้างล่าง)



ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยา Fenton ต่อไป เกิดเป็นอนุมูล OH^\bullet ที่มีความว่องไวสูง (Halliwell, 1999) ดังแสดงข้างล่าง



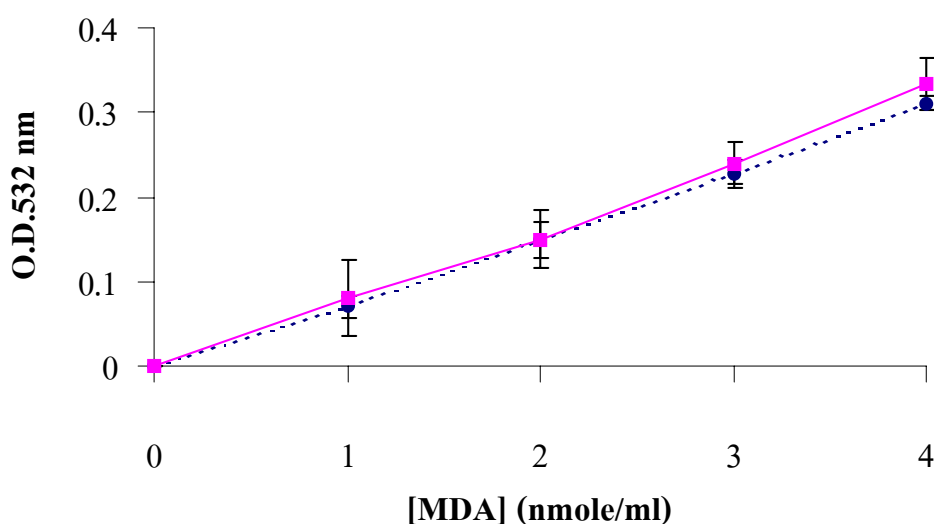
ดังนั้นในการศึกษานี้จึงเลือกใช้ Fe^{2+} สำหรับก่อปฏิกิริยาออกซิเดชันของ LDL ที่เตรียมได้จากหัวข้อ 3.1.2 โดยทำการหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยาก่อนนำไปทดสอบกับสารสกัดจากมะพูดต่อไป

3.3.1 ผลของปริมาณ LDL

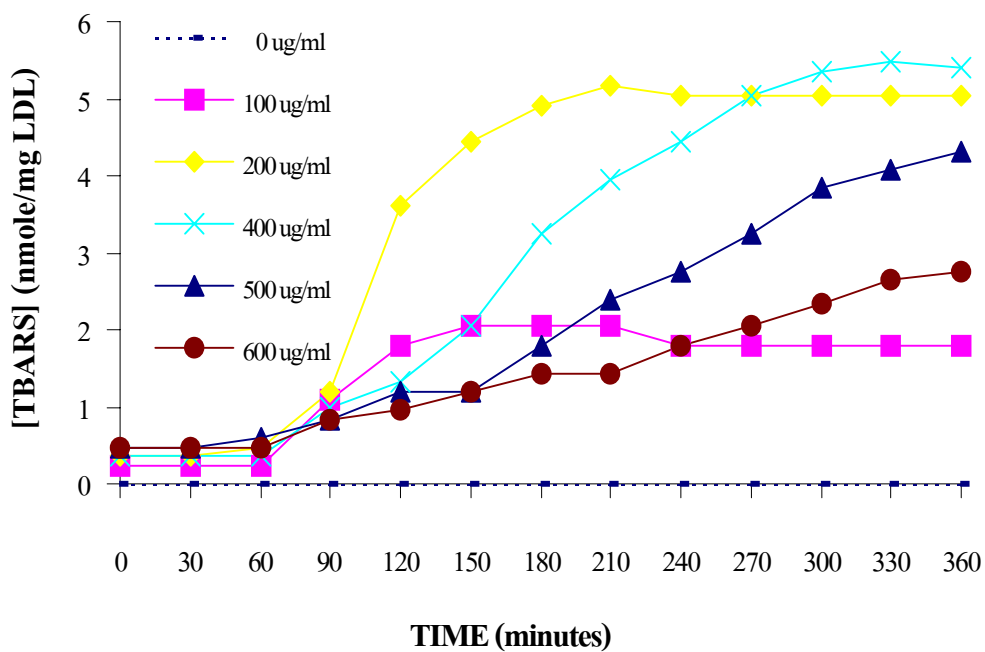
ศึกษาผลของปริมาณ LDL ต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันเมื่อใช้ $FeSO_4$ โดยบ่ม LDL ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันคือ 0, 100, 200, 400, 500 และ 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กับ 30 μM $FeSO_4$ ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับใช้ทำปฏิกิริยากับ LDL 200 ไมโครลิตร ตามที่ระบุโดย Pitaknantakul (1998) ในสารละลาย 10 mM PBS pH 7.4 ที่ 37⁰ซ แล้วติดตามปริมาณ TBARS ที่เกิดขึ้นโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของ MDA (รูปที่ 16) ทุก ๆ 30 นาที จนครบ 6 ชั่วโมงตามวิธีการในหัวข้อ 2.6.1 ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 17 ซึ่งพบว่า ในชุดทดลองที่ไม่มี LDL นั้น มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 532 นาโนเมตรเท่ากับชุดควบคุมซึ่งไม่มีทั้ง LDL และ $FeSO_4$ อยู่เลย (blank) แสดงว่า $FeSO_4$ ไม่ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นดังกล่าว ในขณะที่ทุกชุดทดลองที่มี LDL ในปริมาณต่าง ๆ กัน พบมี TBARS เกิดขึ้นในลักษณะที่แบ่งได้เป็น 3 ช่วง (phase) ซึ่งเห็นได้

ชัดเจนในปฏิกิริยาที่มีความเข้มข้นของ LDL เท่ากับ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยในช่วงแรก (lag phase) TBARS อยู่ในระดับต่ำและค่อนข้างคงที่ ซึ่งเป็นระยะที่ปฏิกิริยาถูกยับยั้งไว้ด้วยฤทธิ์ของสารต้านออกซิเดชันต่าง ๆ ที่อยู่ภายในโมเลกุล LDL ไม่ว่าจะเป็นวิตามินอี, บีตาแคโรทีน (β -carotene), lycopene, retinylstearate และ phytofluene เป็นต้น (Esterbauer *et al.*, 1990 อ้างโดย Kleinveld *et al.*, 1992) ส่วนช่วงกลาง (propagation phase) เกิดขึ้นหลังจากสารต้านออกซิเดชันภายใน LDL ถูกใช้จนหมดแล้ว จึงทำให้มี TBARS เกิดเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ อย่างต่อเนื่องจนถึงระดับสูงสุดซึ่งแสดงว่ามี TBARS เกิดขึ้นเต็มที่แล้ว จากนั้นจึงค่อย ๆ ลดระดับลงอย่างช้า ๆ ในช่วงสุดท้าย (decomposition phase) เมื่อนำระดับ TBARS ที่เกิดขึ้นสูงสุด (T_{max}) และค่า T_{lag} (lag time) ซึ่งคำนวณจากจุดตัดระหว่างเส้นสัมผัสของ propagation phase กับเส้นขนานแกนอนที่ลากจากจุดเริ่มต้นของแต่ละปฏิกิริยา (ภาคผนวก 5) มาเปรียบเทียบกัน ดังแสดงในรูปที่ 18 พบว่า ค่า T_{lag} ของปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ LDL ซึ่งเป็นผลจากการยับยั้งของสารต้านออกซิเดชันภายในโมเลกุลที่เพิ่มขึ้นตามปริมาณ LDL นั้นเอง อย่างไรก็ตาม การที่ TBARS สูงสุดจากปฏิกิริยาของ LDL ที่ความเข้มข้น 500 และ 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อครบ 6 ชั่วโมง มีค่าลดลงนั้น น่าจะเป็นเพราะปฏิกิริยายังดำเนินไปไม่ถึงช่วงสุดท้ายโดยสังเกตจากกราฟในรูปที่ 17 ถึงแม้ LDL ที่ความเข้มข้น 200 กับ 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะมี T_{max} อยู่ในระดับสูงไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) แต่เมื่อกลับไปพิจารณาผลการทดลองในรูปที่ 17 พบว่า LDL 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ถูกออกซิไดส์โดย $30 \mu\text{M FeSO}_4$ ในอัตราสูงกว่า LDL ที่ความเข้มข้น 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เนื่องจาก propagation phase ของปฏิกิริยาใช้เวลาแค่ 2 ชั่วโมงเท่านั้น ในขณะที่ปฏิกิริยาออกซิเดชันของ LDL 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้เวลานานถึง 3.5 ชั่วโมง ดังนั้นจึงเลือกใช้ความเข้มข้นของ LDL ที่ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในการทดลองต่อไป อย่างไรก็ตาม เป็นที่น่าสังเกตว่า LDL ที่เตรียมได้จากแต่ละบุคคล ถูกออกซิไดส์โดย Fe^{2+} ได้ยากง่าย (susceptibility to oxidation) ไม่เท่ากัน ซึ่งสันนิษฐานว่า เกิดจากความแตกต่างของปริมาณสารต้านออกซิเดชันภายใน LDL นั้นเอง ทั้งนี้เคยมีผู้ตั้งข้อสังเกตเกี่ยวกับเรื่องนี้ว่า อาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับพฤติกรรมกรบริโภค เนื่องจาก LDL ของผู้ที่ได้รับวิตามินอีเป็นอาหารเสริม ถูกออกซิไดส์ได้ยากกว่าปกติ (Esterbauer *et al.*, 1991

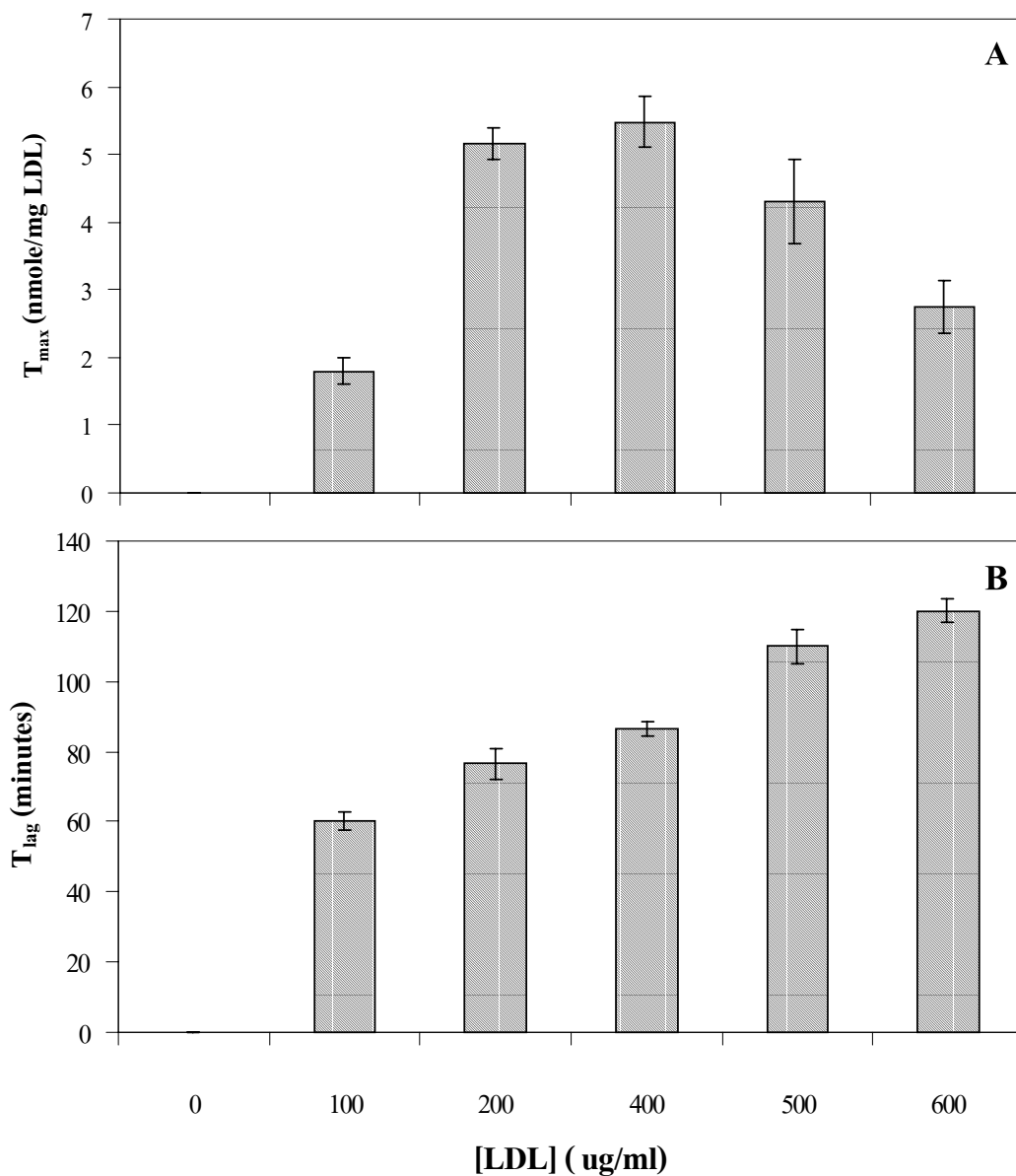
อ้างอิงโดย Kleinvelde *et al.*, 1992: Jialal and Grundy, 1992) รวมทั้ง LDL ของผู้ที่รับประทานผัก และผลไม้เป็นประจำ ก็มีแนวโน้มถูกออกซิไดส์ได้ยากเช่นกัน เนื่องจากการสะสมของสารบิตาแคโรทีนใน LDL ของผู้คนกลุ่มดังกล่าว (Miller III *et al.*, 1998) และเมื่อเร็ว ๆ นี้ ยังมีรายงานจากไต้หวันว่า LDL ของผู้ที่รับประทานมังสวิรัต (vegeterians) มีความสามารถต้านออกซิเดชันโดย Cu^{2+} ได้ดีกว่า LDL ของผู้ที่รับประทานทั้งพืช และเนื้อสัตว์ (omnivores) (Lu *et al.*, 2000) ดังนั้นในขั้นตอนต่อไป จึงต้องใช้ตัวอย่างชุดเดียวกัน หรือพยายามเลือกใช้ตัวอย่างที่ให้ผลการออกซิเดชันใกล้เคียงกับการทดลองนี้มากที่สุด



รูปที่ 16 กราฟมาตรฐานของ MDA ที่ได้จากการเตรียมสารละลาย MDA ในสารละลาย 50 mM H_2SO_4 (—) เปรียบเทียบกับสารละลาย MDA ใน 50 mM H_2SO_4 ที่มี 2% (v/v) เอทานอล อยู่ด้วย (-----)
[ผลที่แสดงในกราฟเป็นค่าเฉลี่ย ($\bar{X} \pm \text{S.D}$) ที่ได้จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง]



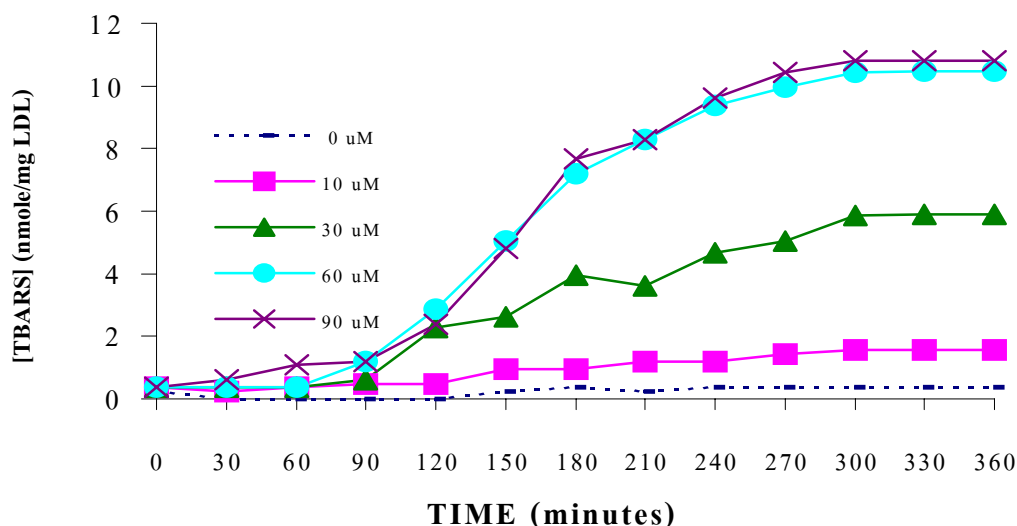
รูปที่ 17 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลา กับระดับของ TBARS ที่เกิดขึ้นจาก
ปฏิกิริยาออกซิเดชัน LDL ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เมื่อใช้ $30 \mu\text{M FeSO}_4$



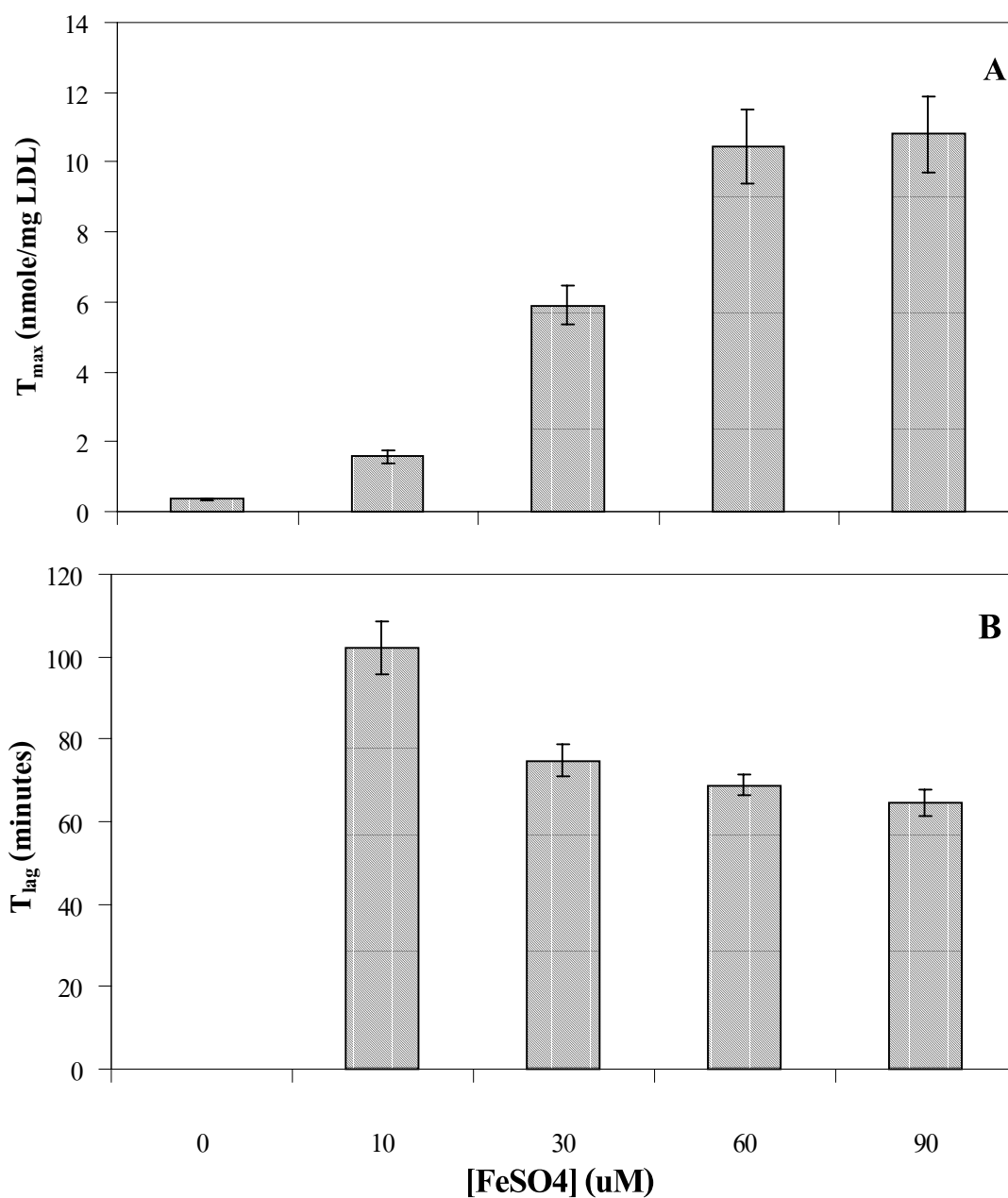
รูปที่ 18 กราฟแสดงระดับเฉลี่ยของ TBARS สูงสุด (A) และ ค่า lag time (B) เมื่อใช้ LDL ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ทำปฏิกิริยากับ 30 μ M FeSO₄
 [หมายเหตุ - ผลที่แสดงในกราฟ เป็นค่าเฉลี่ย ($\bar{X} \pm S.D.$) ที่ได้จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ของตัวอย่างเดียวกัน
 - N.D. หมายถึง หาค่าไม่ได้

3.1.2 ผลของปริมาณ FeSO_4

จากการป่ม LDL ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กับ FeSO_4 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน คือ 0, 10, 30, 60 และ 90 μM ในสารละลาย 10 mM PBS pH 7.4 ที่ 37°C แล้วติดตามปริมาณ TBARS ที่เกิดขึ้น ทุก ๆ 30 นาที จนครบ 6 ชั่วโมง ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 19 ซึ่งพบว่า ในชุดทดลองที่ไม่ได้เติม FeSO_4 นั้น สามารถตรวจพบ TBARS ในระดับต่ำ ๆ และค่อนข้างคงที่ ตลอด 6 ชั่วโมงของการติดตามวัดปริมาณ แสดงว่า LDL บางส่วนเกิดการสลายตัวโดยออกซิเจนจากออกซิเจนในอากาศระหว่างเก็บไว้ใช้งาน ในขณะที่ทุกชุดทดลองที่มี FeSO_4 อยู่ด้วย มี TBARS เกิดขึ้นในลักษณะ 3 ช่วง คือ lag phase, propagation phase และ decomposition phase ตามที่ได้กล่าวมาแล้ว เมื่อนำระดับ TBARS ที่เกิดขึ้นสูงสุด และค่า lag time ของแต่ละปฏิกิริยามาเปรียบเทียบกันดังแสดงในรูปที่ 20 พบว่า ระดับ T_{max} เพิ่มขึ้น ในขณะที่ค่า T_{lag} ลดลงตามลำดับความเข้มข้นจากน้อยไปมากของ FeSO_4 ในปฏิกิริยา โดย FeSO_4 ที่ความเข้มข้น 60 μM กับ 90 μM ให้ผลการทดลองซึ่งใกล้เคียงกันมาก ($P > 0.05$) ดังนั้นจึงเลือกใช้ความเข้มข้นของ FeSO_4 เท่ากับ 60 μM ในการทดลองต่อไป



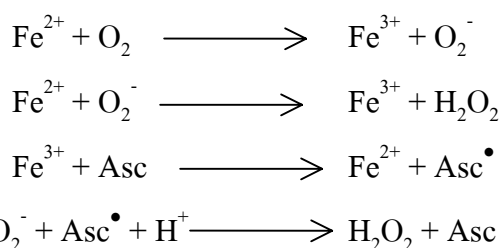
รูปที่ 19 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับระดับของ TBARS ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของ LDL โดยใช้ FeSO_4 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน



รูปที่ 20 กราฟแสดงระดับเฉลี่ยของ TBARS สูงสุด (A) และ ค่า lag time (B) ที่เกิดจากการใช้ FeSO₄ ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน
 [หมายเหตุ - ผลที่แสดงในกราฟ เป็นค่าเฉลี่ย (X ± S.D.) ที่ได้จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ของตัวอย่างชุดเดียวกับในรูปที่ 18
 - N.D. หมายถึง หาค่าไม่ได้]

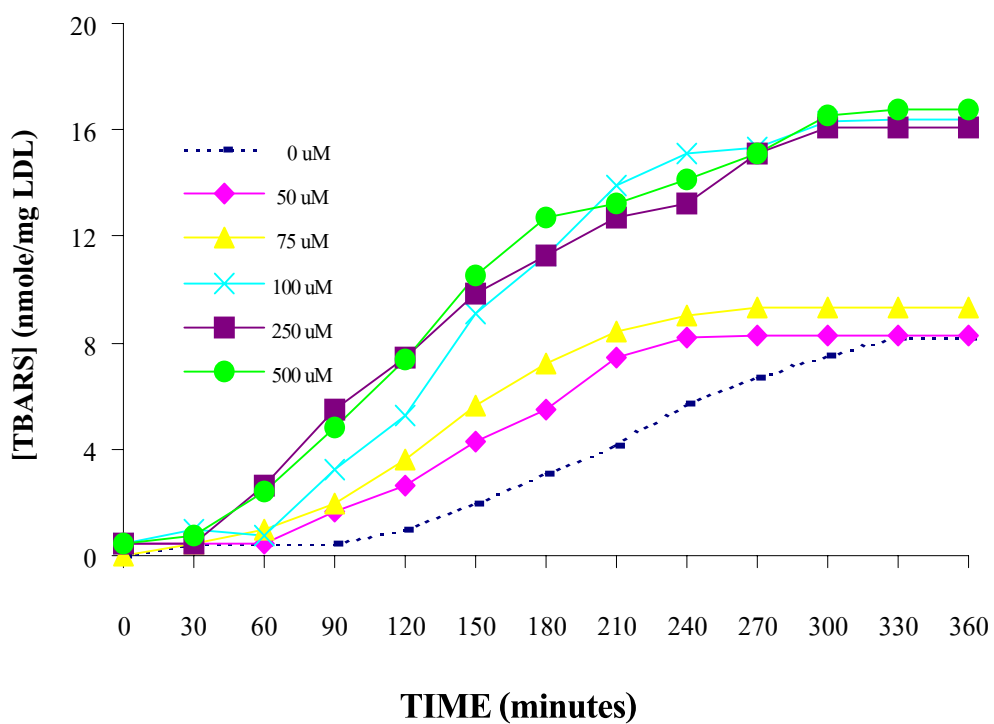
3.3.3 ผลของปริมาณวิตามินซี

จากการศึกษาของ Pitaknantakul (1998) พบว่า วิตามินซีเป็นปัจจัยร่วมที่สำคัญของ FeSO_4 ต่อกระบวนการออกซิเดชันของ LDL โดยวิตามินซีที่ความเข้มข้นระดับ μM ซึ่งเป็นระดับที่พบได้ในพลาสมาของคนทั่วไป (ค่าปกติ 50-200 μM) ทำหน้าที่เป็นสารส่งเสริมให้เกิดอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น (pro-oxidant) โดยคอยเปลี่ยนเหล็กที่อยู่ในรูปออกซิไดส์ (Fe^{3+}) ให้กลับมาอยู่ในรูปรีดิวซ์ (Fe^{2+}) (Herbert *et al.*, 1996) ดังแสดงในปฏิกิริยาข้างล่าง

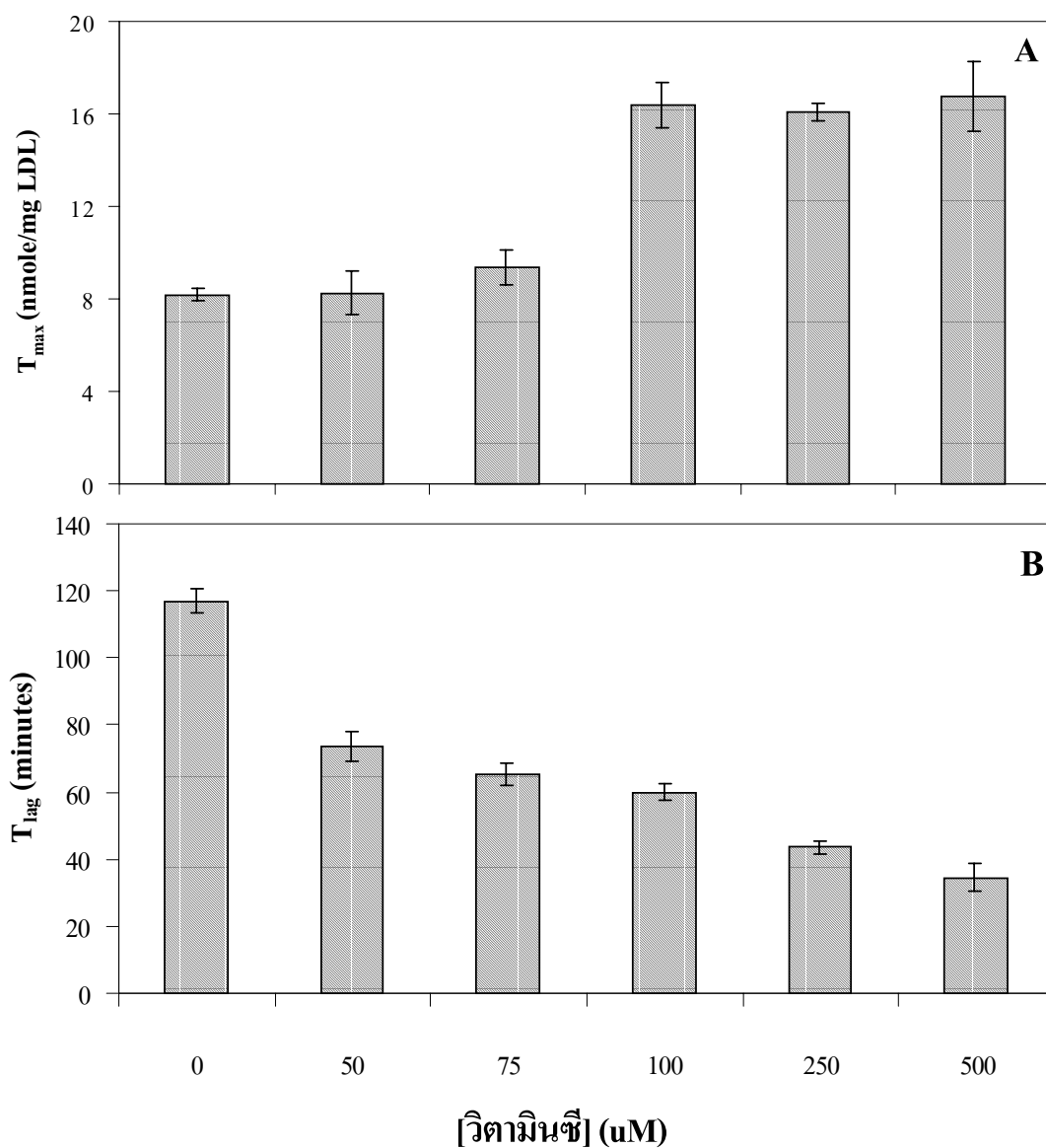


ในขณะที่วิตามินซีที่ความเข้มข้นสูง (mM) นอกจากจะทำให้เหล็กถูกเปลี่ยนกลับมาอยู่ในรูป Fe^{2+} จนหมดแล้ว ยังส่งผลยับยั้งกระบวนการออกซิเดชันของ LDL อีกด้วย โดยการให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระต่าง ๆ (Carr *et al.*, 2000) เกิดเป็น dehydroascorbic acid ซึ่งมีรายงานว่า สามารถยับยั้งการออกซิเดชัน LDL โดย Cu^{2+} อีกด้วย (Retsky *et al.*, 1999)

ดังนั้นจึงได้ศึกษาปริมาณของวิตามินซีที่เหมาะสมสำหรับใช้เหนี่ยวนำการเกิดออกซิเดชันของ LDL ร่วมกับ FeSO_4 โดยการเติมวิตามินซีให้ถึงความเข้มข้นเท่ากับ 0, 50, 75, 100, 250 และ 500 μM ลงในสารละลายผสมซึ่งประกอบด้วย LDL 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กับ 60 μM FeSO_4 เพื่อทำปฏิกิริยาเหมือนกับในหัวข้อ 3.3.2 ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 21 พบว่า การเติมวิตามินซีลงไปทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของ LDL เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนโดยให้ lag phase ที่สั้นขึ้นรวมทั้งระดับ TBARS ที่สูงกว่าในชุดทดลองที่มีแต่ FeSO_4 อย่างเดียว นอกจากนี้การเพิ่มความเข้มข้นของวิตามินซีในปฏิกิริยามีผลทำให้ระดับของ TBARS สูงสุดเพิ่มขึ้นด้วย ในขณะที่ T_{lag} ลดลงตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 22 แต่เนื่องจาก วิตามินซีที่ความเข้มข้นระหว่าง 100-500 μM ให้ผล T_{max} ใกล้เคียงกัน ($P > 0.05$) ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้นของวิตามินซีที่ 100 μM สำหรับทำการทดลองต่อไป



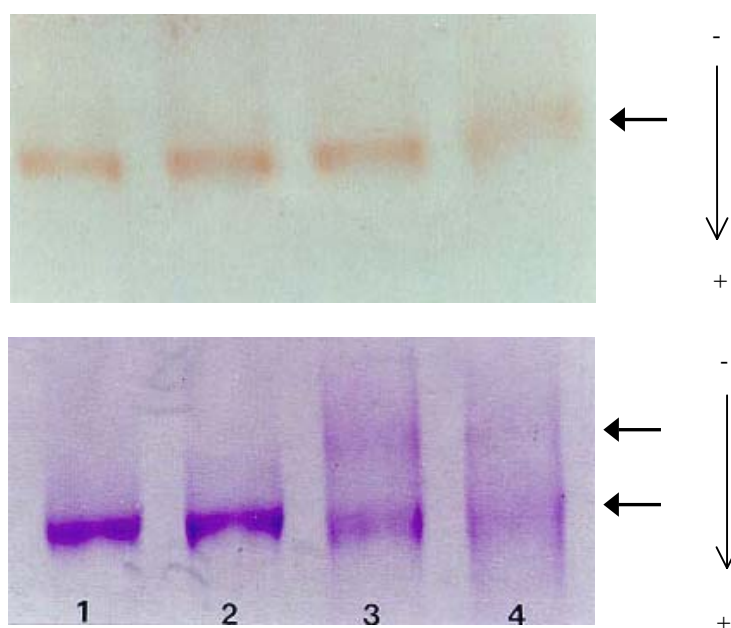
รูปที่ 21 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลา กับระดับของ TBARS ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของ LDL โดยใช้ FeSO_4 60 μM ร่วมกับวิตามินซีที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน



รูปที่ 22 กราฟแสดงระดับเฉลี่ยของ TBARS สูงสุด (A) และ ค่า lag time (B) เมื่อใช้วิตามินซีที่ ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ร่วมกับ $FeSO_4$ $60 \mu M$
 [หมายเหตุ - ผลที่แสดงในกราฟ เป็นค่าเฉลี่ย ($\bar{x} \pm S.D.$) ที่ได้จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ของตัวอย่างเดียวกัน (ต่างชุดกับผลการทดลองในรูปที่ 18 และ 20)

3.4 การเปลี่ยนแปลงของ LDL ที่ถูกออกซิไดส์โดย Fe^{2+}

ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของ LDL เมื่อถูกออกซิไดส์ด้วย Fe^{2+} ในเวลาต่าง ๆ กัน โดยบ่มสารละลาย LDL ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลาย 10 mM PBS pH 7.4 กับ 60 μ M $FeSO_4$ และ 100 μ M วิตามินซี ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 0, 3, 6 และ 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา เติมสารละลาย 2.1% EDTA ลงไป เพื่อยับยั้งปฏิกิริยา จากนั้นนำสารละลายผสมที่ได้มาทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอริซิส แล้วย้อมแถบโปรตีนและแถบไขมันบนแผ่นเจลดังกล่าวด้วย สีคูแมสซิบลู และ สี Oil red O ตามลำดับ ตามวิธีการที่ระบุไว้ในหัวข้อ 2.5.2 เพื่อเปรียบเทียบความสามารถเคลื่อนที่ในแผ่นโพลีอะคริลาไมด์เจลของ LDL ที่ถูกออกซิไดส์ในเวลาต่าง ๆ กัน ซึ่งพบว่า LDL ที่ถูกออกซิไดส์เป็นเวลานานเกิดการเปลี่ยนแปลงที่สังเกตเห็นได้คือ แถบไขมันของ LDL ที่ถูกออกซิไดส์ถึง 24 ชั่วโมง คัดสี Oil red O จางลง และสามารถเคลื่อนที่ในแผ่นโพลีอะคริลาไมด์เจลได้ช้าที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ถูกออกซิไดส์เป็นเวลา 0, 3 และ 6 ชั่วโมง ตามลำดับ ในขณะที่เดียวกันตัวอย่าง LDL ที่ถูกออกซิไดส์เป็นเวลานาน 6 และ 24 ชั่วโมง พบมีโปรตีนแถบบนเพิ่มขึ้นมาอีกหนึ่งแถบด้วย เมื่อเทียบกับแถบโปรตีนของตัวอย่างที่เวลา 0 และ 3 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 23 การที่ LDL ที่ถูกออกซิไดส์เคลื่อนที่ได้ช้าลงนั้นเป็นผลจากการเปลี่ยนแปลงของ Apo B-100 เนื่องจากถูกสารประกอบอัลดีไฮด์ต่าง ๆ ที่มาจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันเข้าเชื่อมต่อกับหมู่ $\epsilon-NH_2$ ของไลซีนที่เป็นส่วนประกอบ เกิดเป็น Schiff's base ซึ่งทำให้ประจุบวกบนโมเลกุล LDL ลดลงนั่นเอง นอกจากนี้ยังเคยมีรายงานว่า โมเลกุลของ LDL ที่ถูกออกซิไดส์สามารถเกาะกลุ่มกันเอง (aggregate) ซึ่งเข้าใจว่าเป็นเพราะการเกิด Schiff's base ระหว่างโมเลกุล LDL ที่ถูกออกซิไดส์ (Hoff and O'Neil, 1991 อ้างโดย Hevonjoja *et al.*, 2000; Fabjan *et al.*, 2000) อย่างไรก็ตามจากการทดลองนี้ ไม่พบแถบโปรตีนขนาดเล็กที่เกิดจากการฉีกขาดจากกัน (oxidative cleavage) ของพันธะเพปไทด์ (peptide bond) ในโมเลกุล Apo B-100 ของตัวอย่าง LDL ที่ถูกออกซิไดส์ตามที่ Fong และคณะ (1987) เคยรายงานไว้

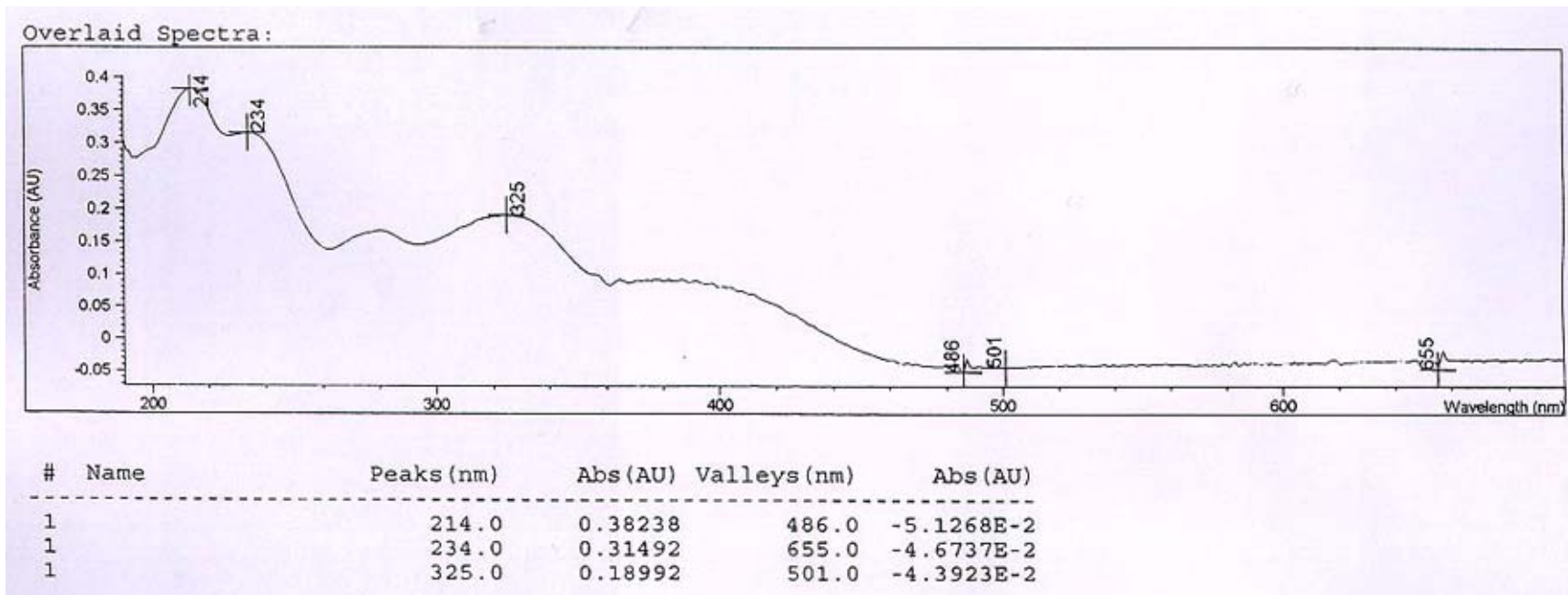


รูปที่ 23 แบบแผนจากการทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ของตัวอย่าง LDL ปริมาณ 20 ไมโครกรัม ที่ถูกออกซิไดส์โดย FeSO_4 ร่วมกับวิตามินซี ที่เวลา 0 ชั่วโมง (แถวที่ 1), 3 ชั่วโมง (แถวที่ 2), 6 ชั่วโมง (แถวที่ 3) และ 24 ชั่วโมง (แถวที่ 4) ตามลำดับ เปรียบเทียบระหว่าง ผลการย้อมแผ่นเจลด้วยสี Oil red O (รูปบน) กับสีคิวแมสซิบลู (รูปล่าง)

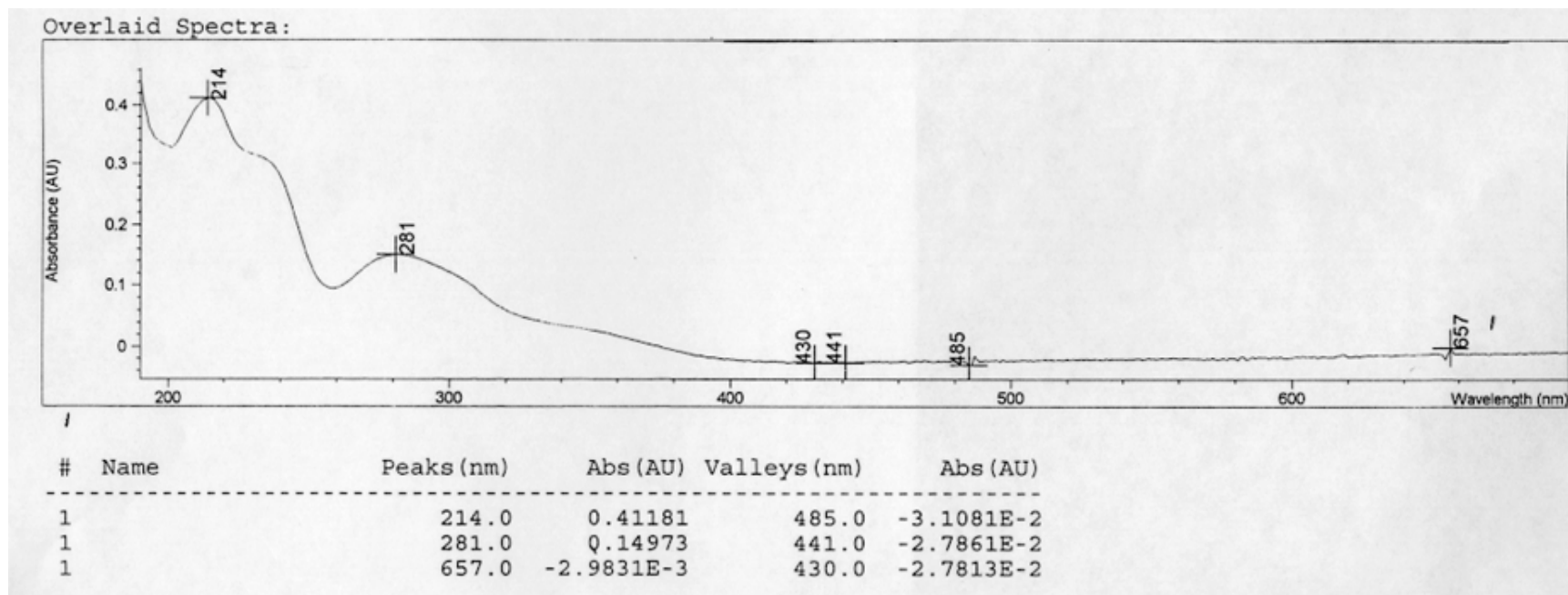
3.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากมะพูด

3.5.1 การดูดกลืนแสงของสารสกัดที่ใช้ทดสอบ

นำผงสารสกัดแต่ละชนิดของมะพูดที่จะนำมาทดสอบ คือ ES1.2 และ GXM มาละลายในเอทานอล ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นตั้งแต่ 190 ถึง 700 นาโนเมตร ผลการทดลองพบว่า ES1.2 มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 214, 234 และ 325 นาโนเมตร ตามลำดับ ส่วน GXM มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 214 กับ 281 นาโนเมตร แต่สารสกัดทั้งสองชนิดไม่ดูดกลืนแสงที่ 532 นาโนเมตร ซึ่งเป็นความยาวคลื่นที่ใช้ในการหาปริมาณ TBARS จากปฏิกิริยาออกซิเดชันของ LDL ดังแสดงในรูปที่ 24



รูปที่ 24 รูปแบบการดูดกลืนแสง (spectrum) ของสารสกัด ES1.2



รูปที่ 25 รูปแบบการดูดกลืนแสงของสารสกัด GXM

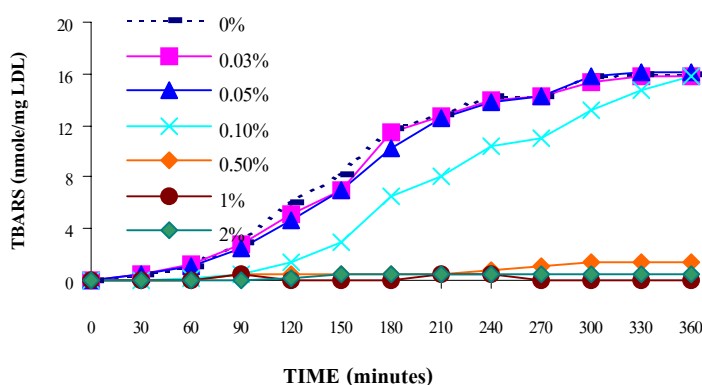
3.5.2 ปริมาณฟีนอลในสารสกัด

เมื่อนำสารบริสุทธิ์ทั้งสองชนิดที่สกัดได้จากมะขวิดมาทดสอบกับ Folin Reagent ตามวิธีการในหัวข้อ 2.8 พบว่า ทั้ง GXM และ ES1.2 มีหมู่ฟีนอลเป็นส่วนประกอบ เนื่องจากทำปฏิกิริยากับ Folin Reagent ได้ดี โดยที่ GXM และ ES1.2 จำนวน 1 มิลลิกรัม เมื่อทำปฏิกิริยากับ Folin Reagent แล้วให้ค่าดูดกลืนแสงซึ่งเทียบเท่ากับฟีนอล 3.8 และ 1.1 μmole ตามลำดับ ซึ่งแสดงว่า ในปริมาณน้ำหนักที่เท่ากัน GXM มีจำนวนฟีนอลเป็นส่วนประกอบมากกว่า ES1.2 เกือบ 3.5 เท่า แต่ทั้งนี้เนื่องจากยังไม่ทราบน้ำหนักโมเลกุลของสารสกัด จึงไม่สามารถคำนวณหาจำนวนหมู่ฟีนอลในโครงสร้างโมเลกุลของสารสกัดแต่ละชนิดได้

3.5.3 ผลของเอธานอลต่อปฏิกิริยาออกซิเดชันของ LDL โดย FeSO_4

เนื่องจากสารสกัดทั้งสองชนิดของมะขวิดที่นำมาใช้ทดสอบกับปฏิกิริยาออกซิเดชันของ LDL อยู่ในรูปของสารละลายเอธานอล ดังนั้นก่อนการทดสอบดังกล่าว จึงต้องศึกษาผลของเอธานอลที่มีต่อ LDL โดยตรง และปฏิกิริยาออกซิเดชันของ LDL โดยการบ่มสารละลาย LDL ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กับ เอธานอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน คือ 0, 0.025, 0.05, 0.1, 0.5, 1 และ 2% (v/v) ทั้งในสถานะที่มีและไม่มี 60 μM FeSO_4 กับ 100 μM วิตามินซีอยู่ด้วย ที่อุณหภูมิ 37°C แล้วติดตามปริมาณ TBARS ที่เกิดขึ้น ทุก ๆ 30 นาที จนครบ 6 ชั่วโมง พบว่า ถึงแม้การบ่ม LDL กับเอธานอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในสถานะที่ไม่มีสารก่อปฏิกิริยาออกซิเดชัน จะไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงใด ๆ กับ LDL เนื่องจาก ตลอดระยะเวลาของการบ่ม ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายผสมที่ 532 นาโนเมตร (TBARS) ใกล้เคียงกับชุดควบคุมที่ไม่มีเอธานอลอยู่ด้วย (ไม่ได้แสดงผลการทดลอง) แต่เอธานอลที่ความเข้มข้นมากกว่า 0.05% กลับมีผลยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของ LDL โดย FeSO_4 อย่างชัดเจน ดังแสดงในรูปที่ 26 ดังนั้นความเข้มข้นของเอธานอลที่เหมาะสมในปฏิกิริยาออกซิเดชันของ LDL ดังกล่าว จึงไม่ควรเกิน 0.05% โดยปริมาตรของสารละลายผสมที่ใช้

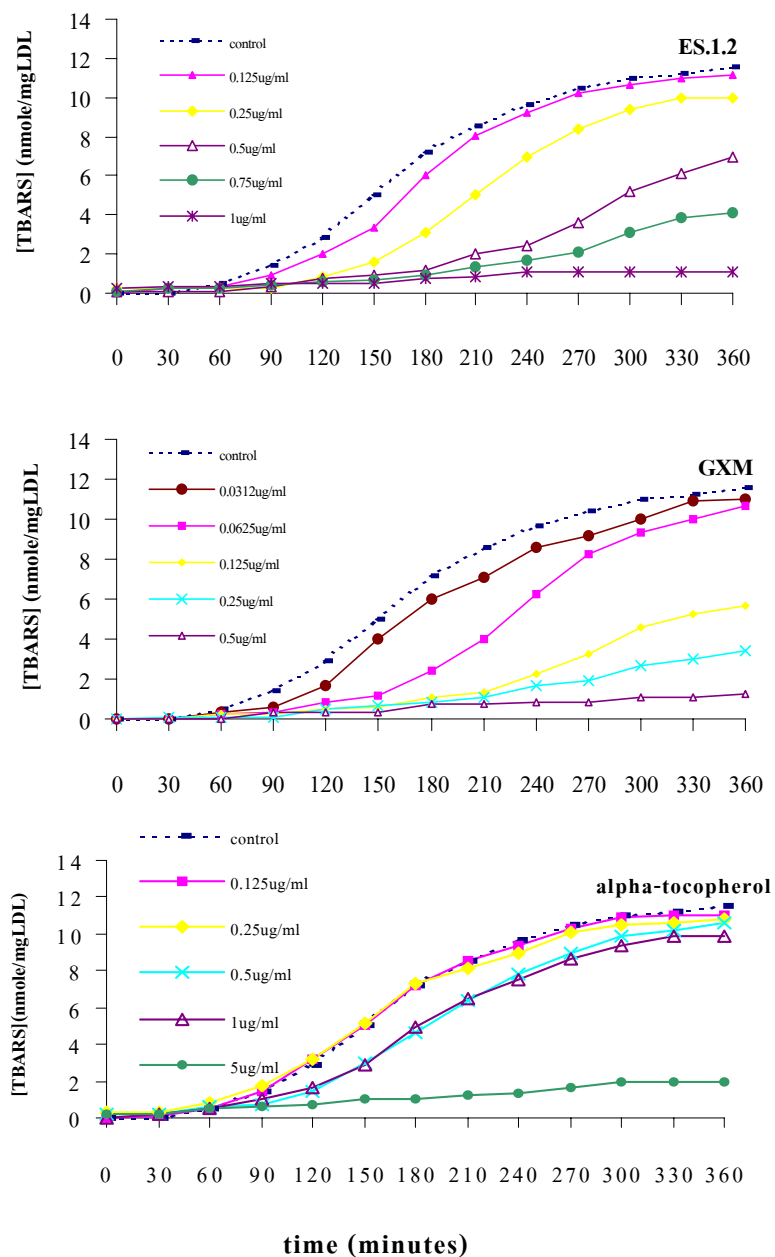
การค้นพบความสามารถในการยับยั้งออกซิเดชันของ LDL โดยเอทานอลจากการทดลองนี้ ถึงแม้จะขัดแย้งกับผลการศึกษาของ Fuhrman และคณะ (1995) และ Croft และคณะ (1996) ซึ่งระบุว่า เอทานอลทำหน้าที่เป็นสารเสริมฤทธิ์ออกซิเดชันในไวน์แดงแต่สนับสนุนผลการวิจัยของ Van Gold และคณะ (1999) ที่พบว่า นอกเหนือจากสารประกอบโพลีฟีนอลต่าง ๆ แล้ว แอลกอฮอล์ในไวน์แดงเองอาจมีฤทธิ์ยับยั้งออกซิเดชันของ LDL ด้วย เนื่องจากไวน์แดงมีความสามารถยับยั้งออกซิเดชันของ LDL โดยการเหนี่ยวนำของ Cu^{2+} ได้ดีกว่าไวน์แดงมาก และรายงานเมื่อเร็ว ๆ นี้ ของ Bonnefont-Rousselot และคณะ (2001) ซึ่งแสดงผลการยับยั้งออกซิเดชันของ LDL โดยอนุมูล $\text{O}_2^-/\text{OH}^\bullet$ ที่เกิดขึ้นจากการฉายรังสีแกมมา (γ -radiolysis-generated free radicals) ของเอทานอลที่ความเข้มข้น $0.42\text{-}17 \times 10^2 \text{ mol/l}$ ไว้อย่างชัดเจน ทั้งนี้โดยการทำเอทานอลจะเข้าทำปฏิกิริยากับอนุมูล OH^\bullet และ O_2^- เกิดเป็น $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{OO}^\bullet$ (ethanol-derived peroxy radical) ซึ่งมีความว่องไวในการทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับ LDL น้อยกว่าอนุมูล OH^\bullet และจะถูกกำจัดออกไปโดยสารต้านออกซิเดชันต่าง ๆ ภายในโมเลกุล LDL ในที่สุด



รูปที่ 26 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับระดับของ TBARS ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของ LDL โดย FeSO_4 ในสถานะที่มีเอทานอลความเข้มข้นต่าง ๆ กัน (ผลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลองซ้ำ 3 ครั้งในตัวอย่างเดียวกัน)

3.5.4 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดในการต้านออกซิเดชัน LDL ของสารสกัดโดยใช้ Fe^{2+}

เมื่อนำตัวอย่าง LDL ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมาทำปฏิกิริยากับ 60 μM FeSO_4 ร่วมกับ 100 μM วิตามินซี ที่อุณหภูมิ 37^oซ ภายใต้สภาวะที่มีสารสกัดจากผลมะพุด (ES1.2) และใบมะพุด (GXM) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันเปรียบเทียบกับสารต้านออกซิเดชันมาตรฐาน คือ วิตามินอี (α -tocopherol) ซึ่งเป็นสารประกอบฟีนอลจากธรรมชาติ (natural phenolic compound) ที่มีโครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 27 และเป็นที่ยึดกันดีในแง่ความสามารถยุติลูกโซ่ปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน (chain-breaking antioxidant inhibitor of lipid peroxidation) โดยการกำจัดอนุมูล LOO^\bullet (lipid derived-peroxyl radical) ในระบบไขมันต่าง ๆ (lipid model systems) ไม่ว่าจะเป็น liposome (Ingold *et al.*, 1987), linoleic emulsion (Ingold *et al.*, 1993) หรือ LDL (Meydani, 2001) ได้ผลดังรูปที่ 28 ซึ่งพบว่า ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ GXM, ES1.2 และวิตามินอี ซึ่งสามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของ LDL ได้อย่างสมบูรณ์เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีสารสกัดนั้น ๆ อยู่เลย ได้แก่ 0.5, 1 และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ และเมื่อทดลองนำค่า lag time และปริมาณ TBARS ที่เกิดขึ้นสูงสุดในปฏิกิริยาของแต่ละสารสกัดที่ความเข้มข้น 0.125, 0.25 และ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมาเปรียบเทียบกันในตารางที่ 5 พบว่า ถึงแม้สารสกัดทั้ง 3 ชนิดในแต่ละความเข้มข้นดังกล่าวจะให้ค่า lag time ของปฏิกิริยาใกล้เคียงกัน แต่ปริมาณ TBARS สูงสุด (T_{max}) ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาของ GXM มีระดับต่ำที่สุด ผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า GXM มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของ LDL โดยมี Fe^{2+} เป็นตัวเหนี่ยวนำปฏิกิริยา ได้ดีที่สุด รองลงมาเป็น ES1.2 และ วิตามินอี ตามลำดับ ทั้งนี้การยับยั้งออกซิเดชันของ LDL ดังกล่าว ซึ่งมีอนุมูล OH^\bullet ที่เกิดจากปฏิกิริยา Fenton เป็นต้นเหตุ (chain initiation) สำคัญนั้น น่าจะเกิดจากความสามารถของสารสกัด 2 ประการด้วยกัน ประการแรกได้แก่ ความสามารถกำจัดอนุมูลอิสระ โดยการให้ H^\bullet จากการแตกตัวของหมู่ $-\text{OH}$ ต่าง ๆ ในโครงสร้างฟีนอล (phenolic hydroxyl groups) แก่อนุมูล LOO^\bullet ที่เกิดขึ้นระหว่างลูกโซ่ของปฏิกิริยาออกซิเดชันกำลังดำเนินไป (chain propagation) เป็นหลัก เนื่องจากเสถียร



รูปที่ 28 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับระดับของ TBARS ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของ LDL โดยใช้ $60 \mu\text{M FeSO}_4$ ร่วมกับวิตามินซีภายใต้สภาวะที่มีสารสกัดจากผลมะพุด (ES1.2), ไบมะพุด (GXM) และวิตามินอี ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบค่า T_{lag} และ T_{max} ที่ได้จากปฏิกิริยาออกซิเดชันของ LDL โดย Fe^{2+} เมื่อมี GXM, ES1.2 และวิตามินอีความเข้มข้น 0.125, 0.25 และ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อยู่ด้วย

สารสกัด	ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)	T_{lag} (นาที)	ค่า T_{lag} สัมพัทธ์ (%)	T_{max} ($\mu\text{mole/mgLDL}$)	ค่า T_{max} สัมพัทธ์ (%)
GXM	0	76.5 ± 1.5	100	11.3 ± 0.2	100
	0.125	157.5 ± 0.6	205.9	5.7 ± 0.2	50.8
	0.25	180.9 ± 2.7	236.5	3.5 ± 0.1	31
	0.5	N.D.	N.D.	1.5 ± 0.4	12.8
ES1.2	0	76.5 ± 1.5	100	11.3 ± 0.2	100
	0.125	114.6 ± 4.1	149.8	8.5 ± 1.4	75.7
	0.25	133.9 ± 2.5	175.1	7.4 ± 1.0	65.7
	0.5	160.6 ± 6.2	210	1.2 ± 0.2	11
α -tocopherol	0	76.5 ± 1.5	100	11.3 ± 0.2	100
	0.125	81.7 ± 2.0	106.8	10.9 ± 0.1	97.2
	0.25	103.6 ± 2.1	135.4	10.5 ± 0.4	93.3
	0.5	109.3 ± 1.0	142.9	9.8 ± 0.1	87

(หมายเหตุ - N.D. หมายถึง หาค่าไม่ได้)

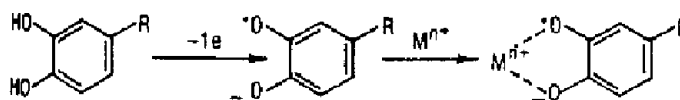
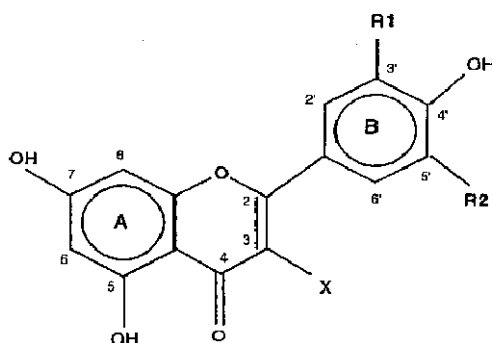
- ผลที่ได้เป็นค่าเฉลี่ย ($x \pm \text{SD}$) ที่ได้จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้งของตัวอย่างเดียวกัน (ต่างชุดกับการทดลองที่ผ่านมา)

3.5.5 ความสามารถจับ Fe^{2+} ของสารสกัดจากมะพูด

เมื่อนำสารสกัดทั้งสองชนิดของมะพูด มาทดสอบความสามารถจับ Fe^{2+} ตามวิธีการที่ระบุไว้ในหัวข้อ 2.9 ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 6 พบว่า GXM สามารถทำปฏิกิริยาจับกับ Fe^{2+} อิสระที่มีอยู่ในสารละลายผสมได้ดีกว่า ES1.2 โดยทั้ง GXM และ ES1.2 ปริมาณ 1 มิลลิกรัม สามารถจับ Fe^{2+} ไว้ได้ 2.6 และ 1.9 mmole หรือคิดเป็นประมาณ 43.3 และ 31.7 % ตามลำดับ เปรียบเทียบกับ EDTA ซึ่งสามารถจับกับ Fe^{2+} 6 mmole ได้หมด ในขณะที่เอธานอลซึ่งเป็นตัวทำละลายของสารสกัดไม่ทำปฏิกิริยากับไอออนของโลหะชนิดนี้เลย และเมื่อเทียบกับวิตามินอีซึ่งมีหมู่ $-OH$ อยู่ในโมเลกุลเพียงหมู่เดียวที่ตำแหน่ง *ortho* (C_6) ของวงแหวนอะโรแมติก (aromatic ring) แล้ว สารสกัดจากมะพูดสามารถจับ Fe^{2+} ได้ดีกว่ามาก แสดงว่า ในโครงสร้างโมเลกุลของสารประกอบฟีนอลทั้ง 2 ชนิดจากมะพูด น่าจะมีหมู่ $-OH$ อยู่ในตำแหน่งต่าง ๆ ที่ใช้ทำปฏิกิริยาจับกับโลหะทรานซิชันอย่างเช่น Fe^{2+} และ Cu^{2+} (metal-complexing sites) อยู่ด้วย ซึ่งถ้าเป็นสารประกอบกลุ่มฟลาโวนอยด์แล้ว มีอยู่ด้วยกัน 3 ตำแหน่งที่เป็นไปได้ขึ้นกับโครงสร้างของฟลาโวนอยด์ชนิดนั้น ๆ ได้แก่ ระหว่างหมู่ $-OH$ ของคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 (วงแหวน C) กับหมู่ (carbonyl group) (วงแหวน A), ระหว่างหมู่ $-OH$ ของคาร์บอนตำแหน่งที่ 5 (วงแหวน A) กับหมู่ (วงแหวน A) และโดยเฉพาะระหว่างหมู่ $-OH$ ที่ตำแหน่งที่ 3' และ 4' (วงแหวน B) ซึ่งเป็นตำแหน่งที่จับได้ดีที่สุด (Morel *et al.*, 1998) ทั้งนี้กลไกการจับกันระหว่างโลหะกับสารประกอบชนิดดังกล่าว เข้าใจว่า เกิดจากการแยกเอาอะตอมไฮโดรเจน (hydrogen abstraction) ออกจากหมู่ $-OH$ ได้เป็นอนุมูล phenoxyyl ซึ่งจะเข้าจับกับไอออนของโลหะทันทีในสัดส่วนที่มีความเป็นไปได้มากที่สุด (most probable molar ratio) คือ 1: 1 (Tyson *et al.*, 1972; Schwartner *et al.*, 1996; Kayanaraman *et al.*, 1984; Hodnick *et al.*, 1994 อ้างโดย Morel *et al.*, 1998) ดังแสดงในรูปที่ 29

ตารางที่ 6 ความสามารถจับ Fe^{2+} ของสารสกัด ES1.2 และ GXM เปรียบเทียบกับ EDTA วิตามินอี และเอทานอลที่ความเข้มข้น 10 % (v/v)

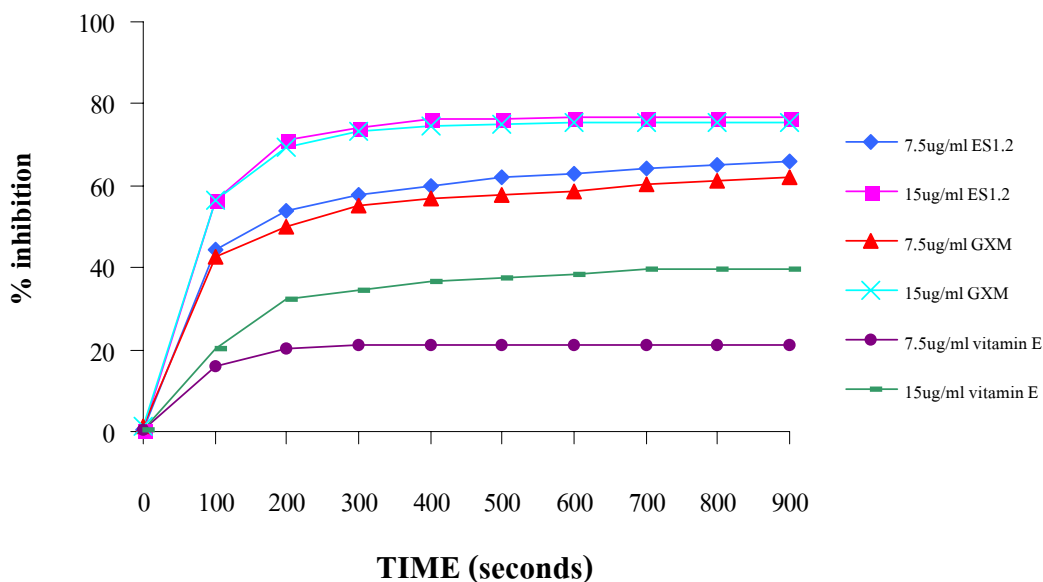
สารทดสอบ	ปริมาณ (mg)	ปริมาณ Fe^{2+} ที่ถูกจับ (mmole) (n=3)	% Fe^{2+} - chelating activity
ES1.2	1	1.9 ± 0.1	31.7
GXM	1	2.6 ± 0.2	43.3
EDTA	1	6	100
α -tocopherol	1	0.4 ± 0.1	6.7
10 % ethanol	-	0	0



รูปที่ 29 กลไกการจับอนุมูลโลหะของสารประกอบฟลาโวนอยด์

3.5.6 ความสามารถกำจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดจากมะพุด

เมื่อนำสารสกัดทั้งสองชนิดของมะพุดมาทดสอบความสามารถกำจัดอนุมูลอิสระเบื้องต้น โดยอาศัยวิธีการกำจัดอนุมูล DPPH[•] ในสารละลาย ตามที่ระบุในหัวข้อ 2.10 ซึ่งอาศัยหลักการ คือ เมื่ออนุมูลชนิดนี้ได้รับอิเล็กตรอนหรือ H[•] จากสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแล้ว จะกลายเป็นสารประกอบ DPPH ที่เสถียรขึ้น และไม่มีสีม่วงเข้มเหมือนกับ DPPH[•] (Blois, 1958 อ้างโดย Tamura *et al.*, 1990) พบว่า สารสกัดจากมะพุดทั้ง 2 ชนิดสามารถกำจัดอนุมูล DPPH[•] ได้ดีกว่าวิตามินอีมาก โดยสังเกตจากระยะเวลาที่ใช้ในการฟอกจางสีสารละลายและพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์การยับยั้งปฏิกิริยา (%inhibition) ที่เพิ่มขึ้นตามเวลาภายใต้สภาวะที่มีสารทดสอบแต่ละชนิดในปริมาณเท่ากัน นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสารสกัดจากมะพุดด้วยกันเอง ยังพบว่า GXM และ ES1.2 มีความสามารถกำจัดอนุมูลอิสระดังกล่าวได้ใกล้เคียงกัน ดังแสดงในรูปที่ 30 ซึ่งบ่งชี้ถึงความสามารถของสารสกัดทั้งสองชนิดในการยับยั้งอนุมูล LOO[•] ที่เกิดขึ้นระหว่างลูกโซ่ปฏิกิริยาออกซิเดชันของ LDL นั่นเอง เป็นที่น่าสังเกตว่า การที่วิตามินอีซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานไม่สามารถยับยั้งอนุมูลในระบบสารละลายอย่างเช่น DPPH[•] ที่ใช้ทดสอบได้ดีเมื่อเทียบกับที่เคยมีรายงานมาแล้วนั้น (Tamura *et al.*, 1990) แสดงให้เห็นว่า วิตามินอีซึ่งมีคุณสมบัติชอบไขมันมาก (marked lipophilic property) และกระจายตัวอยู่ในน้ำมันได้ดี สามารถออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสภาพแวดล้อมที่สัมผัสอยู่กับโมเลกุลไขมันต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องโดยตรง (*in situ*) ได้มากกว่าในระบบสารละลาย ซึ่งอนุมูลอิสระน่าจะมีการเคลื่อนไหวได้คล่องตัว จึงทำให้กำจัดได้ยากกว่าอนุมูล LOO[•]/ROO[•] ในระบบไขมันต่าง ๆ (Ingold *et al.*, 1987; Ingold *et al.*, 1993; Meydani, 2001) นอกจากนี้ยังพบว่า ความสามารถต้านออกซิเดชันของวิตามินอีในไขมันขึ้นกับชั้นไขมัน (phase of lipid) ที่ละลายอยู่ด้วย โดยวิตามินอีจะทำงานได้ดีในชั้นไขมันที่ไม่สัมผัสกับน้ำหรืออากาศ (Huang *et al.*, 1994; Huang *et al.*, 1996 อ้างโดย Lampi *et al.*, 1997)



รูปที่ 30 เปรียบเทียบความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH ของสารสกัด ES1.2, GXM และ วิตามินอี ที่ความเข้มข้น 13.7 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง)

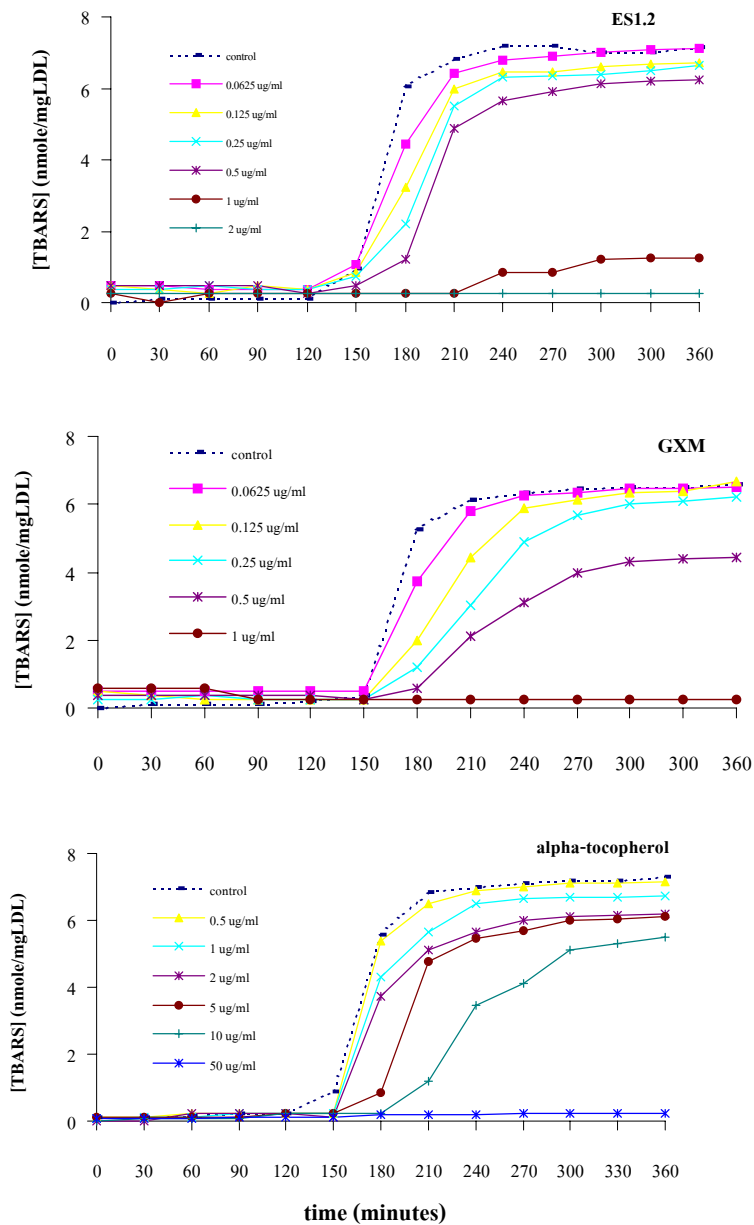
3.5.7 การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของ LDL โดย AAPH

เมื่อนำสารสกัดแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน มาทดสอบความสามารถต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของ LDL ที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดย 4 mM AAPH ตามวิธีการที่ระบุในหัวข้อ 2.6.2 พบว่า GXM สามารถยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของ LDL โดยอนุมูล ROO^{\bullet} จากการทำปฏิกิริยารวมตัวกันระหว่างโมเลกุลออกซิเจน (O_2) กับอนุมูล AAP^{\bullet} ที่ได้จากการแตกตัว (thermolysis) ของ AAPH ในสารละลาย (Halliwell *et al.*, 1995) ได้ดีกว่า ES1.2 โดยสังเกตจาก lag time ที่ยาวนานเมื่อค่าความเข้มข้นของ GXM เพิ่มขึ้นจาก 0.0625 เป็น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ขณะที่

ES1.2 ในช่วงความเข้มข้นเดียวกันไม่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาได้ เนื่องจากยังมีระยะ lag time และระดับ TBARS สูงสุดใกล้เคียงกับชุดควบคุมซึ่งไม่มีสารสกัดดังกล่าวอยู่เลย นอกจากนี้ยังพบว่า GXM ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของ LDL โดยปฏิกิริยาดังกล่าวได้อย่างสมบูรณ์ เมื่อเทียบกับ ES1.2 ที่ความเข้มข้นเดียวกันอีกด้วย ในขณะที่วิตามินอีซึ่งเป็นสารประกอบฟินอลที่มีหมู่ -OH เพียงหมู่เดียว แสดงผลยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันดังกล่าวได้ไม่ดีเท่าสารสกัดทั้งสองชนิดจากมะปูด (รูปที่ 31) ถึงแม้วิตามินอีอาจจะทำหน้าที่เสริมฤทธิ์ออกซิเดชันของ LDL ได้จากการที่อนุมูล α -tocopheroxyl ที่เกิดขึ้นจากการกำจัดอนุมูล $ROO\cdot$ ของ α -tocopherol สามารถออกซิไดส์กรดไขมันไม่อิ่มตัวต่าง ๆ ภายในโมเลกุลของ LDL ต่อไปได้ (Bowry *et al.*, 1992; Ingold *et al.*, 1993) แต่ทั้งนี้พบว่า การส่งเสริมให้เกิดอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้นของวิตามินอีจะเกิดขึ้นในภาวะที่มีความเข้มข้นสูง ๆ (ระดับ mM ขึ้นไป) เท่านั้น (Mahoney and Graf, 1986 อ้างโดย Ingold *et al.*, 1993)

ผลการทดลองทั้งหมดแสดงให้เห็นว่า สารสกัดทั้ง 2 ชนิด จากมะปูดมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของ LDL ได้ดี ทั้งแบบที่ใช้โลหะเหนี่ยวนำ (metal-dependent LDL oxidation) และแบบที่ใช้สารประกอบซึ่งแตกตัวให้อนุมูลอิสระโดยตรง โดยมีอนุมูล $OH\cdot$ และ $ROO\cdot$ เป็นสารก่อปฏิกิริยาในแต่ละระบบออกซิเดชัน ตามลำดับ นอกจากนี้ความสามารถป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันไขมันโดยการจับกับ Fe^{2+} ซึ่งอาจรวมถึงโลหะทรานซิชันอื่น ๆ ที่สามารถเหนี่ยวนำปฏิกิริยาแล้ว สารสกัดทั้ง 2 ชนิดจากมะปูดยังยับยั้งออกซิเดชันของ LDL จากการกำจัดอนุมูลอิสระด้วย โดยสารสกัดเหล่านี้เข้าไปแทรกตัวอยู่ในชั้นไขมันบริเวณผิวนอกของ LDL ได้ดี อาจดักจับ (trap) อิเล็กตรอนจากอนุมูลอิสระต่าง ๆ โดยเฉพาะ $LOO\cdot$ ที่เกิดขึ้นจากลูกโซ่ปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน มาไว้ในโครงสร้างฟินอลกลายเป็นสารประกอบของอนุมูล phenoxyyl ซึ่งไม่สามารถทำปฏิกิริยาต่อไปได้ (non-reactive) หรืออาจส่งต่ออิเล็กตรอนดังกล่าวไปให้กับสารต้านออกซิเดชันต่าง ๆ ของ LDL อีกทีหนึ่ง เป็นผลให้ลูกโซ่ของปฏิกิริยาภายใน LDL ยุติลง อย่างไรก็ตามนอกเหนือจากความสามารถต้านออกซิเดชันทั้ง 2 วิธีการดังกล่าวมาแล้ว สารสกัดทั้ง 2 ชนิดอาจจะยังมีกลไกป้องกันการเกิด

ออกซิเดชัน LDL แบบอื่น ๆ อีก อย่างเช่น การช่วยชะลอความเสียหายของสารต้านออกซิเดชันภายใน LDL ระหว่างที่ถูกออกซิไดส์ โดยคอยเปลี่ยนอนุมูล α -tocopheroxyl กลับเป็น α -tocopherol เพื่อจับอนุมูลอิสระใหม่ได้อีก หรือการยับยั้งเอนไซม์ lipoxygenase ซึ่งปัจจุบันเป็นที่ยอมรับว่ามีส่วนสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของ LDL ในร่างกาย เป็นต้น ดังนั้นการศึกษาเพิ่มเติมในกลไกเหล่านี้ของสารสกัดจากมะพุด จึงนับเป็นเรื่องที่น่าสนใจอย่างยิ่ง



รูปที่ 31 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลา กับระดับของ TBARS ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของ LDL โดยใช้ 4 mM AAPH ภายใต้สถานะที่มีสารสกัดจากผลมะพุด (ES1.2), ใบมะพุด (GXM) และ วิตามินอีที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบค่า T_{lag} และ T_{max} ที่ได้จากปฏิกิริยาออกซิเดชันของ LDL โดย AAPH เมื่อมี GXM, ES1.2 และ วิตามินอีความเข้มข้น 0.25, 0.5 และ 1.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อยู่ด้วย

สารสกัด	ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)	T_{lag} (นาที)	ค่า T_{lag} สัมพัทธ์ (%)	T_{max} ($\mu\text{mole/mgLDL}$)	ค่า T_{max} สัมพัทธ์ (%)
GXM	0	145.4 ± 2.0	100	7.2 ± 0.1	100
	0.25	170.3 ± 4.1	117.1	6.8 ± 1.2	94.6
	0.5	180.8 ± 1.5	124.3	4.8 ± 0.1	67.2
	1.0	N.D.	N.D.	0.7 ± 0.1	9.7
ES1.2	0	145.4 ± 2.0	100	7.2 ± 0.1	100
	0.25	162.9 ± 1.5	112.0	6.6 ± 0.2	92.2
	0.5	173.6 ± 0.6	119.4	6.2 ± 0.1	86.5
	1.0	213.2 ± 4.1	146.6	1.3 ± 0.1	17.5
α -tocopherol	0	145.4 ± 2.0	100	7.2 ± 0.1	100
	0.25	-	-	-	-
	0.5	147.7 ± 1.4	101.6	7.1 ± 1.4	99.4
	1.0	147.7 ± 1.1	101.6	6.7 ± 1.1	93.6

(หมายเหตุ - N.D. หมายถึง หาค่าไม่ได้)

- ผลที่ได้เป็นค่าเฉลี่ย ($X \pm \text{SD.}$) ที่ได้จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้งของตัวอย่างเดียวกัน (ต่างชุดกับการทดลองที่ผ่านมา)