2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ

เลือดคนปกติ

เลือดทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษาได้รับความอนุเคราะห์จากผู้บริจาคโลหิต (ชายอายุ 20-40 ปี จำนวน 20 คน และหญิงอายุ 20-45 ปี จำนวน 10 คน) ณ หน่วยคลังเลือด โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา

สารสกัดจากมะพูด

สารสกัดจากใบและผลของมะพูดที่นำมาทดสอบทั้งหมด ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิลาวัลย์ มหาบุษราคัม ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการทดลองเป็นชนิดคุณภาพวิเคราะห์ (analytical grade) หรือเทียบเท่า

ชื่อสารเคมี	M.W.	บริษัทที่ผลิต
α,α'- Azobutyramidine dihydrochloride (AAPH)	271.19	Fluka
Absolute ethanol	50.00	J.T. Baker
Absolute methanol	32.04	Lab Scan
Acetic anhydride	102.09	Hopkin&Williams
Acrylamide	71.1	Merck
Agarose Type II: Medium EEO	-	Sigma

ชื่อสารเคมี	M.W.	บริษัทที่ผลิต
Ammoniun persulphate	228.7	Merck
L (+) - Ascorbic acid	176.13	May&Baker
Boric acid H_3BO_3	61.83	May&Baker
Bovine Serum albumin (BSA)	67,000	Sigma
Bromophenol blue	-	Merck
Butylated hydroxytoluene (BHT)	220.30	Sigma
Cholesterol from lanolin	386.67	Merck
Coomassie brilliant blue R250	-	Fluka
Cupric chloride $CuCl_2 \cdot 2H_2O$	170.47	Carlo Erba
Cupric sulphate $CuSO_4 \cdot 5H_2O$	249.68	J.T. Baker
1, 1 – Diphenyl–2–picryl-hydrazyl (DPPH)	394.3	Sigma
Disodium hydrogen phosphate dodecahydrate $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	358.14	Merck
Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate (EDTA)	372.24	Fluka
Fat red 7B	379.50	Sigma
Ferrous sulfate $FeSO_4 \cdot 7H_2O$	278.02	J.T. Baker
Folin Ciocalteau's phenol reagent	-	Merck
Glacial acetic acid	60.05	J.T. Baker
Hexamine	140.2	Sigma
Malonaldehyde bis (dimethyl acetal) (MDA)	164.20	Aldrich
N, N′- methylene bis acrylamide	154.17	Fluka
N, N, N′, N′, - tetramethylene diamine (TEMED)	116.2	Fluka
Oil red O	408.5	Sigma
Phenol	94.11	Merck

ชื่อสารเคมี	M.W.	บริษัทที่ผลิต
Potassium bromide KBr	119.01	Carlo Erba
Potassium chloride KCl	74.55	Carlo Erba
Potassium dihydrogen phosphate KH_2PO_4	136.09	Fluka
Sodium azide NaN_3	65.01	Sigma
Sodium carbonate Na_2CO_3	105.99	Carlo Erba
Sodium chloride NaCl	58.44	Carlo Erba
Sodium citrate $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$	294.10	Fluka
Sodium dodecyl sulphate (SDS)	288.40	Sigma
Sodium hydroxide NaOH	40.00	Merck
Sodium potassium tartrate tetrahydrate $NaKC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$	282.23	Carlo Erba
Sodium salicylate	160.11	Merck
Sodium sulphate anhydrous Na_2SO_4	142.04	Carlo Erba
Sucrose	342.3	Sigma
Sudan black B	456.5	Sigma
Sulfuric acid H_2SO_4	98.08	Lab Scan
Tetramethyl murexide (TMM)	340.3	Sigma
D - α - Tocopherol acetate	472.8	Sigma
Thiobarbituric acid (TBA)	144.10	Sigma
Tricine	179.18	Fluka
Trichloroacetic acid (TCA)	163.39	Carlo Erba
Tris (hydroxymethylaminomethane)	121.11	Sigma

อุปกรณ์

1. เครื่องหมุนเหวี่ยงแรงสูง (ultracentrifuge) รุ่น L8-70M ของ Beckman, USA.
2. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-VIS recording spectrophotometer) รุ่น UV160Aของ Shimadzu, Japan
3. เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบตั้งโต๊ะ (refrigerated bench–top centrifuge) รุ่น 5804 R ของ Eppendorf, Germany
4. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่งรุ่น H10 ของ Mettler, Switzerland
5. ชุดทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอรีซิส (agarose gel electrophoresis unit) ของ Hoefer, USA.
6. ชุดทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิส (polyacrylamide gel electrophoresis unit) รุ่น MGV-100 ของ C.B.S, USA.
7. เครื่องกำเนิดไฟฟ้าสำหรับเจลอิเล็กโทรฟอรีซิส (power supply) รุ่น 100/500 ของ Biorad, USA.
8. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น SS40-D ของ Grant, England
9. เครื่องวัด pH ของสารละลาย (pH-meter) รุ่น PHM61 ของ Radiometer, Denmark
10. เครื่องกวนสารละลาย (magnetic stirrer) รุ่น PC-410 ของ Corning, USA.
11. เครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer) รุ่น K-550-GE ของ Scientific Industries, USA.

วิธีการ

2.1 การเตรียม LDL จากพลาสมา (plasma)

2.1.1 การเตรียมพลาสมา

ผสมตัวอย่างเลือดที่เพิ่งเจาะจากหลอดเลือดดำ (venipuncture) มาใหม่ ๆ กับ EDTA ในอัตราส่วน EDTA 1 มิลลิกรัมต่อเลือด 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง รุ่น 5804 R ของ Eppendorf โดยใช้โรเตอร์ (rotor) แบบ swing-bucket ชนิด A-4-44 ในอัตราเร็ว 2,200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บพลาสมาซึ่งเป็นของเหลวสีเหลืองใสที่ได้หลังจากการปั่นเหวี่ยงเลือดดังกล่าว แบ่งออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรก (ประมาณ 1 มิลลิลิตร) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4^0ซ สำหรับหาปริมาณ LDL และ คอเลสเทอรอล ต่อไป ส่วนที่เหลือทั้งหมดนำมาเตรียมแยก LDL ทันที

2.1.2 การแยก LDL จากพลาสมา (Kleinveld *et al*., 1992)

นำพลาสมาที่เตรียมได้มาเติมเกลือ KBr ลงไปละลายทีละน้อยจนได้ความหนาแน่นเป็น 1.261 กรัมต่อมิลลิลิตร แบ่งพลาสมาที่ปรับความหนาแน่นแล้วมา 1.8 มิลลิลิตร ค่อย ๆ เติมสารละลาย 0.85% NaCl ที่มี 10% EDTA อยู่ด้วย (ความหนาแน่น 1.060 กรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงไปบนผิวหน้า ปั่นด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงแรงสูง รุ่น L8-70 M ของ Beckman โดยใช้โรเตอร์แบบ fixed-angle ชนิด 65Ti ที่ความเร็ว 30,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 15^0ซ นาน 3 ชั่วโมง เพื่อแยกสารละลายออกเป็น 3 ชั้น ชั้นบนสุดเป็นของเหลวใสมีคราบสีขาวซึ่งประกอบด้วย VLDL รวมกับไคโลไมครอน ลอยอยู่ สารละลายชั้นกลางเป็นชั้นที่มี LDL อยู่เป็นส่วนใหญ่ มีลักษณะเป็นของเหลวใสสีเหลืองอ่อน ชั้นล่างเป็นสารละลายสีเหลืองเข้มซึ่งเป็นชั้นของ HDL ดังแสดงในรูปที่ 10 ใช้หลอดหยด (Pasteur pipette) ค่อย ๆ ดูดแยกสารละลายชั้นกลางออกมา 4 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายเกลือ KBr ใน 0.01% EDTA ที่มีความหนาแน่น 1.10 กรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงไปบนผิวหน้า นำไปปั่นด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงแรงสูงอีกครั้ง ที่ความเร็ว 30,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 15^0ซ เป็นเวลานาน 18 ชั่วโมง สารละลายที่ได้หลังจากการปั่นเหวี่ยงดังกล่าวถูกแยกออกเป็น 2 ชั้น ดังแสดง

ในรูปที่ 11 ใช้หลอดหยดค่อย ๆ ดูดเอาเฉพาะส่วนของสารละลายสีเหลืองใสชั้นบนออกมา จากนั้นนำ LDL ที่แยกได้ไปไดแอไลซ์ (dialyse) ใน 10 mM PBS (phosphate buffered saline) pH 7.4 ซึ่งผ่านการไล่อากาศออกด้วยก๊าซไนโตรเจนก่อนนำมาใช้งาน (รายละเอียดส่วนประกอบของ PBS อยู่ในภาคผนวก 1) ที่อุณหภูมิ 4^0ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยเปลี่ยนบัฟเฟอร์ (buffer) 2-3 ครั้ง เพื่อกำจัด EDTA และเกลือส่วนใหญ่ออกไป นำ LDL ที่ผ่านการไดแอไลซ์แล้ว ไปเก็บไว้ในที่มืด ณ อุณหภูมิ 4^0ซ เพื่อนำไปหาปริมาณโปรตีน ปริมาณคอเลสเทอรอล ตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยการทำอิเล็กโทรฟอรีซิส (electrophoresis) และทดสอบปฏิกิริยาออกซิเดชันภายในระยะเวลาไม่เกิน 1 สัปดาห์นับจากที่เตรียมได้

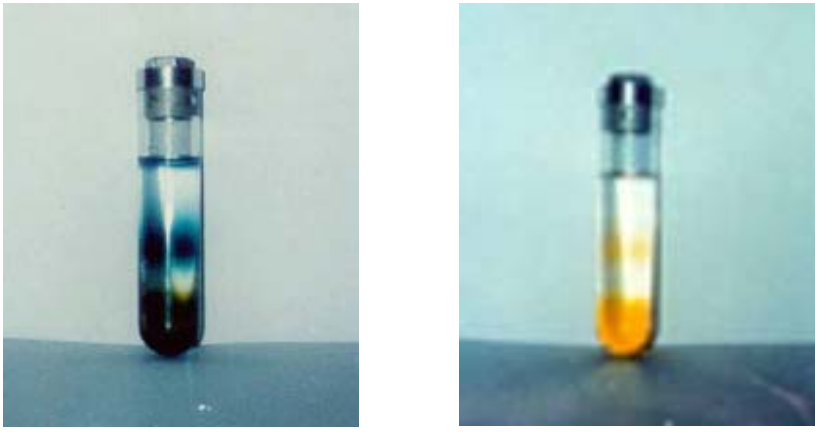
2.2 การหาปริมาณโปรตีนของ LDL ที่เตรียมได้ (Markwell *et al*., 1978)

นำสารละลาย LDL ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาผสมกับสารละลาย alkaline copper reagent (ประกอบด้วย 2% Na_2CO_3 ใน 0.4% NaOH, 0.16% $NaKC_4H_4O_6 \bullet 4H_2O$ ใน 1% SDS และ 4% $CuSO_4 \bullet 5H_2O$ ในอัตราส่วน 100: 1: 1 โดยปริมาตร) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร หลังจากตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องครบ 10 นาที จึงเติมสารละลาย Folin Ciocalteau's phenol reagent ซึ่งถูกเจือจางด้วยน้ำกลั่นปริมาตรเท่าตัวก่อนใช้ ลงไป 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่เตรียมจากสารละลาย BSA ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เพื่อหาปริมาณโปรตีนในตัวอย่าง LDL ดังกล่าว ต่อไป

2.3 การหาปริมาณคอเลสเทอรอล (Huang *et al*., 1961)

นำสารละลายตัวอย่างปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย cholesterol color reagent ซึ่งประกอบด้วย 30% (v/v) กรดแอซีติก (acetic acid), 60% (v/v) แอซีติกแอนไฮไดรด์ (acetic anhydride), 10% (v/v) H_2SO_4 และ 2% Na_2SO_4 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้นาน 20 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่เตรียมจากสารละลายคอเลสเทอรอลความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เพื่อหาปริมาณคอเลสเทอรอลในตัวอย่างดังกล่าวต่อไป จากนั้น

จึงแปลงค่าเป็น LDL (mg%) โดยคูณด้วย 100/45 ซึ่งเป็นค่าสัมประสิทธิ์ได้มาจาก การที่ LDL ในกระแสเลือดของคนเรานั้นประกอบด้วยคอเลสเทอรอลอยู่ 45% โดยปริมาณ (มนตรี จุฬาวัฒนฑล และคณะ, 2542)



รูปที่ 10 ผลการปั่นเหวี่ยงพลาสมาด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงแรงสูงที่ความเร็วรอบ 30,000 รอบต่อนาที นาน 3 ชั่วโมง (รูปซ้ายมือ เป็นสารละลายพลาสมาที่มีสี Sudan black B อยู่ด้วย เพื่อให้เห็นการแยกชั้นของไลโปโปรตีนทั้ง 3 ชนิด ชัดเจนขึ้น)

รูปที่ 11 ผลการปั่นเหวี่ยงสารละลายชั้นกลางจากรูปที่ 10 เพื่อแยก LDL ออกมา ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงแรงสูงที่ความเร็ว 30,000 รอบต่อนาที นาน 18 ชั่วโมง

2.4 การหาปริมาณ LDL ในพลาสมา

ได้รับความอนุเคราะห์จากหน่วยเคมีคลินิก ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สำหรับการตรวจวัดระดับคอเลสเทอรอลรวม (total cholesterol), ระดับคอเลสเทอรอลใน HDL (HDL–cholesterol) และ ระดับไตรกลีเซอไรด์ (triglycerides) ในตัวอย่างพลาสมา ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูปของ Roche Diagnostics Corp., USA. กับเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ (automatic analyzer) รุ่น Roche/Hitachi 917 ของ Hitachi, Japan แล้วนำค่าที่วัดได้มาคำนวณหาระดับคอเลสเทอรอลใน LDL (LDL–cholesterol) หน่วยเป็น mg% (มิลลิกรัม ต่อ 100 มิลลิลิตรของพลาสมา) จากสูตร "LDL-cholesterol (mg%) = total cholesterol (mg%) – HDL-cholesterol (mg%) – triglycerides/5 (mg%)" (Stein, 1986)

2.5 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ LDL ที่เตรียมได้

2.5.1 การทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอรีซิส (agarose gel electrophoresis)

ดัดแปลงจากวิธีของ Stein (1986) โดยการหลอมเหลวสารละลายอะกาโรสที่ความเข้มข้น 1.5% ใน Tris-salicylate pH 8.7 (รายละเอียดส่วนประกอบของ Tris-salicylate อยู่ในภาคผนวก 2) ด้วยความร้อนประมาณ 80^0ซ จนเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเทลงบนถาดรอง (cast) ให้แผ่นอะกาโรสเจลที่เตรียมได้มีขนาด 6.5×10×0.4 เซนติเมตร แล้วเสียบหวี (comb) สำหรับทำเป็นช่องบรรจุสารตัวอย่าง (well) ลงไป เมื่อเจลแข็งตัวได้ที่ แล้วดึงหวีที่เสียบไว้ออก เติมสารละลายตัวอย่างที่ต้องการทดสอบในแต่ละช่อง ทำอิเล็กโทรฟอรีซิสในบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกับที่ระบุข้างต้น เปิดความต่างศักย์คงที่ 65 โวลต์ (volt) นาน 2 ชั่วโมง ปิดกระแสไฟฟ้า แล้วนำแผ่นเจลที่ได้ไปย้อมไลโปโปรตีนด้วยสี Fat red 7B โดยแช่แผ่นเจลในสารละลาย 0.02% Fat red 7B ใน 85% (v/v) เมธานอล (methanol) ทิ้งไว้ค้างคืน จากนั้นล้างสีที่ไม่ต้องการออกด้วยสารละลาย 25% เมธานอล จนเห็นแถบไลโปโปรตีนสีแดงชัดเจน ส่วนการย้อมแถบโปรตีนทำโดยแช่แผ่นเจลทิ้งไว้ค้างคืนในสารละลายสีย้อม (staining solution) ซึ่งประกอบด้วย 0.5% Ponceau S ใน 5% TCA แล้วล้างสีที่ไม่ต้องการออกด้วยสารละลาย 3% (v/v) กรดแอซีติก จนเห็นแถบสีแดงชัดเจน

2.5.2 การทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิส (polyacrylamide gel electrophoresis)

ใช้ตามวิธีการของ Skinner (1992) โดยเตรียมแผ่นโพลีอะคริลาไมด์เจล (slab gel) ให้มีความเข้มข้นของโพลีอะคริลาไมด์เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตั้งแต่ร้อยละ 3 จนถึงร้อยละ 15 ตามส่วนประกอบข้างล่างนี้

ส่วนประกอบ	ปริมาตรของสาร (ไมโครลิตร)	
	3% gel	15% gel
30% acrylamide + 0.8% bis-acrylamide	250	1,300
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	1,165	1,165
10% ammonium persulphate	30	30
TEMED	5	5
น้ำกลั่น	1,050	-
ปริมาตรรวม (ไมโครลิตร)	2,500	2,500

หลังจากเจลแข็งตัวได้ที่แล้ว นำแผ่นเจลที่ได้มาทำอิเล็กโทรฟอรีซิสโดยมี Tris-borate pH 8.35 (รายละเอียดส่วนประกอบของ Tris-borate อยู่ในภาคผนวก 3) เป็นอิเล็กโทรดบัฟเฟอร์ (electrode buffer) ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าคงที่ 70 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที จึงปิดกระแสไฟฟ้า แล้วนำสารตัวอย่างซึ่งผสมกับบัฟเฟอร์สารตัวอย่าง (sample buffer) [(Tris-borate pH 8.35 ที่มี 40% ซูโครส (sucrose) และ 0.4% สีโบรโมฟีนอลบลู (bromophenol blue) อยู่ด้วย] ในอัตราส่วน 3: 1 โดยปริมาตร มาใส่ลงในแต่ละช่องบรรจุสารตัวอย่างของแผ่นเจล แล้วทำอิเล็กโทรฟอรีซิส โดยใช้บัฟเฟอร์ชนิดเดิม เปิดความต่างศักย์คงที่ 20 โวลต์ นาน 20 นาที ความต่างศักย์คงที่ 70 โวลต์ นาน 30 นาที และความต่างศักย์คงที่ 120 โวลต์ นาน 20 ชั่วโมง ปิดกระแสไฟฟ้า นำเจลที่ได้ไปแช่ในสารละลายสีย้อมโปรตีน (staining solution) ซึ่งประกอบด้วย 0.02% สีคูแมสซีบลู (Coomassie brilliant blue R250), 7.5% (v/v) กรดแอซีติก และ 50% (v/v) เมธานอล ทิ้งไว้ค้างคืน จากนั้นล้างสีที่ไม่ต้องการออกด้วย 5% (v/v) เมธานอล ใน 7.5% (v/v)

กรดแอซีติก จนกว่าจะเห็นแถบสีน้ำเงินของโปรตีนชัดเจน ในกรณีที่ย้อมแถบไลโปโปรตีนด้วยสี Oil red O ทำโดย แช่แผ่นเจลในสารละลาย 0.04% Oil red O ใน 60% (v/v) เอธานอล ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 55^0ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงล้างสีที่ไม่ต้องการออกด้วย 5% (v/v) กรดแอซีติก จนเห็นแถบสีแดงอมส้มของไลโปโปรตีนชัดเจน

2.6 การทำปฏิกิริยาออกซิเดชันของ LDL

2.6.1 การใช้อนุมูลโลหะเป็นตัวเหนี่ยวนำปฏิกิริยาออกซิเดชันของ LDL

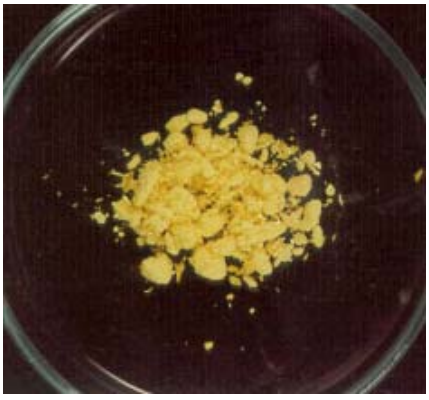
ดัดแปลงจากวิธีการที่ระบุโดย Williams และคณะ (1995) และ Pitaknantakul (1998) โดยนำ LDL ที่เตรียมได้จากหัวข้อ 2.1.2 มาเจือจางด้วย 10 mM PBS pH 7.4 ซึ่งผ่านการไล่อากาศออกแล้ว จากนั้นเริ่มต้นปฏิกิริยาโดยการเติมสารละลายวิตามินซี (ascorbic acid) และ $FeSO_4$ ใน PBS ซึ่งเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนใช้งาน ลงไปตามลำดับ ให้ได้ความเข้มข้นของสารละลายผสม (reaction mixture) ตามต้องการ หลังจากผสมให้เข้ากันนำไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37^0ซ ทันที จับเวลา เมื่อครบทุก ๆ 30 นาที ดูดสารละลายผสมที่บ่มไว้นี้ (ปริมาตร 2.8 มิลลิลิตร) ออกมา 200 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย 2.1% EDTA ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เพื่อยับยั้งปฏิกิริยาทันที หลังจากนั้นจึงนำมาหาปริมาณสารประกอบ TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) ซึ่งได้แก่ malondialdehyde (MDA) และอนุพันธ์ของอัลดีไฮด์ชนิดนี้ (malondialdehyde like substance) โดยการเติม 25% TCA ปริมาตร 250 ไมโครลิตร, 8% SDS ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และ 1% TBA ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงไปตามลำดับ ผสมให้เข้ากัน นำไปอุ่นไว้ที่อุณหภูมิ 80^0ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากเย็นลงปั่นแยกตะกอนออกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง รุ่น 5804 R ของ Eppendorf โดยใช้โรเตอร์แบบ fixed-angle ชนิด F 45-30-11 ด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แยกส่วนใสที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร เทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มี LDL อยู่ด้วย (blank) จากนั้นนำค่าที่วัดได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐานที่เตรียมขึ้นโดยใช้สารละลาย MDA ความเข้มข้นต่าง ๆ กันใน 50 mM H_2SO_4 ทำปฏิกิริยากับ TBA แทนสารละลายผสม

2.6.2 การทำปฏิกิริยาออกซิเดชันของ LDL กับสารประกอบที่แตกตัวให้อนุมูลอิสระ (Williams *et al*., 1995)

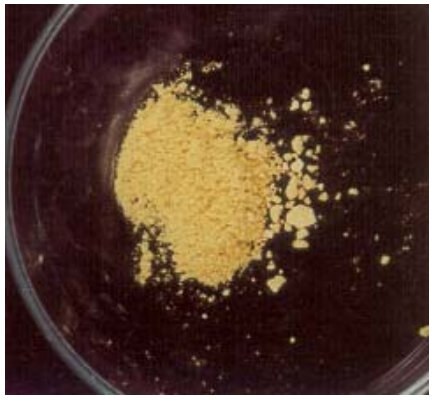
ดำเนินการเช่นเดียวกับในหัวข้อ 2.6.1 ยกเว้นเติมสารละลาย AAPH เพื่อก่อปฏิกิริยาลงไปแทน $FeSO_4$ กับวิตามินซี และใช้ 0.25 mM BHT เพื่อหยุดปฏิกิริยาแทน 2.1% EDTA

2.7 การเตรียมสารสกัดจากมะพูดสำหรับทดสอบในปฏิกิริยาออกซิเดชันของ LDL

สารบริสุทธิ์ 2 ชนิดจากมะพูด ได้แก่ ES1.2 ซึ่งสกัดแยกได้จากส่วนสกัดหยาบของเมธานอลจากเนื้อของผล และ GXM ซึ่งสกัดแยกได้จากส่วนสกัดหยาบของแอซีโตน (acetone) จากใบมะพูด และผ่านขั้นตอนทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโทกราฟี (chromatography) และการตกผลึก สารทั้งสองชนิดมีลักษณะเป็นผงละเอียดสีเหลือง ดังแสดงในรูปที่ 12 ก่อนการทดสอบทุกครั้ง นำผงสารสกัดแต่ละชนิดมาละลายในเอธานอลเข้มข้น (absolute ethanol) แล้วจึงผสมกับสารละลาย LDL ใน 10 mM PBS pH 7.4 ให้ได้ความเข้มข้นตามต้องการ ก่อนเติมสารก่อปฏิกิริยาออกซิเดชันตามที่ระบุในข้อ 2.6 ลงไป ทั้งนี้โดยให้สารละลายผสมที่ได้มีความเข้มข้นของเอธานอลไม่เกิน 0.05% (v/v)



ES1.2



GXM

รูปที่ 12 สารบริสุทธิ์ที่สกัดได้จากผลมะพูด (ES1.2) และ ใบมะพูด (GXM) ตามลำดับ

2.8 การหาปริมาณฟีนอลที่เป็นส่วนประกอบ (phenolic content) ของสารสกัดจากมะพูด (Julkunen-Tiitto, 1985)

นำสารละลาย GXM และ ES1.2 ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในเอธานอลเข้มข้นปริมาตร 5 มิลลิลิตร มาเติมสารละลาย Folin Ciocalteau's phenol reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที จากนั้นเติมสารละลายอิ่มตัวของ Na_2CO_3 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงไป ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้นาน 1 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐานที่เตรียมจากสารละลายฟีนอลความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เพื่อคำนวณหาปริมาณฟีนอลที่เป็นส่วนประกอบของสารสกัดแต่ละชนิดต่อไป

2.9 การวัดความสามารถจับ (chelate) Fe^{2+} ของสารสกัดจากมะพูด (Shimada *et al.*, 1992)

นำสารละลายของสารสกัดแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใน 10 mM hexamine pH 5.0 (รายละเอียดส่วนประกอบของ hexamine buffer อยู่ในภาคผนวก 4)ปริมาตร 2 มิลลิลิตร มาผสมกับบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกันที่มี 3 mM $FeSO_4$ อยู่ด้วย ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วจึงเติม 1 mM TMM ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงไปเพื่อทำปฏิกิริยากับ Fe^{2+} เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีชมพู หลังจากผสมให้เข้ากันดี นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 485 และ 530 นาโนเมตร จากนั้นหาอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ดังกล่าว แล้วนำไปเทียบกับกราฟมาตรฐานที่เตรียมขึ้นจากปฏิกิริยาระหว่าง TMM กับ $FeSO_4$ ในปริมาณต่าง ๆ กัน เพื่อคำนวณหาปริมาณ Fe^{2+} อิสระที่เหลืออยู่ในสารละลายผสมต่อไป

2.10 การวัดความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ (free radical scavenging activity) ของสารสกัดจากมะพูด (Tamura *et al.*, 1990)

นำสารละลายของสารสกัดแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในเอธานอลเข้มข้น ปริมาตร 15 ไมโครลิตร มาผสมกับสารละลาย 0.05 mM DPPH ในเอธานอลเข้มข้น ปริมาตร 900 ไมโครลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่

ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ทุก ๆ เวลา 100 วินาที จนครบ 15 นาที เทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีสารสกัดอยู่ด้วย จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาเปอร์เซนต์การยับยั้งปฏิกิริยา (% inhibition) (Yamasaki et al., 1994)

จากสมการ $[(A_{control} - A_{sample})/A_{control}] \times 100$

เมื่อ A_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารละลายที่ผสมกับ DPPH แล้ว

$A_{control}$ = ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของ DPPH และตัวทำละลายที่ใช้

เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูล $DPPH^{\bullet}$ ของสารสกัดแต่ละชนิดต่อไป