บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ paraxanthine และ caffeine ในซีรั่ม

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ paraxanthine และ caffeine ในซีรั่ม พัฒนามาจากวิธีการศึกษาของ Koch J.P.และคณะ[106] พบว่าความเข้มข้นต่ำสุดของ paraxanthine ในซีรั่มตัวอย่างที่วิเคราะห์ได้คือ 0.125 μg/ml มีค่า % RSD เท่ากับ 3.72 ความเข้มข้นต่ำสุดของ caffeineในซีรั่มตัวอย่างที่วิเคราะห์ได้คือ 0.25 μg/ml มีค่า %RSD เท่ากับ 6.79 จะเห็นได้ว่าความเข้มข้นของสารดังกล่าวที่วิเคราะห์ได้ในซีรั่มตัวอย่างมีค่าต่ำกว่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ในกลุ่มตัวอย่าง และค่า %RSD ของระดับต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้มีค่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้คือไม่เกิน 20%[118] ดังนั้นการหาความเข้มข้นของ paraxanthine และ caffeine ในซีรั่มด้วยวิธีดังกล่าวจึงมีความไวเพียงพอสำหรับงานวิจัยนี้

การหาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ซึ่งแสดงในรูปของ % analytical recovery พบว่าความถูกต้องของการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ paraxanthine และ caffeine ในซีรั่ม มีค่า % analytical recovery เฉลี่ยเท่ากับ 100.63 ± 4.24 % และ 98.34 ± 2.4 % ตามลำดับ โดยอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้คือ 85-115%[106] แสดงให้เห็นว่าวิธีดังกล่าวมีความถูกต้องเป็นที่ยอมรับได้ การหาประสิทธิภาพของวิธีการสกัด paraxanthine และ caffeine ในซีรั่ม แสดงในรูปของ % physical recovery พบว่า % physical recovery ของวิธีการสกัด paraxanthine และ caffeine ในซีรั่มมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 87.61 ± 1.8 % และ 91.17 ± 2.01 % ตามลำดับ โดยอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้คือ 85 – 115 %[106] แสดงให้เห็นว่าการสกัดสารโดยวิธีนี้มีประสิทธิภาพ

การหาความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ความเข้มข้นของ paraxanthine และ caffeine ในซีรั่มเป็นการหาค่า % RSD ของการวิเคราะห์ พบว่าความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ paraxanthine ในซีรั่มในวันเดียวกันและวิเคราะห์ต่างวันกันมีค่า % RSD เฉลี่ยเท่ากับ 2.88 % และ 5.25 % ตามลำดับ ความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ caffeine ในซีรั่มในวันเดียวกันและวิเคราะห์ต่างวันกันมีค่า % RSD เฉลี่ยเท่ากับ 3.07 % และ 5.78 % ตามลำดับ ทั้งนี้ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของการวิเคราะห์ในวันเดียวกันและการวิเคราะห์ต่างวันกันต้องมีค่าไม่เกิน 10% และ 15% ตามลำดับ[106,118] จะเห็นได้ว่าการวิเคราะห์โดยวิธีนี้มีความเที่ยงตรงและเชื่อถือได้

การหาความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์ซึ่งแสดงโดย chromatogram พบว่า peak ของ paraxanthine, caffeine และ 8–chlorotheophyllline ซึ่งเป็น intetrnal standard ไม่ถูกรบกวนด้วย peak ใด ๆ ในซีรั่มโดยเปรียบเทียบกับซีรั่มที่ไม่มีสารเหล่านี้

การหาความเป็นเส้นตรงของ paraxanthine และ caffeine ในซีรั่มตัวอย่างในช่วงความเข้มข้น 0–8 μg/ml พบว่ามีค่า coefficient of determination (R^2) ของ paraxanthine และ caffeine ในซีรั่มเท่ากับ 0.9999 และ 0.9996 ตามลำดับ แสดงถึงมีความเป็นเส้นตรงเพราะค่าที่ได้เข้าใกล้ 1 และช่วงค่าที่วัดได้คลอบคลุมความเข้มข้นที่ตรวจพบในซีรั่มของกลุ่มตัวอย่าง

การวิเคราะห์หาความคงตัวของสารละลายมาตรฐานในซีรั่ม ซึ่งทำการศึกษาในช่วง 1 – 24 สัปดาห์ พบว่าแต่ละครั้งของการวิเคราะห์ได้ค่า area ratio ไม่แตกต่างจากเวลาที่ 0 แสดงว่า paraxanthine และ caffeine มีความคงตัวดี

จะเห็นได้ว่าการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ paraxanthine และ caffeine ในซีรั่มตัวอย่างโดยใช้วิธีดังกล่าวเป็นที่ยอมรับและเชื่อถือได้

การศึกษาการทำงานของเอนไซม์ CYP 1A2 โดยใช้ caffeine เป็น probe มีหลายวิธีดังกล่าวในบทนำ การศึกษานี้เลือกใช้ paraxanthine / caffeine ratio เป็น indicator เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของ caffeine ดังรูปที่ 6[84] จะได้ paraxanthine ซึ่งเป็นเมแทบอไลต์หลักที่พบมากที่สุดถึง 84 %[101] และเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ CYP1A2 เพียงตัวเดียวเท่านั้น ส่วนการเปลี่ยนแปลงของ caffeine แล้วได้เมแทบอไลต์อื่น เช่น theophylline, theobromine, monomethylxanthine และสารในกลุ่ม urate เกิดจากการทำงานของเอนไซม์หลายชนิดร่วมกัน ได้แก่ CYP2E1, CYP3A4, CYP2A6, xanthine oxidase, และ N- acetyltransferase[74,82,101] นอกจากนี้เมแทบอไลต์ดังกล่าวพบเพียงเล็กน้อย การเลือกใช้ซีรั่มเพื่อหาความเข้มข้นของ paraxanthine และ caffeine แทนการใช้ปัสสาวะมีความเหมาะสมเนื่องจากในปัสสาวะมีปริมาณของ paraxanthine และ caffeine น้อย[84] และการเปลี่ยนแปลงนั้นเกิดจากการทำงานของเอนไซม์หลายชนิดดังกล่าว จึงไม่เหมาะสมที่จะใช้เมแทบอไลต์ตัวอื่นเป็น indicator ของ CYP1A2 นอกจากนี้เมแทบอไลต์ของ cafffeine ที่ขับออกทางปัสสาวะขึ้นอยู่กับการทำงานของไตและอัตราการขับปัสสาวะของแต่ละคน[84,101] ดังนั้นการเลือกใช้ซีรั่มจึงเป็นวิธีที่เหมาะสมกว่า

การนำ caffeine มาใช้เป็น probe ในการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ CYP1A2 จำเป็นต้องเลือกขนาดให้เหมาะสม มีการศึกษาของ Juan A.Carrillo และคณะ[102] โดยใช้ caffeine ขนาด 300 mg พบว่ากลุ่มตัวอย่างเกิดอาการไม่พึงประสงค์ ได้แก่ ปวดศีรษะ ท้องเสีย ใจสั่น เป็นต้น ในการศึกษานี้จึงเลือกใช้ caffeine ขนาด 180 mg ซึ่งมีความใกล้เคียงกับ caffeine ที่เป็นส่วนประกอบในกาแฟ พบว่าไม่ทำให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์ใด ๆ และสามารถตรวจวัดระดับได้ นอกจากนี้ยังต้องหาเวลาที่เหมาะสมในการเจาะเลือดเพื่อหาความเข้มข้นของ paraxanthine และ caffeine ในซีรั่มเนื่องจาก paraxanthine เป็นทั้ง substrate และ product

ของเอนไซม์ CYP1A2[101] จึงจำเป็นต้องเลือกเวลาในช่วงแรกของการได้รับ caffeine การศึกษาเพื่อหาเวลาที่เหมาะสมในการเจาะเลือดที่ผ่านมาได้แก่ การศึกษาของ Juan A. Carrillo และคณะ[103] พบว่าเวลาที่เหมาะสมในการเจาะเลือดคือ 4 ชั่วโมงภายหลังรับประทาน caffeine หรือการศึกษาของ Dong-Sheng Ou-Yang และคณะ[82] พบว่าเวลาที่เหมาะสมคือ 6 ชั่วโมงภายหลังรับประทาน caffeine โดยเวลาดังกล่าวเป็นเวลาที่ paraxanthine มีระดับสูง จะเห็นได้ว่าการศึกษาดังกล่าวมีความแปรผันในแต่ละกลุ่มประชากร ดังนั้นในการศึกษานี้ซึ่งใช้กลุ่มตัวอย่างเป็นคนไทยและยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อน จึงจำเป็นต้องหาเวลาที่เหมาะสมในการเจาะเลือดโดยศึกษานำร่องในอาสาสมัครจำนวน 3 คน ใช้ caffeine ขนาด 180 mg พบว่าเวลาที่ paraxanthine มีระดับสูงและตรวจวัดได้คือ 5 ชั่วโมงหลังรับประทาน caffeine ซึ่งเป็นเวลาที่ใกล้เคียงกับการศึกษาของ Juan A. Carrillo[103] และการศึกษาของ Dong-Sheng Ou-Yang[82]

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารกลุ่ม PAHs ที่มีแหล่งกำเนิดจากควันท่อไอเสียรถยนต์ต่อการทำงานของเอนไซม์ CYP 1A2 โดยใช้ paraxanthine / caffeine ratio ในซีรั่มเป็นดัชนีชี้วัดจึงคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างเป็นประชากรที่อาศัยอยู่ต่างจังหวัดซึ่งไม่ได้รับควันจากท่อไอเสียรถยนต์เป็นเวลา 1 ปีขึ้นไปเป็นกลุ่มควบคุม และคัดเลือกพนักงานเก็บค่าโดยสารรถประจำทางไม่ปรับอากาศขององค์การขนส่งมวลชนกรุงเทพฯ ซึ่งได้รับควันจากท่อไอเสียรถยนต์เป็นเวลา 1 ปีขึ้นไปเป็นกลุ่มทดลอง กลุ่มตัวอย่างทั้งสองกลุ่มมีอาชีพแตกต่างกัน กล่าวคือ กลุ่มควบคุมมีอาชีพทำนา ทำสวน หรือเป็นแม่บ้าน ส่วนกลุ่มทดลองทำงานวันละ 8 – 12 ชั่วโมง สัปดาห์ละ 6 วัน ระยะเวลาการทำงานตั้งแต่ 1 – 20 ปี (เฉลี่ย 5.73 $\pm$4.91) และไม่ได้ใช้อุปกรณ์ในการป้องกันควันพิษ เช่น ผ้าปิดจมูก คัดเลือกกลุ่มตัวอย่างเป็นเพศหญิงทั้งสองกลุ่มเนื่องจากในเพศชายมักสูบบุหรี่และดื่มสุรา มีการศึกษาของ Werner Kalow และคณะ[74] และการศึกษาของ Woon-Gye Chung[81] พบว่าในผู้ที่สูบบุหรี่มีการทำงานของเอนไซม์ CYP1A2 สูงกว่าผู้ที่ไม่สูบบุหรี่ เนื่องจากในควันบุหรี่มีส่วนประกอบของสาร PAHs ซึ่งเป็นตัวเหนียวนำการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าว การศึกษาของ Nathalie Rizzo และคณะ[94] พบว่าในผู้ที่ดื่มสุรามีการทำงานของเอนไซม์ CYP1A2 ต่ำกว่าผู้ที่ไม่ดื่มสุราเนื่องจากแอลกอฮอลล์มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP1A2 การศึกษาที่ผ่านมาพบว่าอายุมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ CYP1A2 โดยในวัยผู้ใหญ่หรือวัยเจริญพันธุ์มีการทำงานของเอนไซม์ CYP1A2 สูงกว่าวัยอื่น[81-81] ดังนั้นการศึกษานี้จึงคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างที่มีอายุระหว่าง 25 – 45 ปี และเป็นผู้ที่มีสุขภาพปกติ ไม่มีโรคตับและโรคไต เนื่องจากในผู้ที่มีการทำงานของตับผิดปกติจะมีอัตราการกำจัด caffeine ออกจากร่างกายช้า[102,120] จึงคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างโดยทำการตรวจการทำงานของตับและไต พบว่ากลุ่มตัวอย่างทั้งสองกลุ่มมีการทำงานของตับและไตเป็นปกติ นอกจากนี้กลุ่มตัวอย่างจะต้องไม่ได้รับยาหรือสารที่มีผลรบกวนการเปลี่ยนแปลงของ caffeine ได้แก่ omeprazole ซึ่งเหนี่ยวนำการทำงานของเอนไซม์ CYP1A2[84] หรือเป็นกลุ่มที่ไม่ตั้งครรภ์และไม่ใช้ยาคุมกำเนิด เนื่องจากมีการศึกษาของ Catteau และคณะ[95] พบว่ายาคุมกำเนิดมีผลยับยั้งการทำงานของ CYP1A2 แต่รอบประจำเดือนไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์นี้[96]

การศึกษาการทำงานของเอนไซม์ CYP1A2 ในกลุ่มควบคุมเปรียบเทียบกับกลุ่มทดลอง โดยใช้ paraxanthine / caffeine ratio ในซีรั่มเป็นดัชนีชี้วัด พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P=0.043) แต่มีความแตกต่างกันไม่มากอาจเนื่องมาจากจำนวนตัวอย่างน้อย จากการทดลองพบว่ากลุ่มทดลองมีค่า paraxanthine / caffeine ratio ในซีรั่มสูงกว่ากลุ่มควบคุม ซึ่งแสดงให้เห็นว่า CYP1A2 ถูกกระตุ้นจึงทำให้ระดับ paraxanthine ที่เวลา 5 ชั่วโมงหลังได้รับ caffeine ในกลุ่มทดลองมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ จึงเป็นไปได้ว่ากลุ่มทดลองได้รับสาร PAHs จากควันท่อไอเสียรถยนต์และเป็นกลุ่มที่มีความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งเนื่องจากสาร PAHs มีคุณสมบัติทำให้เกิดมะเร็งภายหลังถูกเปลี่ยนแปลงด้วยเอนไซม์จนได้เมแทบอไลต์ที่มีฤทธิ์เป็น carcinogen[5] นอกจากนี้ PAHs ยังมีคุณสมบัติเหนี่ยวนำการทำงานของเอนไซม์ใน family CYP1A ทั้ง CYP1A1 และ CYP1A2[20,29] โดยเอนไซม์ทั้งสองมีบทบาทในการเปลี่ยนแปลงสารพิษให้ได้เมแทบอไลต์ที่มีฤทธิ์ก่อมะเร็งและหรือการกลายพันธุ์[74,79]

งานวิจัยนี้ยืนยันว่ากลุ่มตัวอย่างทั้งสองได้รับควันจากท่อไอเสียรถยนต์แตกต่างกันโดยการวัดระดับ carbonmonoxide ในเลือด ส่วนการยืนยันว่าร่างกายได้รับ PAHs จริงทำได้โดยการวัดระดับ 1-hydroxypyrene ซึ่งเป็นเมแทบอไลต์ของ PAHs ที่ตรวจพบในปัสสาวะ แต่วิธีการดังกล่าวมีความซับซ้อน[45]

carbonmonoxide เป็นก๊าซที่มีพิษ เกิดจากกระบวนการเผาไหม้ไม่สมบูรณ์เช่นเดียวกับ PAHs[109] ดังนั้นเมื่อเกิดการเผาไหม้ไม่สมบูรณ์จึงพบ PAHs ร่วมกับ carbonmonoxide การวัดระดับ carbonmonoxide ในเลือดทำได้โดยการวัดระดับ carboxyhemoglobin ซึ่งมีความสัมพันธ์กับปริมาณ carbonmonoxide ที่ร่างกายได้รับ กล่าวคือ ถ้าร่างกายได้รับ carbonmonoxide มาก จะมีระดับของ carboxyhemoglobin ในเลือดสูง เนื่องจาก carbonmonoxide ไปจับกับ hemoglobin แทนที่ออกซิเจน[115] จากการศึกษานี้พบว่าระดับ carboxyhemoglobin ในเลือดระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P=0.001) กล่าวคือในกลุ่มทดลองมีระดับ carboxyhemoglobin สูงกว่ากลุ่มควบคุม ซึ่งแสดงให้เห็นว่ากลุ่มทดลองมีระดับ carbonmonoxide ในเลือดสูงกว่ากลุ่มควบคุมและเป็นกลุ่มที่ได้รับควันจากท่อไอเสียรถยนต์จริง

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1. การหาความเข้มข้นของ paraxanthine และ caffeine ในซีรั่มโดยใช้วิธีดังกล่าวเป็นวิธีที่เชื่อถือได้ มีความแม่นยำ สามารถนำไปใช้ได้

2. จากการศึกษาพบว่า paraxanthine / caffeine ratio ในซีรั่มเป็นดัชนีชี้วัดที่ดีในการวัดการทำงานของเอนไซม์ CYP1A2 เนื่องจาก paraxanthine เป็นเมแทบอไลต์หลักที่พบมากที่สุดและเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ CYP1A2 เพียงตัวเดียวเท่านั้น ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ CYP1A2 ในกลุ่มคนที่ได้รับสาร PAHs จากแหล่งอื่นหรือเป็น

แนวทางในการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ CYP1A2 ในผู้ที่ได้รับยาที่มีฤทธิ์เหนี่ยวนำการทำงานของเอนไซม์นี้

3. จากผลการทดลองหาค่า paraxanthine / caffeine ratio ในซีรั่มระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองซึ่งพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P=0.043) แต่มีความแตกต่างกันไม่มากอาจเนื่องมาจากจำนวนตัวอย่างน้อย ดังนั้นจึงน่าจะมีการศึกษาต่อไปโดยใช้จำนวนตัวอย่างที่มีจำนวนมากขึ้นกว่านี้

4. การตรวจวัดระดับ carbonmonoxide ในเลือดเป็นเพียงการยืนยันว่ากลุ่มตัวอย่างได้รับควันจากท่อไอเสียรถยนต์จริงไม่ได้วัดระดับ PAHs โดยตรง จึงไม่สามารถบอกได้อย่างแน่ชัดว่าร่างกายได้รับสาร PAHs จริงหรือไม่ การวัดปริมาณ PAHs ทำได้โดยการหาระดับ 1-hydroxypyrene ในปัสสาวะซึ่งเป็นเมแทบอไลต์ของ PAHs และวิธีการวัดค่อนข้างยุ่งยากซับซ้อน