



เอกสารอ้างอิง

- อัฒชลี มโหศิริโยคม. "ความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงบางอย่างทางชีวเคมีกับการเจริญของเนื้องอก" วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบัณฑิต ภาววิชาชีวเคมี บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2526
- อุทัย ชัยกิตติศิลป์. "Trophoblastic Diseases." ใน นารีเวชวิทยา, หน้า 113-127. สมหมาย อังสุวรรณ, บรรณาธิการ, โครงการตำราศิริราช คณะแพทย-ศาสตร์ศิริราชพยาบาล, เจริญวิทย์การพิมพ์, 2523
- Abe, F., and Samejima, K. "A New Fluorometric Method for the Determination of Spermidine and Spermine in Tissues by Thin Layer Chromatography." Analytical Biochemistry 67 (1975): 298-308.
- Abraham, G.E. "Solid Phase Radioimmunoassay of Estradiol-17 $\beta$ ." Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 29 (1969): 866-870.
- Abraham, G.E. "Radioimmunoassay of Steroids in Biological Materials." Acta Endocrinologica 75 Supplement 183 (1974): 1-42.
- Anderson, A.C., Henningson, S., and Rosengren, E. "Increased Formation of Diamines and Polyamines in the Pregnant Rat." Journal of Physiology 285 (1978): 311-324.
- Anderson, W.A.D., Kissane, J.M. in Pathology 7th ed. Vol. 2 pp. 1761-1764, The C.V. Mosby Company, St. Louis, 1977.
- d'Anna, M. "Preliminary Study of Urinary Polyamines in Non-pregnant Women, the Normal Gravid, and Miscarriage during the First Trimester." Minerva Ginecologica 31 (1979): 327-335.



- Atkins, J.F., Lewis, J.B., Anderson, C.W., and Gesteland, R.F.  
"Enhanced Differential Synthesis of Proteins in a Mammalian Cell-Free System by Addition of Polyamines." The Journal of Biological Chemistry 250 (1975): 5688-5695.
- Bachrach, U. "Spermidine Oxidase from *Serratia marcescens*." The Journal of Biological Chemistry 237 (1962): 3443-3448.
- Bachrach, U., and Oser, I.S. "Enzymatic Assay for Spermidine." The Journal of Biological Chemistry 238 (1963): 2098-2101.
- Bachrach, U., and Reches, B. "Enzymatic Assay for Spermine and Spermidine." Analytical Biochemistry 17 (1966): 38-48.
- Bachrach, U., Persky, S., and Razin, S. "Metabolism of Amines: 2. The Oxidation of Natural Polyamines by *Mycobacterium smegmatis*." Biochemical Journal 76 (1960): 306-310.
- Bartos, D., Campbell, R.A., Bartos, F., and Grettie, D.P. "Direct Determination of Polyamines in Human Serum by Radioimmunoassay." Cancer Research 35 (1975): 2056-2060.
- Bartos, F., Bartos, D., Grettie, D.P., and Campbell, R.A.  
"Polyamine Levels in Normal Human Serum: Comparison of Analytical Methods." Biochemical and Biophysical Research Communications 75 (1977): 915-919.
- Beaconsfield, P., Birdwood, G., and Beaconsfield, R. "The Placenta." Scientific American 243 (1980): 80-88.
- Benson, J.R., and Hare, P.E. "O-Phthalaldehyde: Fluorogenic Detection of Primary Amines in the Picomole Range Comparison with Fluorescamine and Ninhydrin." Proceedings of the National Academy of Sciences 72 (1975): 619-622.



- Binoux, M.A., and Odell, W.D. "Use of Dextran-Coated Charcoal to Separate Antibody-Bound from Free Hormone: A Critique." Journal of Endocrinology and Metabolism 36 (1973): 303-310.
- Blaschko, H., and Hawes, R. "Observations on Spermine Oxidase of Mammalian Plasma." Journal of Physiology 145 (1959): 124-131.
- Blaschko, H., Friedman, P.J., Hawes, R., and Nilsson, K. "The Amine Oxidase of Mammalian Plasma." Journal of Physiology 145 (1959): 384-404.
- Braganca, B.M., Hospattankar, A.V., Electricwalla, S.E., and Vaidya, N.R. "Microdetermination of Polyamines with Snake Venom Oxidase." Analytical Biochemistry 92 (1979): 453-461.
- Calderera, C.M., and Moruzzi, G. "Polyamines and Nucleic Acid Metabolism in the Chick Embryo." Annals of the New York Academy of Sciences 171 (1970): 709-722.
- Chaisiri, P., Harper, M.E., and Griffiths, K. "Plasma Spermine Concentrations of Patients with Benign and Malignant Tumors of the Breast or Prostate." Clinical Chimica Acta 92 (1979): 273-282.
- Chaisiri, P., Harper, M.E., Blamey, R.W., Peeling, W.B., and Griffiths, K. "Plasma Spermidine Concentrations in Patients with Tumors of the Breast or Prostate or Testis." Clinical Chimica Acta 104 (1980): 367-375.
- Challand, G., Goldie, D., and London, J. "Immunoassay in the Diagnostic Laboratory." British Medical Bulletin 30 (1974): 38-43.



- Chium J.F., and Sung, S.C. "Effect of Spermidine on the Activity of DNA Polymerase." Biophysica et Biochemica Acta 281 (1972): 535-542.
- Chun, D., Braga, C., Chow, C., and Lok, L. "Clinical Observations on Some Aspects of Hydatidiform Moles." Journal of Obstetrics and Gynecology of the British Commonwealth 71 (1964): 180-184.
- Cohen, S.S., and Lichtenstein, J. "Polyamines and Ribosome Structure." The Journal of Biological Chemistry 235 (1960): 2112-2116.
- Cohen, L.F., Lundgren, D.W., and Farrell, P.M. "Distribution of Spermidine and Spermine in Blood from Cystic Fibrosis Patients and Control Subjects." Blood 48 (1976): 469-475.
- Cooper, K.D., Shukla, J.B., and Rennert, O.M. "Polyamine Distribution in Cellular Compartments of Blood and in Aging Erythrocytes." Clinical Chimica Acta 73 (1976): 71-88.
- Curry, S.L., Hammond, C.B., Tyrey, L., Creasman, W.T., and Parker, R.J. "Hydatidiform Mole: Diagnosis, Management, and Long-Term Follow-up of 347 Patients." Obstetrics and Gynecology 45 (1975): 1-8.
- Delfs, E. "Chorionic Gonadotrophin Determinations in Patients with Hydatidiform Mole and Choriocarcinoma." Annals of the New York Academy of Sciences 80 (1959): 125-139.
- Desser, H., Höcker, P., Weiser, M., and Böhnel, J. "The Content of Unbound Polyamines in Blood Plasma and Leukocytes of Patients with Polycythemia Vera." Clinica Chimica Acta 63 (1975): 243-247.



- Dion, A.S., and Herbst, E.J. "Polyamines Changes during Development of *Drosophila melanogaster*" Annals of the New York Academy of Sciences 171 (1970): 723-734.
- Dreyfuss, G.R., Harell, A., and Chayen, R. "Determination of Polyamines in Urine" Clinica Chimica Acta 49 (1973): 65-72.
- Dubin, D.T., and Rosenthal, S.M. "The Acetylation of Polyamines in *Escherichia coli*." The Journal of Biological Chemistry 235 (1960) : 776-782.
- Durie, B.G.M., Salmon, S.E., and Russell, D.H. "Polyamines as Markers of Response and Disease Activity in Cancer Chemotherapy." Cancer Research 37 (1977): 214-221.
- Ekins, R.P. "Basic Principles and Theory." British Medical Bulletin 30 (1974): 3-11.
- Evans, E.A. "Control of Self-Irradiation Decomposition of Tritium-Labelled Compounds at High Specific Activity." Nature 209 (1966): 169-171.
- Fleisher, J.H., and Russell, D.H. "Estimation of Urinary Diamines and Polyamines by Thin Layer Chromatography." Journal of Chromatography 110 (1975): 335-340.
- Flink, I., and Pettijohn, E.E. "Polyamines Stabilise DNA Folds." Nature 253 (1975): 62-63.
- Fujita, K., Nagatsu, T., Maruta, K., Ito, M., Senba, H., and Miki, K. "Urinary Putrescine, Spermidine, and Spermine in Human Blood and Solid Cancers and in an Experimental Gastric Tumor of Rats." Cancer Research 36 (1976): 1320-1324.



- Fujita, K., Nagatsu, T., Shinpo, K., Maruta, K., Teradaira, R., and Nakamura, M. "Improved Analysis for Urinary Polyamines by Use of High-Voltage Electrophoresis on Paper." Clinical Chemistry 26 (1980): 1577-1582.
- Gabbay, E.J., Glasser, R., and Gaffner, B.L. "Interaction Specificity of Nucleic Acid." Annals of the New York Academy of Sciences 171 (1970): 810-826.
- Garry, M.M., Govan, A.D.T., Hodge, C.H., and Callander, R. in Obstetrics Illustrated pp. 8-15, Churchill Livingstone, 1972.
- Gerner, E.W., and Russell, D.H. "The Relationship between Polyamine Accumulation and DNA Replication in Synchronized Chinese Hamster Ovary Cells after Heat Shock." Cancer Research 37 (1977): 482-489.
- Goldstein, D.P., Kosasa, T.S., Skarim, A.T. "The Clinical Application of a Specific Radioimmunoassay for Human Chorionic Gonadotrophin in Trophoblastic and Nontrophoblastic Tumors." Surgery, Gynecology and Obstetrics 138 (1974): 747-751.
- Goodfriend, T.L., Levine, L., and Fasman, G.D. "Antibodies to Bradykinin and Angiotensin: A Use of Carbodiimides in Immunology." Science 144 (1964): 1344-1346.
- Gosule, L.C., and Schellman, J.A. "Compact form of DNA Induced by Spermidine." Nature 259 (1976): 333-335.
- Hamilton, W.J., and Mossman H.W. in Human Embryo 4th ed., pp. 54-191, The Williams & Wilkins Company, Baltimore, 1972.



- Herbst, E.H., and Bachrach, U. "Metabolism and Biological Functions of Polyamines." Annals of the New York Academy of Sciences 171 (1970): 691-1009
- Herbst, E.J., and Snell, E.E. "Putrescine and Related Compounds as Growth Factors for *Hemophilus parainfluenzae*." The Journal of Biological Chemistry 181 (1949): 47-54.
- Holder, S., Bremer, H.J. "Bestimmung der Di- und Polyamine im Urin: Chromatographische Methoden zur Anreicherung, Trennung und Identifizierung." Journal of Chromatography 25 (1966): 48-57.
- Illei, G., and Morgan, D.M.L. "Polyamine Oxidase Activity in Human Pregnancy Serum." British Journal of Obstetrics and Gynaecology 86 (1979) : 878-881.
- Jaffe, B.M., Smith, J.W., Newton, W.T., and Parker, C.W. "Radioimmunoassay for Prostaglandins." Sciences 171 (1971): 494-496.
- Jänne, T., Raina, A., and Siimes, M., "Spermidine and Spermine in Rat Tissues at Different Ages." Acta Physiologica Scandinavica 62 (1964): 352-358.
- Johnston, C.I. "Radioimmunoassay for Plasma Antidiuretic Hormone." Journal of Endocrinology 52 (1972): 69-78.
- Kai, M., Ogata, T., Haraguchi, K., and Ohkura, Y. "High-Performance Liquid Chromatography Determination of Free and Total Polyamines in Human Serum as Fluorescamine Derivatives." Journal of Chromatography 163 (1979): 151-160.



- Liquori, A.M., Costantino, L., Crescenzi, V., Elia, V., Giglio, R., Puliti, R., Savino, M.S.S., and Vitagliano, V.  
"Complexes between DNA and Polyamines: a Molecular Model"  
Journal of Molecular Biology 24 (1967): 113-122.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J.  
"Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent."  
The Journal of Biological Chemistry 193 (1951): 265-275.
- Lundgren, D.W., Farrell, P.M., and Disant' Agnese, P.A.  
"Polyamine Alterations in Blood of Male Homozygotes and Heterozygotes for Cystic Fibrosis." Clinical Chimica Acta 62 (1975): 357-362.
- Lundgren, D.W., and Oka, T. "Alterations in Polyamine Levels in Rat Blood During Pregnancy and Lactation." American Journal of Physiology 234 (1978): 451-456.
- Mager, J. "The Stabilizing Effect of Spermine and Related Polyamines and Bacterial Protoplasts." Biochemica et Biophysical Acta 36 (1959): 529-531.
- Mahler, H.R., and Mehrotra, B.D. "The Interaction of Nucleic Acid with Diamines." Biochemical et Biophysica Acta 68 (1963): 211-233.
- Makita, M., Yamamoto, S., and Kono, M. "Rapid Determination of Di and Polyamines in Human Urine by Electron Capture Gas Chromatography." Clinica Chimica Acta 61 (1975): 403-405.
- Makita, M., Yamamota, S., Miyake, M., and Masamoto, K. "Practical Gas Chromatographic Method for the Determination of Urinary Polyamines." Journal of Chromatography 156 (1978): 340-345.



- Marton, L.J., and Lee, P.L.Y. "More Sensitive Automated Detection of Polyamine in Physiological Fluids and Tissue Extracts with O-Phthalaldehyde." Clinical Chemistry 21 (1975): 1721-1724.
- Marton, L.J., Russell, D.H., and Levy., C.C. "Measurement of Putrescine, Spermidine and Spermine in Physiological Fluid by Use of an Amino Acid Analyzer." Clinical Chemistry 19 (1973): 923-926.
- Marton, L.J. Heby, O., Wilson, C.B., and Lee, P.L.Y. "A Method for the Determination of Polyamines in Cerebrospinal Fluid." FEBS Letters 46 (1974a): 305-307.
- Marton, L.J., Heby, O., Wilson, C.B., and Lee, P.L.Y. "An Automated Micromethod for the Quantitative Analysis of Di-and Polyamines Utilizing Sensitive High Pressure Liquid Chromatographic Procedure." FEBS Letters 41 (1974b): 99-103.
- Marton, L.J., Heby, O., Levin, V.A., Lubich, W.P. Crafts, D.C., and Wilson, C.L.B. "The Relationship of Polyamines in Cerebrospinal Fluid to the Presence of Central Nervous System Tumors." Cancer Research 36 (1976): 973-977.
- Marton, L.J., Edwards, M.S., Levin, V.A., Lubich, W.P., and Wilson, C.B. "Predictive Value of Cerebrospinal Fluid Polyamines in Medulloblastoma." Cancer Research 39 (1979): 993-997.
- Midgley, A.R., Pierce, G.B. "Immunohistochemical Localization of Human Chorionic Gonadotrophin." The Journal of Experimental Medicine 115 (1962): 289-294.



- Midgley, A.R., Niswender, G.D., and Rebar, R.W. "Principles for the Assessment of the Reliability of Radioimmunoassay Methods (Precision, Accuracy, Sensitivity, Specificity)." Acta Endocrinologica 63 Supplement 142 (1969): 163-184.
- Morris, D.R., and Pardee, A.B. "Multiple Pathways of Putrescine Biosynthesis in *Escherichia coli*." The Journal of Biological Chemistry 241 (1966): 3129-3135.
- Nishioka, K., and Romsdahl, M.M. "Elevation of Putrescine and Spermidine in Sera of Patients with Solid Tumors." Clinica Chimica Acta 57 (1974): 155-161.
- Osterberg, S., Rösen, S., and Heby, O. "Urinary Polyamine Excretion During the Menstrual Cycle." Clinical Chemistry 24 (1978): 769-771.
- Parker, C.W. in Radioimmunoassay of Biological Active Compounds. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey, 1976.
- Pegg, A.E. "Biosynthesis of Putrescine and Polyamines in Mammalian Tissues" Annals of the New York Academy of Sciences 171 (1970): 977-987.
- Pegg, A.E., and Williams-Ashman, H.G. "Enzymatic Synthesis of Spermine in Rat Prostate." Archives of Biochemistry and Biophysics 137 (1970): 156-165.
- Playfair, J.H.L., Hurn, B.A.L., Schulster, D. "Production of Antibodies and Binding Reagents." British Medical Bulletin 30 (1974): 24-31.
- Pritchard, J.A., and Macdonald, P.C. in Williams Obstetrics. Sixteenth Edition, pp. 93-116, Appleton-Century-Crofts, New York, U.S.A., 1980.



- Proctor, M.S., Fletcher, H.V., Jr., Shukla, J.B., and Rennert, O.M. "Elevated Spermidine and Spermine Levels in the Blood of Psoriasis Patients." The Journal of Investigative Dermatology 65 (1975): 409-411.
- Raina, A., Telaranta, T. "Association of Polyamines and RNA in Isolated Subcellular Particles from Rat Liver." Biochimica et Biophysica Acta 138 (1967): 200-203.
- Raina, A., Jänne, J., Hannonen, P., and Hölttä, E. "Synthesis and Accumulation of Polyamines in Regenerating Rat Liver." Annals of the New York Academy of Sciences 171 (1970): 697-708.
- Ratcliffe, J.G. "Separation Techniques in Saturation Analysis." British Medical Bulletin 30 (1974): 32-37.
- Rattenbury, J.M., Lax, P.M., Blau, K., and Sandler, M. "Separation and Quantification of Urinary Di- and Polyamines by Gas Chromatography with Electron Capture Detection." Clinica Chimica Acta 95 (1979): 61-67.
- Robbins, S.L., and Cotran, R.S. in Pathologic Basis of Disease 2nd ed., pp. 1298-1299, W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1979.
- Roitt, I.M. in Essential Immunology. 3rd ed., pp. 47-100, Blackwell Scientific Publications, 1977.
- Rubin, R.L. "Spermidine-Deoxyribonucleic Acid Interaction In Vitro and in Escherichia coli." Journal of Bacteriology 129 (1977): 916-925.



- Russell, D.H. "Discussion: Putrescine and Spermidine Biosynthesis in Growth and Development." Annals of the New York Academy of Sciences 171 (1970): 772-782.
- Russell, D.H. "Clinical Relevance of Polyamines as Biochemical Markers of Tumor Kinetics." Clinical Chemistry 23 (1977a): 22-27.
- Russell, D.H. "Polyamines as Markers of Tumour Kinetics." in Tumour Markers (Griffiths, K., Neville, A.M., and Pierrepoint, C.G. eds.) pp. 295-310, Alpha Omega Publishing Ltd., Cardiff, 1977b.
- Russell, D.H., and Durie, B.G.M. in Polyamines as Biochemical Markers of Normal and Malignant Growths. Raven Press, New York, 1978.
- Russell, D.H., and Levy, C.C. "Polyamine Accumulation and Biosynthesis in Mouse L1210 Leukemia." Cancer Research 31 (1971): 248-251.
- Russell, D.H., and McVicker, T.A. "Polyamine Biogenesis in the Rat Mammary Gland during Pregnancy and Lactation." Biochemical Journal 130 (1972): 71-76.
- Russell, D.H., and Russell, S.D. "Relative Usefulness of Measuring polyamines in Serum, Plasma, and Urine as Biochemical Markers of Cancer." Clinical Chemistry 21 (1975): 860-863.
- Russell, D.H., Medina, V.J., and Synder, S.H. "The Dynamics of Synthesis and Degradation of Polyamines in Normal and Regenerating Rat Liver and Brain." The Journal of Biological Chemistry 245 (1970): 6732-6738.



Russell, D.H., Levy, C.C., Schimpff, S.C., and Hawk, I.A.

"Urinary Polyamines in Cancer Patients." Cancer Research  
31 (1971): 1555-1558.

Russell, D.H., Gullino, P.M., Marton, L.J., and LeGendre, S.M.

"Polyamine Depletion of the MTW9 Mammary Tumor and  
Subsequent Elevation of Spermidine in the Sera of Tumor-  
Bearing Rats as a Biochemical Marker of Tumor Regression."  
Cancer Research 34 (1974a): 2378-2381.

Russell, D.H., Looney, W.B., Kovac, C.J., Hopkins, H.A., Marton,

L.J., LeGendre, S.M. and Morris, H.P. "Polyamine  
Depletion of Tumor Tissue and Subsequent Elevation of  
Spermidine in the Sera of Rats with 3924A Hepatoma after  
5-Fluorouracil Administration." Cancer Research 34 (1974b):  
2382-2385.

Russell, D.H., Durie, G.G.M., and Salmon, S.E. "Polyamines as

Predictors of Success and Failure in Cancer Chemotherapy."  
Lancet 2 (1975): 797-799.

Russell, D.H., Looney, W.B., Kovacs, C.J., Hopkins, H.A. Dattilo,

J.W. and Morris, H.P. "Changes in Serum Putrescine and  
Spermidine Levels following Local Radiation to Hepatoma  
3924A of the Rat." Cancer Research 36 (1976): 420-423.

Russell, D.H., Giles, H.R., Christian, C.D., and LeGendre, S.M.

"Polyamines in Amniotic Fluid, Plasma and Urine during  
Normal Pregnancy." American Journal Obstetrics and  
Gynaecology 132 (1978): 649-652.



Samejima, K., Kawase, M., Sakamoto, S., Okada, M., and Endo, Y.

"A Sensitive Fluorometric Method for the Determination of Aliphatic Diamines and Polyamines in Biological Materials by High-Speed Liquid Chromatography."

Analytical Biochemistry 76 (1976): 392-406.

Sanguansermsri, J. "Polyamines in Cows and Human Milk during Early Lactation." Inaugural-Dissertation, Hohen Mathem.-naturw.Fakultat, Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universitat, Bonn, 1972.

Scatchard, G. "The Attractions of Proteins for Small Molecules and Ions." Annals of the New York Academy of Sciences 51 (1949): 660-672.

Skelley, D.S., Brown, L.P., and Besch, P.K. "Radioimmunoassay." Clinical Chemistry 19 (1973): 146-186.

Skowsky, W.R., and Fisher, D.A. "The Use of Thyroglobulin to Induce Antigenicity to Small Molecules." Journal of Laboratory and Clinical Medicine 80 (1972): 134-144.

Smith, T.A. "The Biosynthesis and Metabolism of Putrescine in Higher Plants." Annals of the New York Academy of Sciences 171 (1970): 988-1001.

Smith, T.A., and Richards, F.J. "The Biosynthesis of Putrescine in Higher Plants and its Relation to Potassium Nutrition." Biochemical Journal 84 (1962): 292-294.

Steel, G.G. "Cell Loss as a Factor in the Growth Rate of Human Tumours." European Journal of Cancer 3 (1967): 381.

Stevens, L., and McCann, L.M. "Interaction of Polyamines with Ribosomes and RNA." Annals of the New York Academy of Sciences 171 (1970): 827-837.



- Tabor, C.W. "The Stabilizing Effect of Spermine and Related Amines on Mitochondria and Protoplasts." Biochemical and Biophysical Research Communications 2 (1960): 117-120.
- Tabor, C.W. "Stabilization of Protoplasts and Spheroplasts by Spermine and other Polyamines." Journal of Bacteriology 83 (1962): 1101-1111.
- Tabor, H., and Tabor, C.W. "Spermidine, Spermine, and Related Amines." Pharmacological Reviews 16 (1964): 245-300.
- Tabor, H., Rosenthal, S.M., and Tabor, C.W. "The Biosynthesis of Spermidine and Spermine from Putrescine and Methionine." The Journal of Biological Chemistry 233 (1958): 907-914.
- Tekada, Y., and Ohnishi, T. "Binding to transfer RNA to Polyamines in Preference to  $Mg^{2+}$ ." Biochemical and Biophysical Research Communications 63 (1975): 611-617.
- Teoh, E.S. "Immunological Diagnosis of Hydatidiform Mole." Journal of Obstetrics and Gynaecology of the British Commonwealth 74 (1967): 80-84.
- Vaitukaitis, J., Robbins, J.B., Neischlag, E., and Ross, G.T. "A Method for Producing Specific Antisera with Small Doses of Immunogen." Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 33 (1971): 988-991.
- Walker, C.S., Clark, S.J., and Wotiz, H.H. "Factors Involved in the Production of Specific Antibodies to Estriol and Estradiol." Steroid 21 (1973): 259-283.
- Wellner, D., and Meister, A. "Crystalline L-Amino Acid Oxidase of *Crotalus adamanteus*." The Journal of Biological Chemistry 235 (1960): 2013-2018.



WHO Scientific Group. "Immunological Adjuvants." Technical  
Report Series 595, World Health Organization, Geneva,  
1976.



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## ภาคผนวก

### 1. การวัดปริมาณโปรตีน

#### 1.1 การเตรียมสารละลายสำหรับใช้วัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Lowry

##### 1.1.1 สารละลายโปรตีนมาตรฐาน ที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ซึ่งอัลบูมินของวัวชนิดโคห์นแฟรคชัน V (cohn fraction V) 100 มิลลิกรัมละลายด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดทดลองพลาสติกขนาด 22x75 มิลลิเมตร หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

##### 1.1.2 สารละลายฟีนอล (Phenol reagent)

ละลายโซเดียมทังสเตท 100 กรัมและโซเดียมโมลิบเดท 25 กรัมในน้ำกลั่น 700 มิลลิลิตร เติมกรดฟอสฟอริก ความเข้มข้น 85 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 50 มิลลิลิตรและกรดเกลือ ความเข้มข้นอีก 100 มิลลิลิตร รีฟลักซ์ด้วยไฟอ่อน ๆ ประมาณ 10 ชั่วโมง แล้วเติมลิเทียมซิลิเฟต 150 กรัม น้ำกลั่น 50 มิลลิลิตรและน้ำโปรมิน 2 ถึง 3 หยด ต้มไล่โปรมินที่มากเกินไปประมาณ 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นจึงเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 1 ลิตร เก็บในขวดสีชาป้องกันแสงที่อุณหภูมิห้อง ก่อนใช้เจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1

##### 1.1.3 สารละลายอัลคาไลน์คอปเปอร์

เป็นส่วนผสมของคิวปริคซิลิเฟตความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์จำนวน 1 มิลลิลิตร โพตัสเซียมโซเดียมทาร์เทรตความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์จำนวน 1 มิลลิลิตร และโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ซึ่งละลายในโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร จำนวน 100 มิลลิลิตร เตรียมส่วนผสมนี้ในวันที่ทำการทดลอง

#### 1.2 การวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Lowry

การวัดปริมาณโปรตีนในสารละลายตัวอย่างวัดตามวิธีของ Lowry (1951) โดยใช้สารละลายโปรตีนมาตรฐาน (จากข้อ 1.1.1) ความเข้มข้น 0 ถึง 100 ไมโครกรัมต่อ 0.1 มิลลิลิตร และสารละลายตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณโปรตีน 0.1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายอัลคาไลน์คอปเปอร์ (จากข้อ 1.1.3) 3 มิลลิลิตร เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง



10 นาที เติมสารละลายฟีนอล (จากข้อ 1.1.2) 0.3 มิลลิลิตร เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้เพื่อให้เกิดสีที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที หลอดที่เป็นแบลนด์ (blank) เตรียมได้ในทำนองเดียวกันแต่ใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายโปรตีนมาตรฐาน วัดความสามารถในการดูดแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่นแสง 650 นาโนเมตรเทียบกับหลอดที่เป็นแบลนด์ แล้วนำค่าที่วัดได้ไปเขียนกราฟ (แกนตั้ง) กับความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (แกนนอน) ดังแสดงในรูปที่ 19 หน้า 109 อ่านค่าปริมาณโปรตีนในสารละลายตัวอย่างจากกราฟมาตรฐาน

## 2. การทดสอบความบริสุทธิ์ของสเปอรัมิตินิตตสลา

### 2.1 การเตรียมสารละลายสำหรับทดสอบความบริสุทธิ์ของสเปอรัมิตินิตตสลา

#### 2.1.1 สารละลายมาตรฐาน

##### 2.1.1.1 สารละลายฟูเทรลซินมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อ

มิลลิลิตร

ซึ่งฟูเทรลซินไฮโดรคลอไรด์ 10 มิลลิกรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นให้ปริมาตรเป็น 1

มิลลิลิตร

##### 2.1.1.2 สารละลายสเปอรัมิตินมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม

ต่อมิลลิลิตร

ซึ่งสเปอรัมิตินไฮโดรคลอไรด์ 10 มิลลิกรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นให้ปริมาตรเป็น 1

มิลลิลิตร

##### 2.1.1.3 สารละลายสเปอรัมิตินมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม

ต่อมิลลิลิตร

ซึ่งสเปอรัมิตินเตตระไฮโดรคลอไรด์ 10 มิลลิกรัมละลายด้วยน้ำกลั่นให้ปริมาตรเป็น

1 มิลลิลิตร

#### 2.1.2 ตัวทำละลายผสม (solvent system)

ประกอบด้วยไอโซโพรพานอล 120 มิลลิลิตร กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 45 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 30 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ให้อิ่มตัว (สมดุล) ในโครมาโตกราฟฟิก แทงค์ (chromatographic tank) เตรียมก่อนทำการทดลองเป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง

#### 2.1.3 สารละลายนินไฮดริน ที่มีความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ซึ่งนินไฮดริน 0.3 กรัมละลายใน 100 มิลลิลิตรของปิพทานอลที่มีกรดน้ำส้มบริสุทธิ์



ผสมอยู่ด้วย 3 มิลลิลิตร เตรียมใส่ขวดที่จะใช้สเปรย์ (spray)

#### 2.1.4 สารละลายสเปรย์มีดินติดสลากระหว่างการทดสอบความบริสุทธิ์

ผสมสเปรย์มีดินติดสลากระหว่างความเข้มข้น 31 คู่ต่อมิลลิโมล จำนวน 5 ไมโครลิตร ลงในน้ำกลั่น 2.5 มิลลิลิตร

#### 2.2 การเตรียมแผ่นเซลลูโลส

เตรียมแผ่นเซลลูโลสขนาด 20x20 เซนติเมตรหนา 0.25 มิลลิเมตร โดยใช้ผงเซลลูโลส 40 กรัมผสมกับน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 30 ถึง 40 วินาที เทสารผสมใส่ถาด (spreader) ซึ่งปรับให้มีความหนาของแผ่นเซลลูโลสเป็น 0.25 มิลลิเมตร ลากถาดไปบนแผ่นแก้วที่สะอาดและแห้งด้วยความเร็วสม่ำเสมอ ทิ้งให้เซลลูโลสจับตัวกันอย่างน้อย 10 นาทีก่อนที่จะนำแผ่นแก้วเคลือบเซลลูโลสออกจากเครื่องมือ นำไปอบที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เก็บไว้ในตู้อบแห้งที่มีซิลิกาเจลสำหรับดูดความชื้นจนกว่าจะใช้

#### 2.3 การทดสอบความบริสุทธิ์ของสเปรย์มีดินติดสลากระหว่างวิธีอินไลน์โครมาโตกราฟี

ทดสอบความบริสุทธิ์ของสเปรย์มีดินติดสลากระหว่างวิธีของ Holder และ Bremer, 1966 โดยนำสารละลายมาตรฐานของซูเทรสซิน สเปรย์มีดินและสเปรย์มีน (จากข้อ 2.1.1 ภาคผนวก) อย่างละ 5 ไมโครลิตร (50 ไมโครกรัม) และสเปรย์มีดินติดสลากระหว่าง (จากข้อ 2.1.4 ภาคผนวก) 50 ไมโครลิตร ซึ่งมีจำนวนสารรังสีประมาณ 20,000 dpm หยดลงบนแผ่นเซลลูโลสที่ละน้อย ต้องเป่าตรงบริเวณที่หยดให้แห้งก่อนที่จะหยดครั้งต่อไป โดยหยดเป็นแถบยาวประมาณ 2 เซนติเมตร แต่ละแถบห่างกันประมาณ 1 เซนติเมตร เมื่อหยดสารละลายหมดแล้ว เป่าให้แห้งนำแผ่นเซลลูโลสใส่แท่งคัมที่บรรจุตัวทำละลายผสม (จากข้อ 2.1.2 ภาคผนวก) เมื่อระดับของตัวทำละลายผสม เคลื่อนที่จากจุดเริ่มต้นไปได้ประมาณ 15 เซนติเมตรซึ่งใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมง จึงนำแผ่นเซลลูโลสออกจากแท่งคัมที่แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วพ่นด้วยนินไฮดริน (จากข้อ 2.1.3 ภาคผนวก) ให้ตัวแผ่น นำไปอบที่ 110 องศาเซลเซียส 10 นาที บริเวณที่มีสารละลายมาตรฐานจะเป็นสีม่วง หากค่า Rf ของสารมาตรฐานแต่ละตัว

$$Rf = \frac{\text{ระยะทางที่สารมาตรฐานเคลื่อนที่จากจุดตั้งต้น}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายผสมเคลื่อนที่จากจุดตั้งต้น}}$$



นำเซลลูโลสส่วนที่มีสเปอรมิทินติดสลากรมาขีดเส้นแบ่งเป็นส่วน ๆ ส่วนละ 0.5x2.2 เซนติเมตรจำนวน 25 ส่วน และเซลลูโลสแต่ละส่วนใส่ขวดแล้วเติมน้ำกลั่นขวดละ 0.5 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรงตั้งทิ้งไว้ 15 นาที เติมน้ำละลายอินทิลเลขัน (จากข้อ 3.1.6) ขวดละ 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปนับจำนวนสารรังสีด้วยเครื่องนับสารรังสีเบตา เขียนกราฟแสดงปริมาณสารรังสี (แกนตั้ง) กับลำดับที่ของเซลลูโลสแต่ละส่วนโดยเรียงตามลำดับ จากจุดเริ่มต้น (origin) (แกนนอน) ดังแสดงในรูปที่ 20 หน้า 110 คำนวณหาค่า RF ของแต่ละพีค (peak) พีคที่เป็นสเปอรมิทินติดสลากรและสารรังสีเจือปน (impurity) ทราบโดยเปรียบเทียบค่า RF ของแต่ละพีคกับค่า RF ของสารมาตรฐาน หาพื้นที่ใต้พีค แล้ว คำนวณหาร้อยละของความไม่บริสุทธิ์ (% impurity)

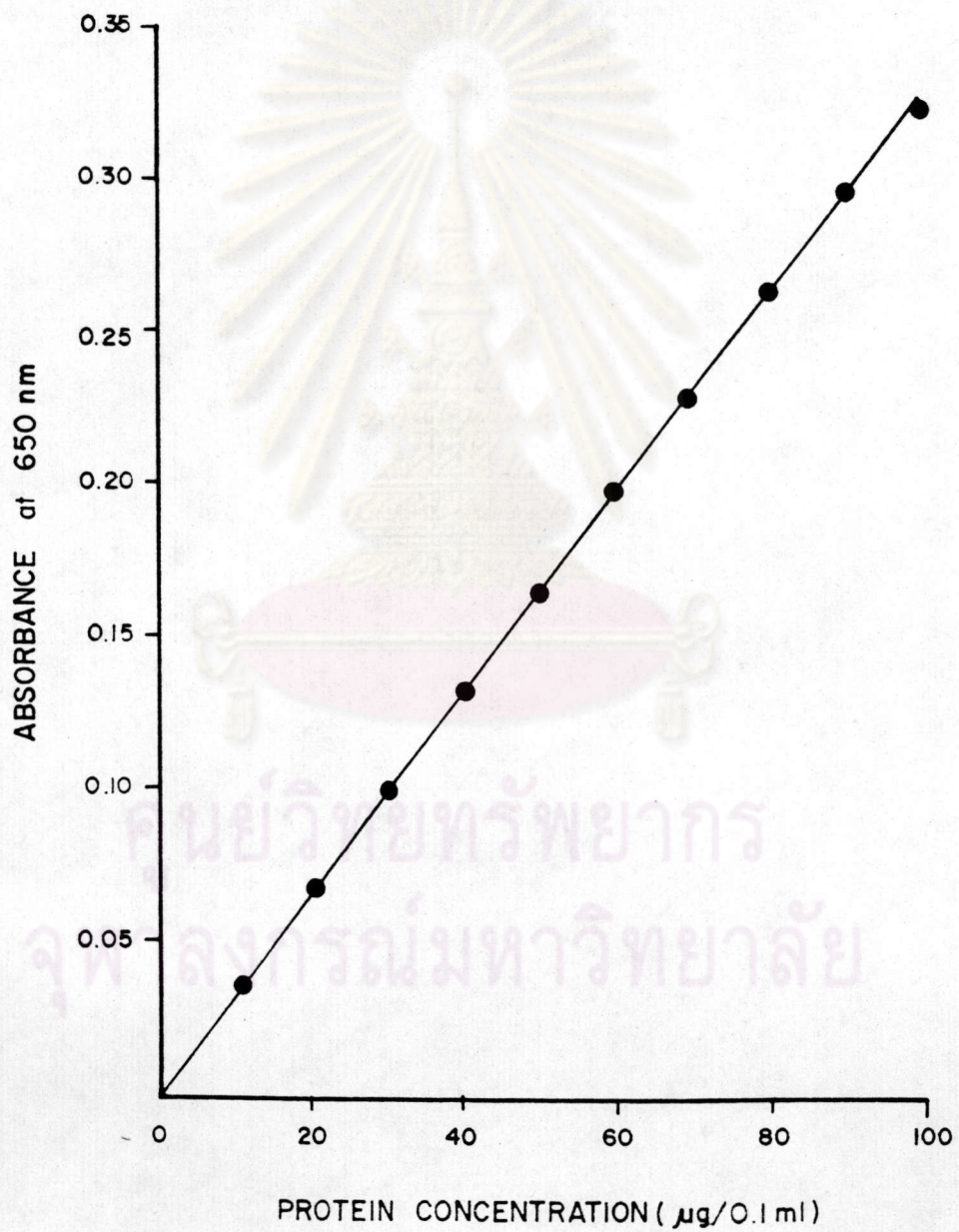
$$\text{ร้อยละของความไม่บริสุทธิ์} = \frac{\text{พื้นที่ใต้พีคของสารรังสีเจือปน}}{\text{พื้นที่ใต้พีคของสเปอรมิทินติดสลากรทั้งหมด}}$$

### 3. การเตรียมคอสมันซ์เซฟฟาเด็กซ์ จี-75

แช่เซฟฟาเด็กซ์ จี-75 13 กรัมในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร คนแล้วปล่อยให้เม็ดเจลใหญ่ ๆ นอนกัน อุดเอาเม็ดเจลเล็ก ๆ ที่ลอยอยู่ออกทำเช่นนี้ 3 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 48 ชั่วโมง เพื่อให้เม็ดเจลพองตัวเต็มที่ เทน้ำกลั่นออกแล้วแช่เจลในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ เปลี่ยนสารละลายโซเดียมคลอไรด์อีก 2 ครั้ง บรรจุเจลในหลอดแก้วตรงขนาด 2.2x40 เซนติเมตร ให้เจลสูง 36 เซนติเมตร ผ่านสารละลายโซเดียมคลอไรด์ลงในคอสมันซ์ที่บรรจุเจลอีกประมาณ 400 มิลลิลิตรที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการไหล 22 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เพื่อให้เจลเรียงตัวอยู่ในสภาพสมดุล ทดสอบประสิทธิภาพของคอสมันซ์ด้วยบลูเด็กซ์เตรน 2,000 ที่มีความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้จำนวน 2 มิลลิลิตร

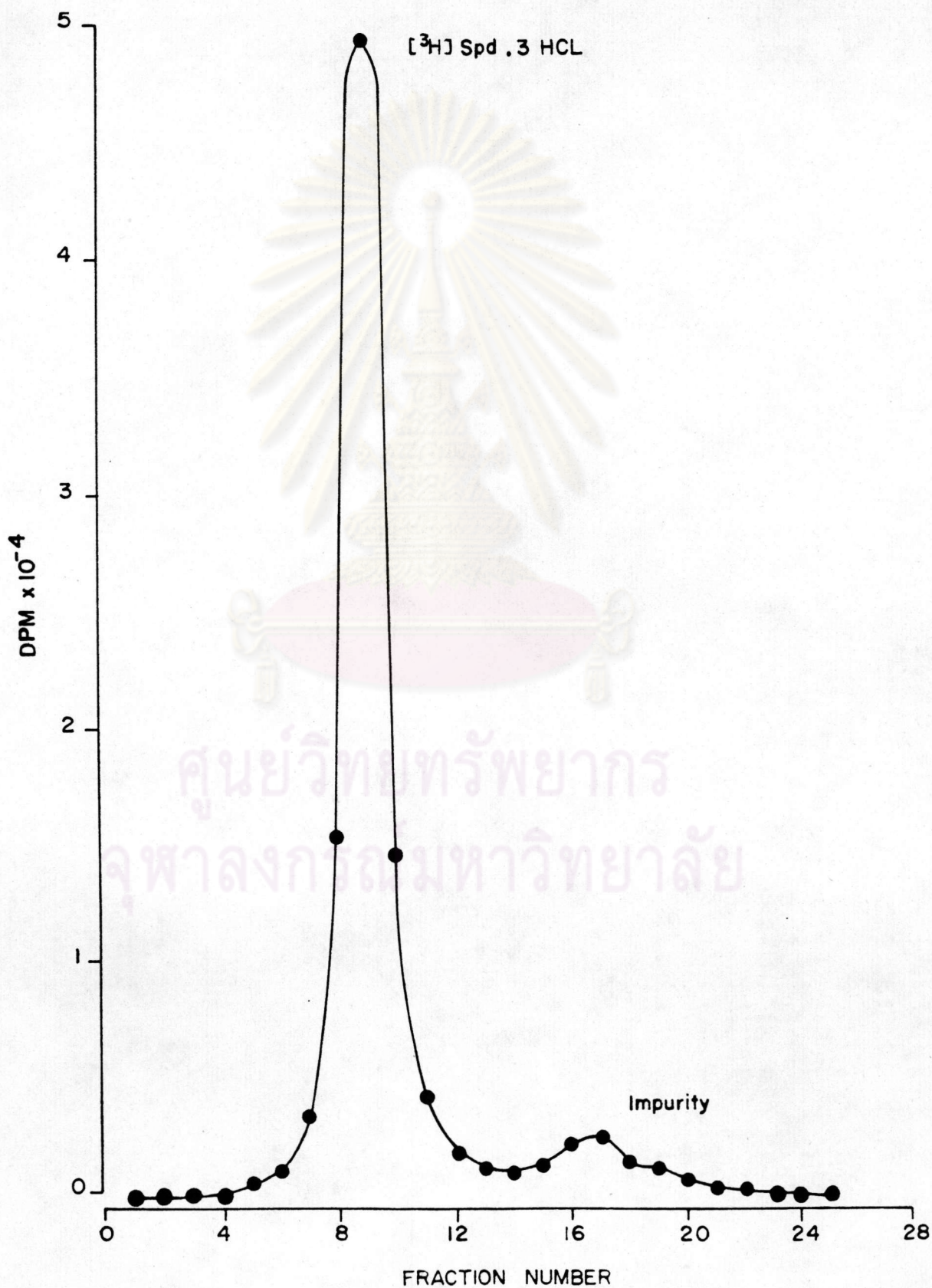


รูปที่ 19 กราฟมาตรฐานของโปรตีน โดยวิธีของ Lowry





รูปที่ 20 การแยกแกลเปออร์มีดินติดผลจากสารรังสีเจือปน  
โดยวิธี อินเลเยอร์โครมาโตกราฟี







ประวัติผู้เขียน

นางสาวมนต์จันทร์ วิชาชัยพันธุ์ เกิดวันที่ 26 ธันวาคม พ.ศ. 2497  
สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) คณะเทคนิคการแพทย์  
มหาวิทยาลัยมหิดล เมื่อปี พ.ศ. 2519 ปัจจุบันทำงานในตำแหน่งเจ้าหน้าที่วิจัย  
ศูนย์วิจัย คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย