เอกสารอ้างอิง

มนต์จันทร์ วณิชย์พันธุ์ "การหาปริมาณสเปอร์มิดีนในพลาสมาของสตรีตั้งครรภ์ปกติและโรคครรภ์ไข่ปลาอุกโดยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์" วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาชีวเคมี บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย , 2526.

ถนอมศรี ศรีชัยกุล วิชัย อติชาตการ และแสงสุรีย์ จูฑา "Lymphoma" สำนักพิมพ์กรุงเทพเวชสาร, พ.ศ. 2524.

สดใส เวชชาชีวะ ประพันธ์ ภานุภาค และไทม รัตนวรารักษ์ "Principle of immunology วิทยาภูมิคุ้มกัน" พิมพ์ครั้งที่ 4, 2522.

สาขาวิชาโลหิตวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล "คู่มือโลหิตวิทยา" จัดพิมพ์โดยโครงการตำรา-ศิริราช, 2518.

อัญชลี มไหศิริโยดม "ความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงบางอย่างทางชีวเคมีกับการเจริญของเนื้องอก" วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาชีวเคมี บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2526.

Abdel - Monem, M.M., and Ohno, K. Polyamine Metabolism III : Urinary Acetyl Polyamines in Human Cancer. Journal of Pharmaceutical Sciences 67 (1978) : 1671-1673.

Abraham, G.E. "Solid - Phase Radioimmunoassay of Estradiol - 17β" Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 29 (1969) : 866-870.

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., Dolney A.M., Grettie, D.P., and Campbell, R.A. "Radioimmunoassay of Spermidine in Human Serum." Res Common Chem Pathol Pharmacol 19 (1978) : 295-309.

Bodansky, O. in Biochemistry of Human Cancer. Academic Press, New York, U.S.A., 1975.

Caldarera C.M., Barbiroli, B., and Moruzzi, G. "Polyamines and Nucleic Acids during Development of the Chick Embryo." Biochemical Journal 97 (1965) : 84-88.

Carbone, P., Kaplan, H., Musshoff, K., et al : Report of the Committee on Hodgkin's Staging Classification. Cancer Res , 31 (1971) : 1860-1861.

Chaisiri, P., Harper, M.E., and Griffiths, K. "Plasma Spermine Concentrations of Patients with Benign and Malignant Tumours 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 Tumours of the Breast or Prostate or Testis." Clinica Chimica Acta 104 (1980) : 367-375.

Daniel, W.W. in Biostatistics : A Foundation for Analysis in the Health Sciences. John Wiley and Sons, New York, U.S.A., 1978.

Dreyfuss, F., Chayan, R., Dreyfuss, G., Ruth Dvir., and Ratan, J. "Polyamine Excretion in the Urine of Cancer Patients." Israel J Med Sci 11 (1975) : 785-795.

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.

Ekin, R.P., "Basic Principles and Theory." British Medical Bulletin 30 (1974) : 3-11.

Fair, W., Wehner, N., and Brorsson, U." Urinary Polyamine Levels in the Diagnosis of Carcinoma of the Prostate." The Journal of Urology 114 (1975) : 88-92.

Feherty, P., Farrer - Brown, G., and Kellie, A.E. "Oestradiol Receptors in Carcinoma and Benign Disease of the Breast : An in Vitro Assay." British Journal of Cancer 25 (1971) : 697.

Folin, O., and Ciocalteu, V. Journal of Biological Chemistry 73 (1927) : 627.

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 Nakamuva, M. "Improved Analysis for Urinary Polyamines by use of High - Voltage Electrophoresis on Paper." Clinical Chemistry 26 (1980) : 1577-1582.

Furuichi, K., Ezoe, H., Obara, T., and Oka, T. Evidence for a Naturally Occuring Anti - Spermine Antibody in Normal Rabbit Serum." Proceedings of the National Academy of Science U.S.A. 77 (1980): 2904-2908.

Gehrke, C.W., Kuo, K.C., Ellis, R.L., Waalkes, P. " Polyamines : An Improved Automated Ion Exchange Method." Journal of Chromatography 143 (1977) : 345-361.

Gerhardt, W., Clausen, J., Christensen, E., and Riishede, J. "Lactate Dehydrogenase Isoenzymes in the Diagnosis of Human Benign and Malignant Brain Tumors." Journal of the National Cancer Institute 38 (1967) : 343-357.

Goldman, R.D., Kaplan, N.O., and hall, T.C. "Lactic Dehydrogenase in Human Neoplastic Tissues." Cancer Research 24 (1964) : 389-399.

Herbert, W.J., Aitken, R.M., Eslami, M.B., Ferguson, A., Gray, K. G., and Penhale, W.J. in Handbook of Experimental Immunology volume 3 Appendixs3Blackwell Scientific Publications Oxford, England, 1973.

Hilf, R., Rector, W.D., and Orlando, R.A. "Multiple Molecular Forms of Lactate Dehydrogenase and Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase in Normal and Abnormal Human Breast Tissues." Cancer 37 (1976) : 1825-1830.

Holder, S., and Bremer, H.J. "Bestimmung der Di - und Polyamine im Urin : Chromatographische Methoden zur Anreicherrung, Trennuang und Identifizierung." Journal of Chromatography 25 (1966) : 48-57.

Igarashi, K., Hara, K., Watanabe, W., Hirose, S., and Takeda, Y. " Polyamine and Magnesium Contents and Polypeptide Synthesis as a Functions of Cell Growth." Biochemical and Biophysical Research Communications 64 (1975) : 897-904.

Jaffe, B.M., Smith, J.W., Newton, W.T., and Parker,C.W. "Radioimmunoassay for Prostaglandins." Science 171 (1971) : 494-496.

Kai, M., Ogata, T., Haraguchi, K., and Ohkura, Y. "High - Performance Liquid Chromatographic Determination of Free and Total Polyamines in Human Serum as Fluorescamine derivatives." Journal of Chromatography 163 (1979) : 151-160.

Kubota, S., Okada, M., Imahori, K., and Ohsawa, N. "A New Simple Enzymatic Assay Method for Urinary Polyamines in Humans." Cancer Research 43 (1983) : 2363-2367.

Lipton, A., Shuhan, L.M., and Kessler, G.F. "Urinary Polyamine Levels in Human Cancer." Cancer 35 (1975) : 464-468.

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.

Makita, M., Yamamoto, S., Miyake, M., and Masamota, K. "Practical Gas Chromatographic Method for the Determination of Urinary Polyamines." Journal of Chromatography 156 (1978) : 340-345.

Maugh, T.H. "Biochemical Markers : Early Warning Signs of Cancer." Science 197 (1977) : 543-545.

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 Supplement 142 (1969) : 163-184.

Milano, G., Cassuto, J.P., Schneider, M., Viguier, E., Lesbates, G., Cambon, P., and Lalanne, C.M. "Polyamines in Lymphoma : Their Value in Disease Staging and Monitorirg of Therapy Efficiency." Nouv Review of France Hematology 22 (1980) : 249-255.

Monfardini, S., Brunner, K., Crowther, D., Olive, D., Donald, J.M., Eckhardt, S., and Whitehouse, J. in Manual of Cancer Chemotherpy. International Union Against Cancer, Geneva, 1981.

Parker, C.W. in Radioimmunoassay of Biologically Active Compounds. Prentice Hall, U.S.A., 1976.

Pegg, A.E. "The Effects of Diamines and Polyamines on Enzymic Mehtylation of Nucleic Acid." Biochimica et Biophysica Acta 232 (1971) : 630-642.

Pierce, G.B., Shikes, R., Fink, L.M., in Cancer : A Problem of Developmental Biology. Prentice - Hall, U.S.A., 1978.

Playfair, J.H.L., Hurn, B.A.L., and Schulster, D. "Production of Antibodies and Binding Reagents." British Medical Bulletin 30 (1974) : 24-31.

Rajalakshmi, S., Rao, P.M., and Sarma, D.S.R. " Modulation of Carcinogen Chromatin - DNA Interaction by Polyamines" Biochemical Biophysics Research Communication 81 (1978) : 936-940.

Rennert, O., Miale, T., Shukla, J., Lawson, D., and Frias, J. "Polyamine Concentrations in Bone Marrow Aspirates of Children with leukemia and other Malignancies." Blood 47 (1976) : 665-701.

Russell, D.H. "Discussion : Putrescine and Spermidine Biosynthesis in Growth and Development." Annals 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 (1977) : 22-27.

Russell, D.H., Gullino, P.M., Marton, L.J.,and Li Gendre, S.M. "Polyamine Depletion of the MTW 9 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., and Durie, B.G.M. in Polyamines as Biochemical Markers of Normal and Malignant Growths. Raven Press, New York, 1978.

Russell, D.H., Durie, B.G.M., and Salmon, S.E. "Hypothesis Polyamines as Predictors of Success and Failure in Cancer Chematherapy." The Lancet 25 (1975) : 797-799.

Russell, D.H., and Levy, C.C. "Polyamine Accumulation and Biosynthesis in a Mouse L 1210 Leukemia." Cancer Research 31 (1971) : 248-251.

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., Looney, W. B., Kovacs, C.J., Hopkins, H.A., Marton, L.J., Le Gendre, S.M., and Morris, H.P. "Polyamine Depletion of Tumor Tissue and Subsequent Elevation of Spermidine in the Sera of Rats with 3924 A Hepatomas after 5 - Fluorouracil Administration." Cancer Research 34 (1974b) : 2382-2385.

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 of Hepatoma 3924A of the Rat." Cancer Research 36 (1976) : 420-423

Rudman, D., Kutner, M.H., Chawla, R.K., Goldsmith, M.A., Blackston, R.D., and Bain, R. "Serum and Urine Polyamines in Normal and in Short Children." Journal of Clinical Investigation 64 (1979): 1661-1668.

Saeki, Y., Uehara, N., and Shirakawa, S. "Sensitive Fluorimetric Method for the Determination of Putrescine, Spermidine and Spermine by High-Performance Liquid Chromatography and its Application to Human Blood." Journal of Chromatography 145 (1978) : 221-229.

Savlov, E.D., Wittliff, J.L., Hilf, R., and Hall, T.C. "Correlations between Certain Biochemical Properties of Breast Cancer and Response to Therapy : A Preliminary Report." Cancer 33 (1974): 303-309.

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

Seiler, N., Grahan, A., and Bartholeyns, J." Enhanced Urinary Excretim of N' - Acetylspermidine and the Presence of Tumors." Cancer Research 41 (1981) : 1572-1573.

Seiler, N., and Knodgen, B. "Determination of the Naturally Occuring Monoacetyl Derivatives of Di - and Polyamines." Journal of Chromatography 164 (1979) : 155-168.

Sewell, R.L. in Laboratory Monographs : Malignant Blood Diseases. Bailliere Tindall, London, 1972.

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.

Tabor, C.W., and Tabor, H. "1,4 - Diaminobutane (Putrescine), Spermidine, and Spermine." Annal Review of Biochemistry 45 (1976) : 285-306.

Taussey, and Bornsnes, Journal of Biological Chemistry 158 (1945) : 581.

Townsend, R.M., Banda, P.W., and Marton, L.J. "Polyamines in Malignant Melanoma." Cancer 38 (1976) : 2088-2092.

Vaitukaitis, J., Robbins, J.B., Nieschlag, E., and Ross, G.T. "A Method for Producting Specific Antisera with Small Doses of Immunogen" Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 33 (1971) : 988-991.

Walker, C.S., Clark, S. J., Wotiz, H.H. "Factors Involved in the Production of Specific Antibodies to Estriol and Estradiol." Steroid 21 (1973) : 259-283.

Williams - Ashman, H.G., and Canellakis, Z.N. "Polyamines in Mammalian Biology and Medicine." Perspectives in Biology and Medicine. Spring (1979) : 421-451.

Wintrobe, M.M., Lee, G.R., Boggs, D.R., Bithell, T.C., Forerster, J., Athens, J.W., and Lenkens, J.N. in Clinical Hematology. 8th edition. Lea and Febiger Philadelphia, U.S.A., 1981.

Woo, N., Seeman, M.C. and Alexander. "Crystal structure of Putrescine Diphosphate : A Model System of Amino - Nucleic Acid Inter - actions." Biopolymers 18 (1979) : 539-552.

Yalow, R.S., and Berson, S.A., "Immunoassay of Endogenous Plasma Insulin in Man." Journal of Clinical Investigation 39 (1960) : 1157-1175.

ภาคผนวก

1. การวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Lowry (Lowry และคณะ , 1951)

1.1 การเตรียมสารละลายสำหรับวัดปริมาณโปรตีน

1.1.1 สารละลายโปรตีนมาตรฐาน ที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/1 มิลลิลิตร

ซั่งโบไวน์ซีรั่มอัลบูมินชนิดโคนแฟรคชั่น V (cohn fraction V) 100 มิลลิกรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดพลาสติกขนาด 12x75 มิลลิเมตร หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

1.1.2 สารละลายฟีนอล

เตรียมตามวิธีของ Folin และ Ciocalteu (1927) โดยใช้โซเดียมทังสเตท 100 กรัม โซเดียมโมลิบเดท 25 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 700 มิลลิลิตร เติมกรดฟอสฟอริคที่มีความเข้มข้น 85 เปอร์เซนต์ จำนวน 50 มิลลิลิตร และกรดเกลือที่เข้มข้น 100 มิลลิลิตร นำมารีฟลักซ์ด้วยไฟอ่อน ๆ นานประมาณ 10 ชั่วโมง แล้วเติมลิเทียมซัลเฟต 150 กรัม น้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร และน้ำโปรมีน 2-3 หยด ต้มไล่โปรมีนที่มากเกินพอประมาณ 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรเป็น 1 ลิตร และกรองเก็บในขวดสีชาป้องกันแสง ที่อุณหภูมิห้อง ก่อนใช้เจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1

1.1.3 สารละลายแอลคาไลน์คอปเปอร์

สารละลาย A ซั่งโซเดียมคาร์บอเนต 10 กรัม ละลายในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ จนมีปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร

สารละลาย B ใช้คอปเปอร์ซัลเฟต 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

สารละลาย C ใช้โปแตสเซียมหรือโซเดียมตาร์เตรท 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นจนมีปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

การเตรียมสารละลายแอลคาไลน์คอปเปอร์ เตรียมได้โดยใช้อัตราส่วนโดยปริมาตรของสารละลาย B:C:A เป็น 1:1:100 ผสมให้เข้ากันดี เตรียมสารละลายนี้และใช้ในวันที่ทำ

การทดลอง

1.2 วิธีการวัดปริมาณโปรตีน

ใช้สารละลายโปรตีนมาตรฐาน (จากข้อ 1.1.1) ซึ่งมีความเข้มข้น 0 ถึง 100 ไมโครกรัมต่อ 0.1 มิลลิลิตร และสารละลายตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณโปรตีน 0.1 มิลลิลิตร นำมาเติมสารละลายแอลคาไลน์คอปเปอร์ (จากข้อ 1.1.3) 3 มิลลิลิตร เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที เติมสารละลายฟีนอล (จากข้อ 1.1.2) 0.3 มิลลิลิตร เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้เพื่อให้เกิดสีที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที หลอดแบลงค์ (blank) ใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายโปรตีนมาตรฐาน วัดความสามารถในการดูดแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่นแสง 650 นาโนเมตร เทียบกับหลอดที่เป็นแบลงค์ แล้วนำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟ (แกนตั้ง) กับความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (แกนนอน) ดังแสดงในรูปที่ 26 หน้า 106 อ่านค่าปริมาณโปรตีนในสารละลายตัวอย่างจากกราฟมาตรฐาน

2. การวัดปริมาณครีอะตินินโดยวิธีของ Taussky และ Bornsnes (1945)

2.1 การเตรียมสารละลายสำหรับวัดปริมาณครีอะตินินในปัสสาวะ

2.1.1 สารละลายครีอะตินินมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 40 ไมโครกรัม ใน 1 มิลลิลิตรกรดเกลือที่มีความเข้มข้น 0.05 โมลาร์

ชั่งสารมาตรฐานครีอะตินิน 4 มิลลิกรัม ละลายในกรดเกลือที่มีความเข้มข้น 0.05 โมล/ลิตร ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.1.2 สารละลายกรดพิคริคที่มีความเข้มข้นครึ่งหนึ่งของสารละลายอิ่มตัว

นำสารละลายอิ่มตัวของกรดพิคริคมาเจือจางเท่าตัวด้วยน้ำกลั่น เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

2.1.3 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 0.75 โมล/ลิตร

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 15 กรัม ละลายในน้ำกลั่น จนได้ปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร

2.2 วิธีการวัดปริมาณครีอะตินิน

นำปัสสาวะที่เจือจาง 100 ถึง 200 เท่าด้วยน้ำกลั่น (ขึ้นอยู่กับปริมาณครีอะตินินที่มีอยู่ในปัสสาวะ) มา 3 มิลลิลิตร ซึ่งมีครีอะตินินไม่เกิน 56 ไมโครกรัม และนำสารละลายมาตร

ฐานครีอะตินินมา 3 มิลลิลิตร ซึ่งมีครีอะตินินอยู่ 8 ถึง 56 ไมโครกรัม ส่วนแบลงค์ (blank) ใช้น้ำกลั่น 3 มิลลิลิตร แทนปัสสาวะหรือสารละลายมาตรฐานครีอะตินิน เติมสารละลายกรดพิคริค 1 มิลลิลิตร ลงในสารละลายข้างต้นเขย่า แล้วเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 15 นาทีที่อุณหภูมิห้อง วัดความสามารถในการดูดแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่นแสง 525 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรนิค 20 เทียบกับหลอดแบลงค์ นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟ (แกนตั้ง) กับความเข้มข้นของสารละลายครีอะตินินมาตรฐาน (แกนนอน) ดังแสดงในรูปที่ 27 หน้า 107 อ่านค่าปริมาณครีอะตินินในปัสสาวะจากกราฟมาตรฐาน

3. การทดสอบความบริสุทธิ์ของสเปอร์มิดีนติดฉลาก

3.1 การเตรียมสารละลายสำหรับทดสอบความบริสุทธิ์ของสเปอร์มิดีนติดฉลาก

3.1.1 สารละลายมาตรฐาน

3.1.1.1 สารละลายพูเทรสซีนมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ใช้พูเทรสซีนไดไฮโดรคลอไรด์ 10 มิลลิกรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตรเป็น 1 มิลลิลิตร

3.1.1.2 สารละลายสเปอร์มิดีนมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ใช้สเปอร์มิดีนไตรไฮโดรคลอไรด์ 10 มิลลิกรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตรเป็น 1 มิลลิลิตร

3.1.1.3 สารละลายสเปอร์มีนมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ใช้สเปอร์มีนเตทตระไฮโดรคลอไรด์ 10 มิลลิกรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตรเป็น 1 มิลลิลิตร

3.1.2 ตัวทำละลายผสม (Solvent system)

ประกอบด้วยไอโซโพรพานอล กรดเกลือ และน้ำกลั่น ผสมกันในอัตราส่วน (โดยปริมาตร) 120:45:30 ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ให้อิ่มตัว (สมดุลย์) ในโครมาโตกราฟฟิคแทงค์ (chromatographic tank) เตรียมก่อนทำการทดลองเป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง

3.1.3 สารละลายนินไฮดริน ที่มีความเข้มข้น 0.003 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร

ใช้นินไฮดริน 0.3 กรัม ละลายในบิวทานอล 100 มิลลิลิตร ซึ่งมีกรดน้ำส้มบริสุทธิ์ผสมอยู่ด้วย 3 มิลลิลิตร เตรียมใส่ขวดที่จะใช้สเปรย์(spray)

3.1.4 สารละลายสเปอร์มิดีนติดฉลากที่ต้องการทดสอบความบริสุทธิ์

สเปอร์มิดีนติดฉลากที่มีความเข้มข้น 31 คูรีต่อมิลลิโมล จำนวน 5 ไมโครลิตร ใส่ลงในน้ำกลั่น 2.5 มิลลิลิตร

3.2 การเตรียมแผ่นเซลลูโลส

เตรียมแผ่นเซลลูโลสขนาด 20x20 เซนติเมตร หนา 0.25 มิลลิเมตร โดยใช้ผงเซลลูโลส 40 กรัมผสมกับน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 30-40 วินาที เทสารผสมใส่ถาด (spreader) ซึ่งปรับให้ได้ความหนาของแผ่นเซลลูโลสเป็น 0.25 มิลลิเมตร ลากถาดไปบนแผ่นแก้วที่สะอาดและแห้งด้วยความเร็วสม่ำเสมอ ทิ้งให้เซลลูโลสจับตัวกันอย่างน้อย 10 นาที ก่อนที่จะนำแผ่นแก้วเคลือบเซลลูโลสออกจากเครื่องมือ นำไปอบที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เก็บไว้ในตู้อบแห้งที่มีซิลิกาเจลสำหรับดูดความชื้น จนกว่าจะใช้

3.3 การทดสอบความบริสุทธิ์ของสเปอร์มิดีนติดฉลากโดยวิธีทินเลเยอร์โครมาโตกราฟฟี ตามวิธีของ Holder และ Bremer (1966)

นำสารละลายมาตรฐานของพูเทรสซีน สเปอร์มิดีน และสเปอร์มีน (จากข้อ 3.1.1 ภาคผนวก) อย่างละ 5 ไมโครลิตร (50 ไมโครกรัม) และสเปอร์มิดีนติดฉลาก (จากข้อ 3.1.4 ภาคผนวก) 40 ไมโครลิตร หยดลงบนแผ่นเซลลูโลสเป็นแถบยาวประมาณ 2 เซนติเมตรทีละน้อย โดยเป่าบริเวณที่หยดให้แห้งก่อนที่จะหยดครั้งต่อไป แต่ละแถบห่างกันประมาณ 1 เซนติเมตร เมื่อหยดสารละลายหมดแล้วนำแผ่นเซลลูโลสใส่แทงค์ที่บรรจุตัวทำละลายผสม (จากข้อ 3.1.2 ภาคผนวก) เมื่อระดับของตัวทำละลายผสมเคลื่อนที่จากจุดเริ่มต้นไปได้ประมาณ 15 เซนติเมตร ซึ่งใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมง จึงได้นำแผ่นเซลลูโลสออกจากแทงค์แล้วอบที่ 110 องศาเซลเซียส 10 นาที แล้วจึงพ่นด้วยสารละลายนินไฮดริน (จากข้อ 3.1.3 ภาคผนวก) ให้ทั่วแผ่น นำไปอบที่ 110 องศาเซลเซียส 20 นาที บริเวณที่มีสารละลายมาตรฐานจะเห็นสีม่วง หาค่า Rf ของสารมาตรฐานแต่ละตัว

$$Rf = \frac{\text{ระยะทางที่สารมาตรฐานเคลื่อนที่จากจุดเริ่มต้น}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายผสมเคลื่อนที่จากจุดเริ่มต้น}}$$

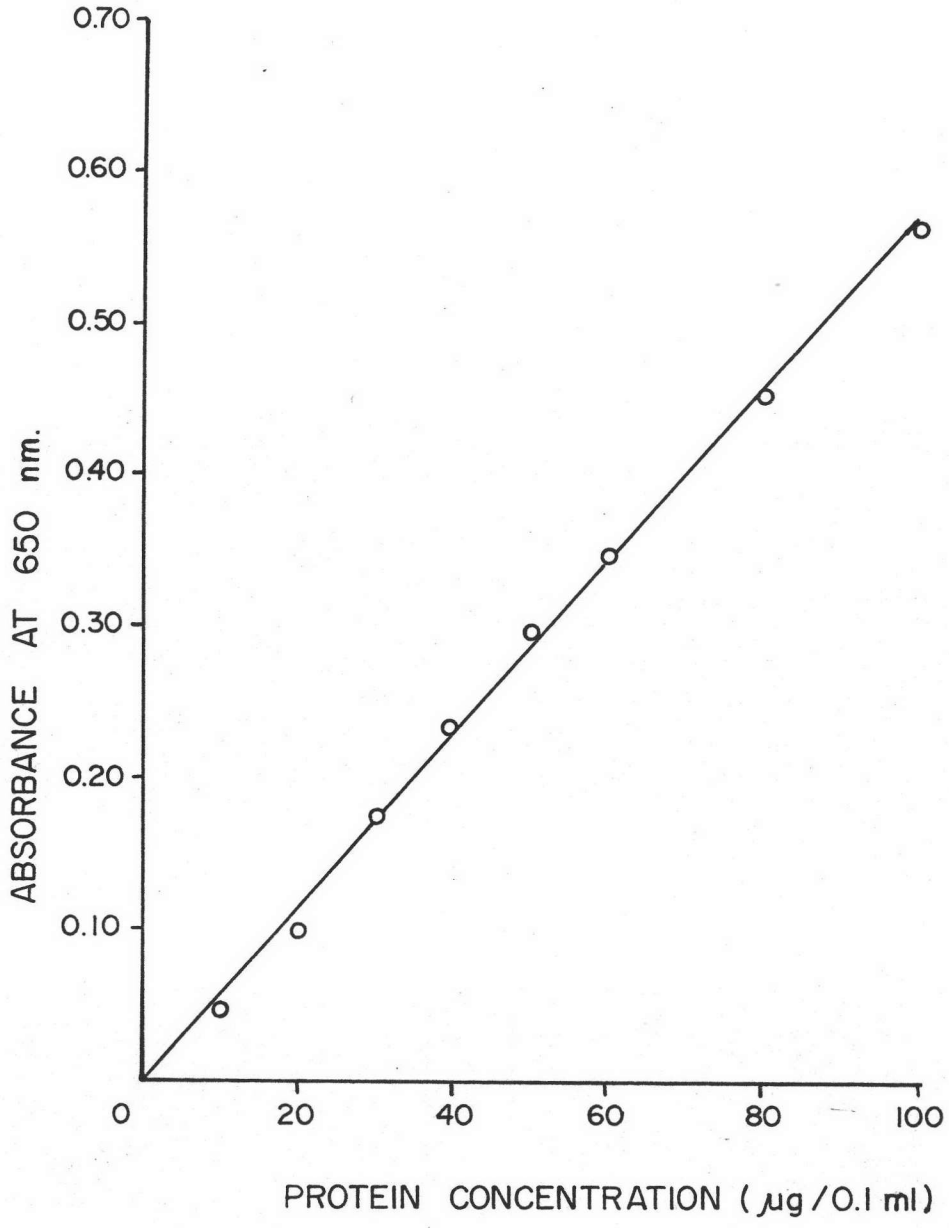
ใช้เซลลูโลสส่วนที่มีสเปอร์มิดีนติดฉลาก ขีดเส้นแบ่งเป็นส่วน ๆ ส่วนละ 2.4x0.5 เซนติเมตร จำนวนประมาณ 25 ส่วน แคะเซลลูโลสแต่ละส่วนใส่ขวดสำหรับใช้กับเครื่องนับสารรังสีเบตา ใส่น้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตร เขย่า ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5-10 นาที จึงเติมสารละลายซินทิลเลชั่น (จากข้อ 3.1.6) ขวดละ 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดปริมาณสารรังสีด้วยเครื่องนับสารรังสีเบตา เขียนกราฟแสดงปริมาณสารรังสี (แกนตั้ง) กับลำดับที่ของเซลลูโลสแต่ละส่วน โดยเรียงตามลำดับ จากจุดเริ่มต้น (origin) (แกนนอน) ดังแสดงในรูปที่ 28 หน้า 108 คำนวณหาค่า Rf ของแต่ละพีค (peak) พีคที่เป็นสเปอร์มิดีนติดฉลากและพีคสารรังสีเจือปน (impurity) จะทราบได้โดยเปรียบเทียบค่า Rf ของแต่ละพีค กับค่า Rf ของสารมาตรฐาน หาพื้นที่ใต้พีค แล้วคำนวณหาร้อยละของความไม่บริสุทธิ์ (% impurity)

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

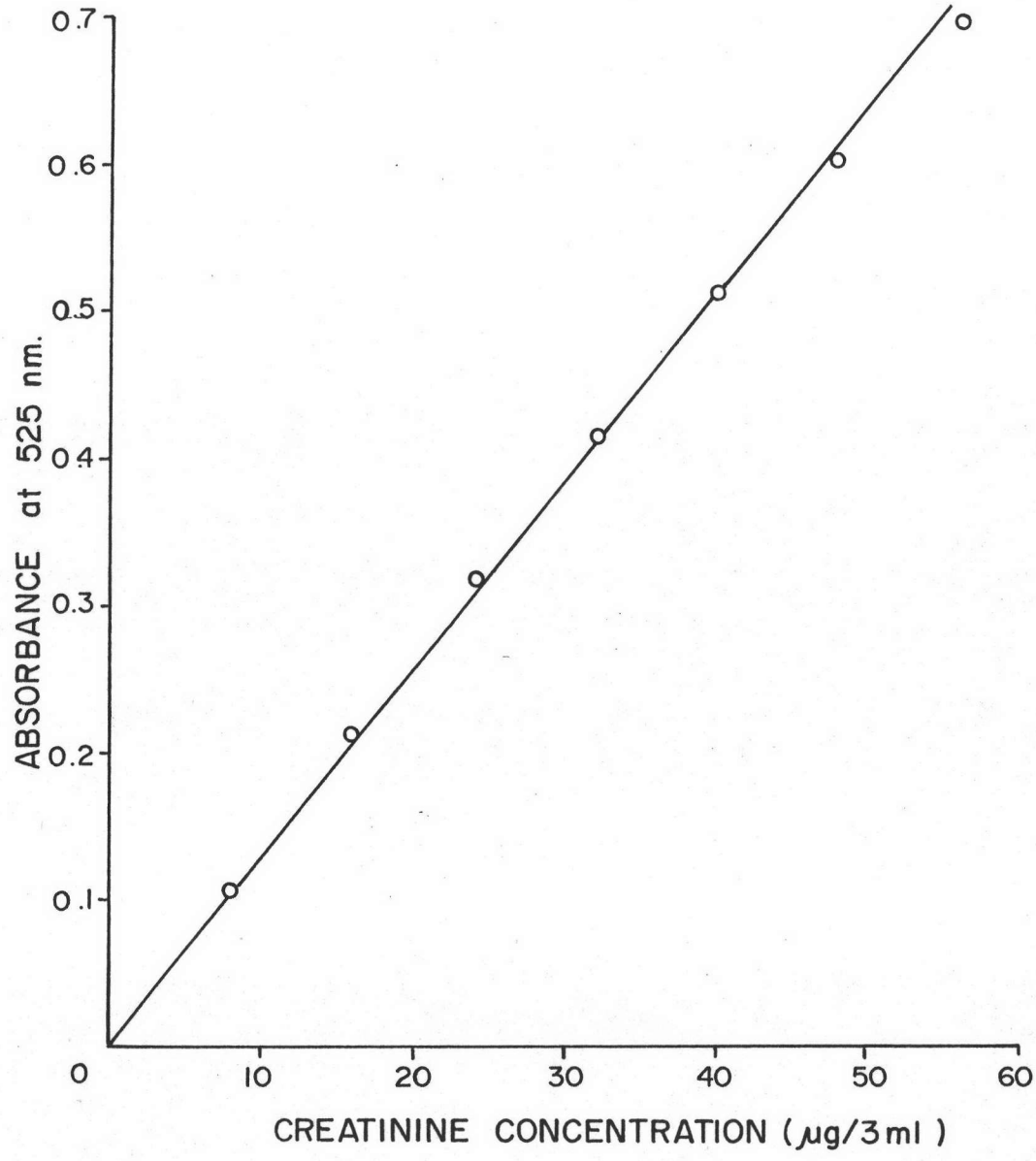
4. <u>การเตรียมคอลัมน์เซฟฟาเด็กซ์ จี -75</u>

แช่เซฟฟาเด็กซ์ จี - 75 15 กรัมในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร คนแล้วปล่อยให้เม็ดเจลใหญ่ ๆ นอนก้น ดูดเอาเม็ดเจลเล็ก ๆ ที่ลอยอยู่ออก ทำเช่นนี้ 3-4 ครั้ง ครั้งสุดท้ายเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซนต์ ปริมาตรประมาณ 200 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 24 ชั่วโมง บรรจุเจลในคอลัมน์แก้วขนาด 2.2x40 เซนติเมตร จนได้เจลสูง 30 เซนติเมตร ผ่านสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซนต์ลงในคอลัมน์ที่บรรจุเจลประมาณ 300 มิลลิลิตร ที่ 4 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการไหล 20 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เพื่อให้เจลเรียงตัวอยู่ในสภาพสมดุลย์ ทดสอบประสิทธิภาพของคอลัมน์ด้วยบลูเด็กซ์แตรน 2,000 ที่มีความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรจำนวน 2 มิลลิลิตร

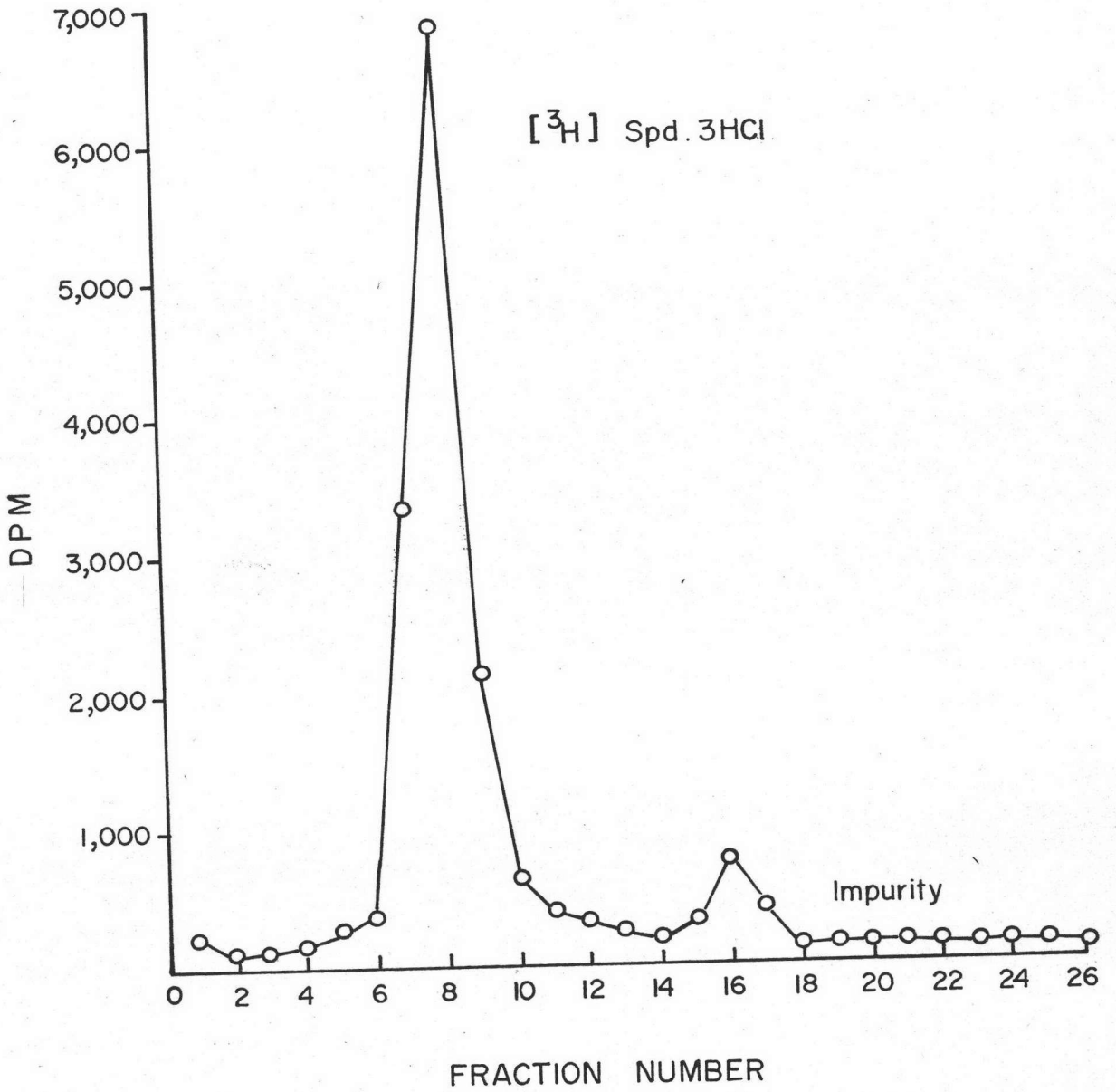
รูปที่ 26 กราฟมาตรฐานของโปรตีน โดยวิธี Lowry และคณะ (1951)



รูปที่ 27 กราฟมาตรฐานของครีอะตินิน โดยวิธีของ Taussky และ Bornsner (1945)



รูปที่ 28 การแยกสเปอร์มิดีนติดฉลากออกจากสารรังสี
เจือปน โดยวิธี ทินเลเยอร์โครมาโตกราฟฟี



ประวัติผู้เขียน

นางสาวกฤษณา ปทีปโชติวงศ์ เกิดวันที่ 12 ธันวาคม พ.ศ. 2496 สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล เมื่อปี พ.ศ. 2519 ปัจจุบันทำงานในตำแหน่ง เจ้าหน้าที่วิจัย ศูนย์วิจัย คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล