หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

บทที่ 2
วัสดุและเครื่องมือ

2.1 วัสดุ

L-α-Phosphatidyl inositol from soybean sodiumsalt, (grade 1), DL-α-phosphatidyl choline dipalmitoyl, crystalline synthetic (grade 1); L-α-phosphatidyl-L-serine from bovine brain; L-α-phosphatidyl ethanolamine, dipalmitoyl (L-α-Cephalin dipalmitoyl) synthetic; Dysophosphatidyl choline, palmitoyl; sphingomyelin from bovine brain, Type I; L-α-phosphatidyl inositol from soybean (grade 1); ของบริษัท Sigma Chemical Company, St. Louis, U.S.A.

Precoated plate plastic sheets 20 x 20 cm, Layer 0.25 mm, silicagel with fluorescent indicator (Polygram) ของบริษัท Machency-Nagel & Co., 516 Duren, Werkstrasse 6-8, Germany.

Phosphoric acid, proanalysi; Acetone, proanalysi; acetic acid, proanalysi; Absolute ethanol, proanalysi; ของบริษัท E. Merch AG, Dramstadt, Germany.

Ethylene diaminetetra acetic acid disodium salt; laboratory reagent; chloroform, Analar. ของบริษัท BDH Chemicals Ltd., Poole, England.

Methanol, Analytical Reagent. ของบริษัท Hopkin & Williams Ltd., Essex, England.

Sodiumsulfate anhydrous (Granular), Analytical reagent; sodium chloride, Analytical reagent. ของบริษัท Mallinckrodt Chemical Works, St. Louis, U.S.A.

Tramsparent tape No. 600, Scotch brand, Minnesota Minning. Manufacturing Co., Saint Paul, Minnesota, U.S.A.

Nitrogen gas.

2.2 เครื่องมือและเครื่องแก้ว

MSE refrigerated centrifuge "Mistral 4L", Measuring & Scientific Equipment Ltd., Manor royal Crawley Sussex, England.

Rotamixer deluxe; Hook & Tucker Ltd., U.S.A.

Scien Temp 140 (-118°C -50°C), Scientemp Corporation, Michigen, U.S.A.

Recording electrophoresis densitometer และ automatic integrator model 49, Photovolt Corporation, New York City, U.S.A.

Thinlayer chromatography tank, Desaga Co., Heidelberg, West Germany.

Desiccating carbinet, Boekel Industries, Inc., Phila. Penna. U.S.A.

Oven, Arthur H. Thomas Co., Philadelphia, PA., U.S.A.

Quickfit tube MF 24/1/5 และ stopper SB14, ของบริษัท Jobling Laboratory Division, Stone, Staffordshire St 150BG, England.

Eppendrof microlitre pipette, Brinkmann Instruments Inc., Westbury, New York, U.S.A.

2.3 ตัวอย่างน้ำคร่ำที่ทำการวิจัย

น้ำคร่ำที่ใช้เป็นสารตัวอย่างในการหาอัตราส่วนของ **lecithin (phosphatidyl choline)** และ **sphingomyelin** หรืออัตราส่วน **L/S** เป็นน้ำคร่ำของสตรีที่มาคลอดบุตร โดยการเจาะผ่านทางหน้าท้อง **(Amniocentesis)** หรือเจาะทางช่องคลอด หรือผ่าตัดหน้าท้องทำคลอด ซึ่งการกระทำทั้งหมดนี้ต้องอาศัยแพทย์ผู้ชำนาญ น้ำคร่ำที่มีเลือดปนอยู่ด้วยจะนำมาใช้ในการทดลองไม่ได้ เพราะเลือดที่ปนมาในน้ำคร่ำจะทำให้อัตราส่วนของ **L/S** เพิ่มขึ้น **(Verder & Clausen 1974)** นำน้ำคร่ำ-ตัวอย่างที่ได้ไปปั่นแยกสิ่งที่ไม่ต้องการออก **(cell & debris)** โดยเครื่องปั่น **MSE (Mistral 4L)** ด้วยแรงปั่น **1400xg** ที่ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนที่เป็นน้ำคร่ำใส ๆ ออกมาทำการทดลองทันที ถ้าไม่สามารถทำการทดลองได้ทันที หรือในกรณีที่ต้องการทำการทดลองซ้ำ ต้องเก็บน้ำคร่ำไว้ที่ –20 องศาเซลเซียส

2.4 การเตรียมสารละลาย

2.4.1 **anhydrous acetone**

เติม **potassium permanganate** ลงใน **acetone** เล็กน้อย **reflux** สักครู่ จนสังเกตเห็นสีชมพูยังคงอยู่ ถ้าสีชมพูของ **potassium permanganate** หายไป ต้องเติม **potassium permanganate** นี้ลงไปอีก แล้ว **reflux** ต่อจนสีชมพูนี้ไม่หายไป จึงนำมา **dry** ด้วย **calcium sulfate** แล้วกรองโดยการใช้ **suction** ช่วย นำ **acetone** ที่ได้ไปกลั่น ส่วนที่กลั่นออกมา 20 มล. แรกทิ้งไป แล้วเก็บ **acetone** ที่ออกมาที่อุณหภูมิ 56–57 องศาเซลเซียส

2.4.2 สารละลาย **7% phosphomolybdic acid**

ชั่ง **phosphomolybdic acid** 7 กรัม ละลายใน **95% ethanol** 100 มล. คนให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ถ้าสารละลายที่ได้ไม่ใสต้องกรองด้วยกระดาษกรอง **Whatman No. 2**

2.4.3 สารละลาย 10% ethylenediaminetetraacetic acid disodiumsalt

ชั่ง ethylenediaminetetraacetic acid disodiumsalt (EDTA) 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 10 กรัม

2.4.4 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน phospholipid

ก. สารละลายมาตรฐาน lecithin 1 ไมโครกรัม/1 ไมโครลิตร ชั่ง lecithin 20 มก. ละลายใน chloroform 2 มล. ดูดสารละลายนี้มา 0.2 มล. เติม chloroform ลง 1.8 มล. แบ่งเป็นหลอดเล็ก ๆ ขนาดพอใช้ปิดฝาให้แน่นเก็บไว้ในที่อุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียส

ข. สารละลายมาตรฐาน sphingomyelin 1 ไมโครกรัม/1 ไมโครลิตร

ละลาย sphingomyelin 1 หลอดหนัก 50 มก. ด้วย chloroform methanol (1 : 1) 5 มล. นำสารละลายนี้มา 0.1 มล. เติม chloroform 0.9 มล. จะได้สารละลาย sphingomyelin ที่มีความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม/1 ไมโครลิตร แบ่งเก็บหลอดละ 0.1 มล. ปิดจุกให้สนิทเพราะเป็นสารละลายที่ระเหยได้ง่าย เก็บที่อุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียส

ค. สารละลายมาตรฐาน phosphathidyl ethanolamine

ชั่ง phosphathidyl ethanolamine 20 มก. ละลายใน chloroform methanol (1 : 1) 2 มล. นำสารละลายนี้มา 0.2 มล. เติม chloroform อีก 0.2 มล. จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม/1 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียส

ง. สารละลายมาตราฐาน phosphathidyl serine

ละลาย phosphathidyl serine 5 มก. ละลาย chloroform : methanol (1 : 1) 2.5 มล. จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 2 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร

จ. สารละลายมาตราฐาน lysophosphathidyl choline (Lysolecithin)

ชั่ง lysolecithin 25 มก. ละลายใน chloroform : methanol (1 : 1) 5 มล. จะได้สารที่มีความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร

ฉ. สารละลายมาตราฐาน phosphathidyl inositol

ละลาย phosphathidyl inositol 1 หลอด 5 มก. ใน chloroform : methanol (1 : 1) 5 มล. จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร เก็บสารละลายนี้ไว้ [illegible] 0 องศาเซลเซียส

2.4.5 สารละลายสำหรับ Thinlayer chromatography

ผสม chloroform 65 มล. กับ methanol 30 มล. น้ำ 4 มล. และ acetic acid 2 มล. เขย่าให้เข้ากัน สารละลายนี้ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำการทดลอง

2.4.6 สารละลายที่ใช้ในวิธี shake test

ก. 95% ethanol

ผสม absolute ethanol 190 มล. กับน้ำกลั่น 10 มล. เขย่าให้เข้ากันเก็บในขวดที่มีฝาปิดสนิท

002214

ข. 0.9% sodium chloride

ชั่ง sodium chloride 0.9 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มล. เขย่าให้สารละลายหมด เก็บไว้ในภาชนะที่สะอาดปราศจากสิ่งเจือปนที่จะทำให้เกิดฟองได้

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

2.5 วิธีทำการทดลอง

2.5.1 การสกัด phospholipid จากน้ำครำ

นำน้ำครำตัวอย่างที่ปั่นแยกเอาสารที่ไม่ต้องการออกแล้วมา 2 มล. ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 15 มล. (centrifuge tube 15 มล.) เติม methanol 2 มล. เพื่อ denature protien แล้วนำไปปั่นด้วย rotamixer 30 วินาที เติม chloroform 4 มล. ปั่นด้วย rotamixer อีก 90 วินาที เพื่อสกัดเอา lipid ออกจากน้ำครำ จะได้ของเหลวที่เป็น emulsion สีขาวขุ่นเหมือนน้ำนม นำemulsion ที่ได้ไปปั่นด้วยเครื่องปั่นแยก MSE refrigerated centrifugeที่ 0 องศาเซลเซียส ด้วยแรง 1400xg เป็นเวลา 15 นาที สารในหลอดทดลองจะแยกออกเป็นสามชั้น ชั้นบนจะเป็นชั้นของ methanol ชั้นกลางจะเป็นโปรตีนจับกันเป็นแผ่นสีขาว และชั้นล่างสุดเป็นชั้นของ chloroform (ถ้าสารนี้แยกกันไม่ดีก็เติม methanol อีก 2–3 มล. แล้วปั่นอีกครั้งหนึ่งด้วยแรงปั่น 1400xg เป็นเวลา 15 นาที) ดูดเอาชั้นของ methanol ใส่หลอดทดลองหลอดใหม่ แล้วค่อย ๆ เอา spatula เล็ก ๆ เขี่ยเอาชั้นของโปรตีนออก เหลือชั้น chloroform เก็บไว้ เติม chloroform 3 มล. ลงไปในชั้นของ methanol ที่แยกออกมาได้ ปั่นด้วย rotamixer 30 วินาที แล้วแยกชั้นchloroform ที่ได้นี้ไปรวมกับชั้น chloroform ในหลอดแรก เติม sodium sulfate anhydrous 1 กรัม ลงในหลอดที่ใส่ chloroform เพื่อดูดน้ำออก ปิดจุกตั้งไว้ในตู้เย็น 30 นาที ชั้น chloroform ที่ได้จะใส ถ้า chloroform ที่ได้ขุ่นแสดงว่ายังมีน้ำปนอีก ต้องถ่ายใส่หลอดใหม่แล้วเติม sodium sulfate snhydrous ลงไปอีก 1 กรัม เพื่อดูดน้ำอีกครั้งหนึ่ง ริน chloroform ลงในหลอดทดลองอีกหลอดหนึ่ง โดยระมัดระวังไม่ให้ sodium sulfate ติดไปด้วย เติม chloroform 2 มล. ลงไปล้างสารที่ติดอยู่กับ sodium sulfateอีกสองครั้ง นำชั้น chloroform ที่ได้มารวมกันแล้วไประเหยแห้ง โดยวางหลอดทดลองใน water bath ที่ 60 องศาเซลเซียส และเป่าด้วยแกสไนโตรเจน

สารที่เหลือในหลอดทดลองนำมาล้างด้วย chloroform 3 ครั้ง ๆ ละ 0.1 มล. chloroform ที่ได้นำมารวมกัน ใส่ในหลอดทดลองอันใหม่ เป่าให้ chloroform ระเหยแห้งด้วยแกสไนโตรเจน

2.5.2 การตกตะกอน total lipid ด้วย acetone

นำหลอดทดลองที่มี lipid ที่ได้จาก 2.5.1 นี้ ไปแช่ในน้ำแข็ง หยด acetone 0 องศาเซลเซียส ลงไปในหลอดทดลองสองหยด หมุนหลอดทดลองเบา ๆ จะเกิดตะกอนสีขาวเกาะอยู่ที่ก้นหลอด แล้วค่อย ๆ หยด acetone ที่ 0 องศาเซลเซียส ลงไปอีกจนครบ 0.75 มล. ตั้งไว้ในน้ำแข็งอีก 30 นาที แล้วนำไปปั่นแยกที่ 1400 xg เป็นเวลา 2 นาที เทสารละลายที่อยู่ส่วนบนออก นำตะกอนที่ติดอยู่กับหลอดทดลองมาเป่าให้แห้งด้วยแกสไนโตรเจน

2.5.3 การตรวจหาโดย Thinlayer chromatography

นำสารระเหยแห้งที่ได้ในข้อ 2.5.2 มาละลายด้วย chloroform 20 ไมโครลิตร และ spot ลงบนแผ่นพลาสติคที่ฉาบด้วยซิลิกา (plate) หนา 250 ไมครอน โดยให้ห่างจากขอบล่างของ plate 2.5 ซม. และให้จุดของสารตัวอย่างห่างกันจุดละ 1.5 ซม. หยดสารละลายมาตรฐานของ lecithin และ sphingomyelin อัตราส่วน 2 : 1 ปริมาณ 20 ไมโครลิตร (lecithin ความเข้มข้น 2 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร และ sphingomyelin ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร) เป็นจุดแรกและจุดสุดท้ายใน plate เดียวกัน ทุกครั้งที่ทำการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 1

สารละลายที่ใช้ในการแยกสารด้วยวิธี TLC ประกอบด้วย chloroform : methanol : น้ำ : acetic acid 65:30:4:2 บรรจุอยู่ใน tank ที่กรุรอบ-

ด้วยกระดาษกรองโดยปล่อยให้ไอสารละลายนี้อิ่มตัวแล้วประมาณสองชั่วโมง ใช้เวลาในการแยกสารเป็นเวลา 2 ชม. นำ plate ไประเหยแห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 30 นาที นำไปย้อมสีด้วย 7% phosphomolybdic acid ตั้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปอบที่ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

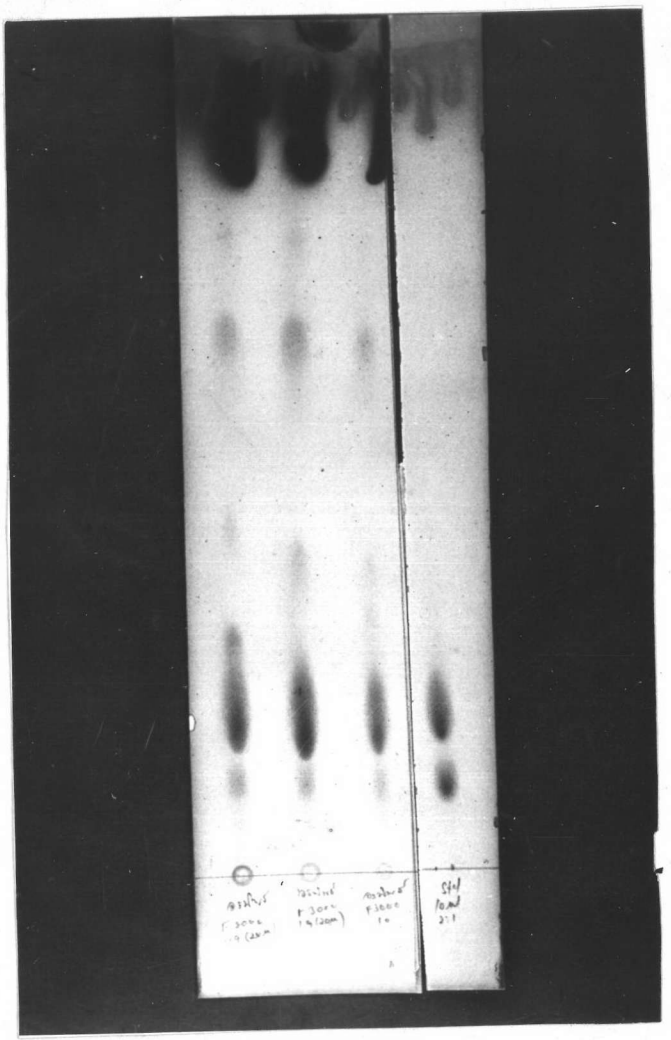
2.5.4 การวัดความเข้มของ lecithin และ sphingomyelin

สีน้ำเงินเข้มของ phospholipid ที่เกิดขึ้นบนพื้นสีเขียวอ่อน วัดได้โดยอาศัยเครื่อง densitometer ซึ่งทำได้โดยการลอก silica gel ออกจาก plate ด้วยแถบกาว (transparent tape 3 mm) โดยนำแถบกาวไปทาบลงบน plate แล้วใช้นิ้วรีดให้เรียบ ตัดแผ่น silica gel ออกให้มีขนาดเท่าแถบกาว ลอกแผ่นพลาสติกด้านหลังออกแล้วนำไปปะลงบนแถบกาวอีกชิ้นหนึ่งก่อนที่จะนำไปเข้าเครื่อง densitometer เครื่องจะอ่านความเข้มของจุดออกมาเป็น profile ดังแสดงในรูปที่ 2

2.6 ความสามารถในการแยก phospholipid

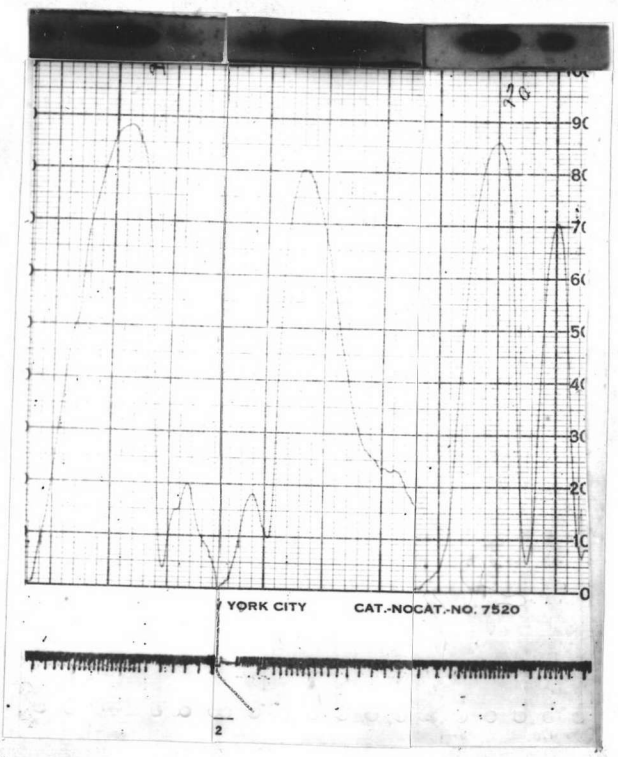
ทำการทดลองหาความสามารถในการแยกสาร phospholipid โดย spot สารละลายมาตรฐานต่อไปนี้ลงบนแผ่น TLC แล้ว นำไปทำการทดลองตามข้อ 2.5.3–2.5.4 วัด Rf value ที่ได้

สารละลายมาตรฐาน	phosphathidyl ethanolamine	50 ไมโครกรัม
สารละลายมาตรฐาน	phosphathidyl serine	15 ไมโครกรัม
สารละลายมาตรฐาน	phosphathidyl inositol	50 ไมโครกรัม
สารละลายมาตรฐาน	phosphathidyl choline	50 ไมโครกรัม
สารละลายมาตรฐาน	Sphingomyelin	25 ไมโครกรัม
และสารละลายมาตรฐานของ	Lysolecithin	50 ไมโครกรัม



หอสมุดกลาง
จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

รูปที่ 1 การแยก phospholipid โดย TLC จากน้ำคร่ำ ตัวอย่างเทียบกับสารละลายมาตราฐานของ lecithin ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัม และสารละลายมาตราฐานของ sphingomyelin 10 ไมโครกรัม ในสารละลาย chloroform:methanol:acetic acid น้ำ 65:30:4:2



รูปที่ 2 แสดงกราฟของ lecithin (L) และ sphingomyelin (S) ของแผ่น silica gel ที่วัดด้วยเครื่อง densitometer

2.7 ความไวในการวัด

ทดลองหาความไวในการวัดโดยหาค่าต่ำสุดที่วิธี TLC ในระบบที่ใช้ในวิทยานิพนธ์นี้จะวัดได้โดย spot สารละลายมาตรฐานด้วยความเข้มข้นต่าง ๆ กัน คือ 1, 2, 3, 5, 10, 15, 20, 30 และ 40 ไมโครกรัม แล้วนำไปทำการทดลองตามข้อ 2.5.3–2.5.4 หน้า 13

2.8 Standard curve of L/S Ratio เมื่อวัดด้วยเครื่อง densitometer

ทดลองหา standard curve ของอัตราส่วน L/S โดยนำสารละลายมาตรฐานที่มีอัตราส่วน L/S ที่ 0.5 : 1 (spot สารละลาย lecithin 10 ไมโครกรัม และ sphingomyelin 20 ไมโครกรัม) 1 : 1 (spot สารละลาย L/S จำนวน 10/10 ไมโครกรัม) 2 : 1 (spot สารละลาย L/S 20/10 ไมโครกรัม) 3: 1 (spot สารละลาย L/S 30/10 ไมโครกรัม) 4 : 1 (spot สารละลาย 40/10 ไมโครกรัม) นำมาทำการทดลองตามข้อ 2.5.3–2.5.4 นำผลที่ได้มาเขียนกราฟ ระหว่างอัตราส่วน L/S ของสารละลายมาตรฐานที่ spot ลงไป กับอัตราส่วน L/S ที่ได้จากการวัดด้วยเครื่อง densitometer

2.9 Reliability ของวิธีทดลอง

2.9.1 ความแม่นยำของวิธีทดลอง (precision)

ก. หาความแตกต่างของอัตราส่วน L/S ในน้ำคร่ำเมื่อทำพร้อม ๆ กันหลายตัวอย่าง โดยเลือกน้ำคร่ำที่มีค่าปานกลาง 15 หลอด หลอดละ 2 มิลลิลิตร ไปสกัดและหาอัตราส่วน L/S ด้วยเครื่อง densitometer

ข. ความแตกต่างของอัตราส่วน L/S ในน้ำคร่ำตัวอย่าง เมื่อทำการทดลองต่างวันเป็นเวลา 3 วัน ทำครั้งละ 15 ตัวอย่าง ทำการทดลองหาค่า L/S เหมือนข้อ ก. คำนวณหาความแตกต่างระหว่างการทดลองแต่ละครั้ง

2.10 Percentage of recovery

ก. เป็นการศึกษาว่าวิธีทดลองนี้มีประสิทธิภาพความถูกต้องสูงเพียงใด นำน้ำคร่ำตัวอย่างมาปั่นตามวิธีในหัวข้อที่ 2.3 แล้วเติมสารละลายมาตรฐาน Lecithin และ Sphingomyelin อัตราส่วน 2 : 1 ซึ่งมีความเข้มข้น 10/5 ไมโครกรัม และ 20/10 ไมโครกรัม ต่อจากนั้นนำไปสกัดหา phospholipid และทำการแยก lecithin และ sphingomyelin ตามหัวข้อ 2.5.1–2.5.5 คำนวณหาจำนวน lecithin และ sphingomyelin ที่เติมลงไป

ข. การคำนวณหา percentage of recovery

สมมุติเติม sphingomyelin A ไมโครกรัม ลงในน้ำคร่ำ นำไปสกัดและแยก phospholipid ด้วย TLC

น้ำคร่ำ+sphingomyelin A ไมโครกรัม วัด area ของ sphingomyelin จาก densitometer ได้ = x หน่วย

น้ำคร่ำ วัด area ของ sphingomyelin จาก densitometer ได้ = y หน่วย

sphingomyelin ที่เติมลงไป วัด area ของ sphingomyelin จาก densitometer ได้ = x-y หน่วย

นำไปอ่านค่าพื้นที่ใต้กราฟจาก standard curve ของ sphingomyelin ปริมาณของ sphingomyelin ที่เติมลงไปอ่านจาก standard curve = B ไมโครกรัม

% Recovery ของ sphingomyelin $= \frac{Bx100}{A}$ ไมโครกรัม

Percentage recovery ของ lecithin ใช้วิธีคำนวณเหมือนกัน

2.11 การเตรียมสารตัวอย่าง

จากการศึกษารายงานของผู้ที่ทำการทดลองมาแล้ว ยังมีข้อขัดแย้งเกี่ยวกับอิทธิพลของอุณหภูมิต่ออัตราส่วน L/S เช่น การทดลองของ Kulkarni และคณะ (1972) spellacy และ Buhi (1972) พบว่าตัวอย่างน้ำครำที่ส่งมาทางไปรษณีย์ธรรมดา ไม่ทำให้อัตราส่วน L/S เปลี่ยนแปลง Whiteflild และคณะ (1973) ก็พบว่าไม่ว่าจะเก็บตัวอย่างน้ำครำไว้ที่อุณหภูมิใด อัตราส่วนของ L/S ก็ไม่เปลี่ยนแปลง แต่มีนักวิจัยบางท่านรายงานว่าการเก็บน้ำครำไว้ที่อุณหภูมิห้องธรรมดา จะทำให้อัตราส่วนของ L/S ลดลง (Wagstaff และคณะ 1974) ขณะเดียวกัน Verder และ Clausen (1974) พบว่าอัตราส่วนของ L/S นี้จะไม่เปลี่ยนแปลงถ้าสารตัวอย่างน้ำครำเก็บไว้ที่ −20 องศาเซลเซียส

เนื่องจากมีข้อขัดแย้งจากรายงานต่าง ๆ ดังกล่าว จึงเป็นเหตุจูงใจให้ผู้ทำวิทยานิพนธ์นี้ทำการศึกษา เพื่อหาสภาพที่เหมาะสมในการเก็บตัวอย่างน้ำครำสำหรับใช้ในห้องปฏิบัติการโดยไม่ทำให้อัตราส่วน L/S เปลี่ยนแปลง การทดลองทำโดยแบ่งน้ำครำใส่หลอดทดลอง หลอดละ 2 มล. ส่วนหนึ่งนำไปทดลองหาอัตราส่วน L/S ทันที แล้วแบ่งเก็บส่วนที่เหลือไว้ 3 สภาพคือ

1. เก็บไว้ที่อุณหภูมิธรรมดา เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการทดลองตามข้อ 2.5

2. ใส่ 10% EDTA 0.05 มล. ต่อน้ำครำ 1 มล. แล้วเก็บไว้ที่ −10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน แล้วทำการทดลอง ตามข้อ 2.5

3. เก็บไว้ที่ −20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน 30 วัน และ 60 วัน แล้วทำการทดลองตามข้อ 2.5

2.12 ทดลองหาอัตราเร็วที่เหมาะสมในการปั่นแยกน้ำครำ

อัตราเร็วในการปั่นแยกน้ำครำออกจากสารที่ไม่ต้องการมีความแตกต่างกันมาก อาทิ อัตราเร็ว 1100 xg เป็นเวลา 5 นาที (Verder และ Clausen 1974) หรือ 12000 xg (10000 รอบต่อนาที) 10 นาที (Sarkozi 1972) ซึ่งผลการปั่นแยกนี้ ทำให้สารจำพวก lipid ซึ่งไปละลายน้ำและบางส่วนที่ยึดกับ membrane ตกอยู่ส่วนล่างของหลอดทดลองมีจำนวนไม่เท่ากัน อันจะทำให้อัตราส่วนของ L/S ที่หาได้แตกต่างกันไปด้วย จึงทำการทดลองหาความเร็วต่าง ๆ เพื่อใช้ในการปั่นแยกที่เหมาะสมดังนี้

1. ปั่นแยกโดยใช้แรงปั่น 350 xg ที่ 0 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที
2. ปั่นแยกโดยใช้แรงปั่น 600 xg ที่ 0 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที
3. ปั่นแยกโดยใช้แรงปั่น 1400 xg ที่ 0 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที

แล้วนำสารละลายที่แยกได้ไปทำการทดลองหาอัตราส่วนของ L/S ด้วยวิธีในข้อ 2.5 ถึง 2.5.4

2.13 การตกตะกอน phospholipid ด้วย acetone ที่ 0 องศาเซลเซียส

นำน้ำครำที่ปั่นแยกเอาสารที่ไม่ต้องการออกแล้วมา 3 มล. ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 15 มล. สกัดเอา phospholipid ออก โดยใช้ methanol 3 มล. ต่อ chloroform 6 มล. ดำเนินการทดลองตามข้อ 2.5.1 ในที่สุดจะได้ตะกอนแห้งติดอยู่ก้นหลอดทดลอง ละลายตะกอนที่ได้ด้วย chloroform 100 ไมโครลิตร แล้วแบ่งออกเป็นสองหลอดเท่ากัน หลอดหนึ่งนำไปเป่าให้แห้งจะได้ตะกอนของ phospholipid ติดอยู่ก้นหลอด นำไปหาอัตราส่วนของ L/S ตามข้อ 2.5.2 และนำไปวัดความเข้มข้นของจุดตามหัวข้อ 2.5.3 และ 2.5.4 ส่วนอีกหลอดหนึ่งนำไปเป่าให้แห้งและตกตะกอนด้วย

acetone ที่ 0 องศาเซลเซียส ทำการทดลองตามข้อ 2.5.2 และนำไปหาอัตราส่วนของ L/S ตามหัวข้อที่ 2.5.3 ถึง 2.5.4

2.14 การทดลองหาเวลาที่เหมาะสมในการอบ plate

ทดลองโดยการ spot สารละลายมาตรฐานที่ประกอบด้วย lecithin (ที่มีความเข้มข้น 2 ไมโครกรัม/ไมโครลิต) และสารละลายมาตรฐานของ sphingomyelin (ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร) จุดละ 10 ไมโครลิตร เป็นจำนวน 6 จุด แต่ละจุดห่างกัน 2 ซม. แล้วนำไปทำการทดลองตามข้อที่ 4.3 แล้วตัดแยกพลาสติก plate ออกเป็น 5 แผ่น ก่อนนำไปอบที่ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่าง ๆ กัน ดังนี้คือ 5, 10, 15, 20, 30 และ 40 นาที ตามลำดับ นำแผ่นพลาสติกทั้ง 5 นี้ ไปทำการวัดความเข้มของจุดตามข้อ 2.5.3 และนำไปวัดความเข้มข้นของจุดตามหัวข้อ 2.5.4 และคำนวณอัตราส่วน L/S

2.15 การทดลองหาอัตราส่วนของ lecithin และ sphingomyelin ในน้ำครำโดยวิธี Thin layer chromatography

15.1 โดยวิธีเทียบอัตราส่วน L/S กับสารละลายมาตรฐานของ lecithin และ sphingomyelin

ได้ทำการทดลองหาอัตราส่วนของ L/S จากตัวอย่างน้ำครำของสตรี โดยนำน้ำครำที่ได้มาปั่นแยกเอาสิ่งที่ไม่ต้องการออก และทำการทดลองตามข้อ 2.5 ถึง 2.5.4 หน้า 18 และหาอัตราส่วนของ lecithin และ sphingomyelin โดยการเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน 3 จุดคือ จุดที่ 1 เป็นสารละลายมาตรฐานของ lecithin และ sphingomyelin อัตราส่วน 1 : 1 จุดที่ 2 มีอัตราส่วน 1 : 5 : 1 จุดที่ 3 อัตราส่วน 2 : 1 (สารละลายมาตรฐานประกอบด้วย lecithin 2 ไมโครกรัม/1 ไมโครลิตร และ sphingomyelin 1 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร)

2.15.2 โดยวิธีวัดความกว้างและยาวของจุด

นำน้ำคร่ำตัวอย่างมาดำเนินการหาอัตราส่วน L/S ตามหัวข้อ 2.5.1 ถึง 2.5.4 แล้วหาอัตราส่วน L/S โดยการวัดความกว้าง และความยาวของจุดด้วยไม้บรรทัด นำมาหาพื้นที่โดยใช้ความกว้างคูณด้วยความยาว คำนวณหาอัตราส่วน L/S โดยใช้พื้นที่ของจุด lecithin หารด้วยพื้นที่ของจุด sphingomyelin

$$\text{อัตราส่วน L/S} = \frac{\text{ความกว้าง x ความยาวของจุด lecithin}}{\text{ความกว้าง x ความยาวของจุด sphingomyelin}}$$

2.15.3 โดยใช้เครื่อง densitometer

นำน้ำคร่ำมาดำเนินการวัดอัตราส่วน L/S ตามวิธีในข้อ 2.5.1 ถึง 2.5.4 จากนั้นนำไปวัดความเข้มของ lecithin และ sphingomyelin ด้วยเครื่อง densitometer แล้วนำมาคำนวณหาอัตราส่วน L/S

$$\text{อัตราส่วน L/S} = \frac{\text{พ.ท. ใต้กราฟของ lecithin}}{\text{พ.ท. ใต้กราฟของ sphingomyelin}}$$

2.16 การหา surfactant ในน้ำคร่ำ โดยวิธี shake test

นำน้ำคร่ำที่ได้มาทำการทดลองทันที ในกรณีที่ไม่สามารถทำได้จะเก็บน้ำคร่ำไว้ที่ 5 องศาเซลเซียสได้ 1 ชั่วโมง (Clement และคณะ 1972) เขย่าน้ำคร่ำที่ได้เบา ๆ ให้เข้ากันระวังไม่ให้เกิดฟอง แล้วใส่หลอดทดลองในอัตราส่วนดังต่อไปนี้

หลอดที่	1	2	3	4	5
อัตราส่วนที่เจือจาง	1 1	1 1.3	1 2	1 4	1 5
น้ำคร่ำ	1	0.75	0.5	0.25	0.2
0.9% น้ำเกลือ	–	0.25	0.5	0.75	0.8
Ethanol	1	1	1	1	1

เขย่าด้วยมือเป็นเวลา 15 วินาที ตั้งไว้ 15 นาที อ่านผลการทดลองโดยดูฟองที่เกิดขึ้นรอบ ๆ ส่วนบนของน้ำคร่ำ ถ้าพบว่ามีฟองเกิดขึ้นตั้งแต่หลอดที่ 1–3 ขึ้นไป แปลผลเป็นบวกคาดคะเนว่าทารกที่เกิดน่าจะมี **lung maturity** ดี ถ้ามีฟองเกิดระหว่างหลอดที่ 1 และ 2 อ่านผลว่า **intermediate** และถ้าไม่พบฟองเลยทั้ง 5 หลอดอ่านผล "ให้ผลลบ" ซึ่งแปลผลว่าปอดของทารกไม่สมบูรณ์พอ **(Immaturity)**