บทที่ 3

วิธีทดลอง

3.1 การเตรียมสารละลาย

3.1.1 สารละลายที่ใช้วัดแอคติวิตีของเอ็นไซม์แลคเตตดีไฮโดรจีเนส ประกอบด้วย

3.1.1.1 สารละลายทริสไฮดรอกซีเมทิลอะมิโนมีเทนที่มีความเข้มข้น 0.03 โมล/ลิตร pH 8.8

เตรียมโดยชั่งทริสไฮดรอกซีเมทิลอะมิโนมีเทน 1.817 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 8.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริคที่มีความเข้มข้น 5 โมล/ลิตร แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 500 มิลลิลิตร

3.1.1.2 สารละลายโซเดียมแลคเตตที่มีความเข้มข้น 0.3 โมล/ลิตร

เตรียมโดยเจือจางสารละลายโซเดียมแลคเตตที่มีความเข้มข้น 60 เปอร์เซนต์ จำนวน 0.56 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

3.1.1.3 สารละลายนิโคตินาไมด์อะดีนินไดนิวคลีโอไทด์ที่มีความเข้มข้น 0.0024 โมล/ลิตร

เตรียมโดยใช้นิโคตินาไมด์อะดีนินไดนิวคลีโอไทด์ 15.92 มิลลิกรัมละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร

3.1.2 สารละลายที่ใช้เตรียมโพลีอะไครลาไมด์เจล

3.1.2.1 สารละลาย A

เตรียมโดยนำทริสไฮดรอกซีเมทิลอะมิโนมีเทน 36.3 กรัม ละลายในกรดไฮโดรคลอริคที่มีความเข้มข้น 1 โมล/ลิตร จำนวน 48 มิลลิลิตร แล้วเติม N,N,N',N' - tetramethylene diamine (TEMED) 0.23 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 8.9 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 โมล/ลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนเป็น 100 มิลลิลิตร

011275

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.1.2.2 สารละลาย B

เตรียมโดยใช้อะไครลาไมด์ 30 กรัม และ N,N' - methylenebisacry--lamide (BIS) 0.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

3.1.2.3 สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตที่มีความเข้มข้น 0.14 %

ใช้แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 140 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

3.1.2.4 สารละลายโพลีอะไครลาไมด์เจลที่มีความเข้มข้น 7.5 %

เตรียมโดยใช้สารละลาย A 2 มิลลิลิตร สารละลาย B 4 มิลลิลิตร น้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร และสารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 8 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

3.1.2.5 สารละลายโพลีอะไครลาไมด์เจลที่มีความเข้มข้น 5.5 %

เตรียมโดยนำสารละลายเจลที่มีความเข้มข้น 7.5 % มา 11 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 4 มิลลิลิตร

3.1.3 ทริสไกลซีนบัฟเฟอร์สำหรับเจลอีเล็คโตรโฟลีซีส

เตรียมโดยใช้ทริสไฮดรอกซีเมทิลอะมิโนมีเทน 6 กรัม และไกลซีน 28.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 8.3 ด้วยโซเดียม-ไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 โมล/ลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตรก่อนใช้เจือจางด้วยน้ำกลั่น 10 เท่า

3.1.4 การเตรียมสีย้อมแอคติวิตีของแลคเตตดีไฮโดรจีเนสในโพลีอะไครลาไมด์เจล

3.1.4.1 โซเดียมแลคเตตที่มีความเข้มข้น 1 โมล/ลิตร

ตวงสารละลายโซเดียมแลคเตตเข้มข้น 60 % มา 1.87 มิลลิลิตร แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตร เตรียมแล้วใช้ทันที

3.1.4.2 นิโคตินาไมด์อะดีนินไดนิวคลีโอไทด์ที่มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ใช้นิโคตินาไมด์อะดีนินไดนิวคลีโอไทด์ 100 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตร เตรียมแล้วใช้ทันที

3.1.4.3 สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0.005 โมล/ลิตร

ใช้แมกนีเซียมคลอไรด์ 0.1016 กรัม ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

3.1.4.4 สารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0.1 โมล/ลิตร

ใช้โซเดียมคลอไรด์ 0.5844 กรัม ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

3.1.4.5 สารละลายไนโตรบลูเทตราโซเลียมที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ใช้ไนโตรบลูเทตราโซเลียม 100 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

3.1.4.6 สารละลายฟีนาซีนเมทโทซัลเฟตที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ใช้ฟีนาซีนเมทโทซัลเฟต 50 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ได้ 50 มิลลิลิตร

3.1.4.7 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.5 โมล/ลิตร pH 7.4

ใช้โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 2.62 กรัม และไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 5.34 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 7.4 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 4 โมล/ลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

ดวงสารละลายโซเดียมแลคเตต 5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายนิโคตินาไมด์-อะดีนินไดนิวคลีโอไทด์ 5 มิลลิลิตร สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 5 มิลลิลิตร สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ 5 มิลลิลิตร ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 จำนวน 12.5 มิลลิลิตร ไนโตรบลูเทตราโซเลียม 12.5 มิลลิลิตร และฟีนาซีนเมทโทซัลเฟต 1.25 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วใช้ทันที

3.1.5 บัฟเฟอร์ที่ใช้สำหรับแยกโพลีเอมีนโดยคอลัมน์ Dowex 50W-X8

3.1.5.1 โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.1 โมล/ลิตร pH 8.3 ที่มีโซเดียมคลอไรด์อยู่ 0.7 โมล/ลิตร

ใช้ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 12.26 กรัม และโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 2.12 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร แล้วเติมโซเดียมคลอไรด์ 40.9 กรัม ปรับ pH ให้เป็น 8.3 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 1 โมล/ลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร

3.1.6 สารละลายสำหรับใช้วัดปริมาณโพลีเอมีน

3.1.6.1 สารละลาย 2,4 -dinitro -1- fluorobenzene (DNFB) ที่มีความเข้มข้น 1.3 %

เตรียมโดยใช้ DNFB 0.65 มิลลิลิตร มาเจือจางด้วยอะซีโตน 50 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.1.6.2 สารละลายกรดไฮโดรคลอริคที่มีความเข้มข้น 5 โมล/ลิตร

เตรียมโดยนำกรดไฮโดรคลอริคที่เข้มข้น 35.4 % มา 218 2 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรจนได้ 500 มิลลิลิตร

3.1.6.3 สารละลายอิ่มตัวของโซเดียมเทตราบอเรท

เตรียมโดยละลายโซเดียมเทตราบอเรทในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร จนกระทั่งสารละลายอิ่มตัว

3.2 การเตรียมโพลีอะไครลาไมด์เจล

เตรียมหลอดแก้วสำหรับใส่เจลซึ่งมีความยาว 10 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร โดยตั้งหลอดแก้วให้ตรงบนที่ตั้ง ตวงสารละลายโพลีอะไครลาไมด์เจลที่มีความเข้มข้น 5.5 % ใส่ในหลอดแก้วให้มีความสูง 8 เซนติเมตร แล้วเติมน้ำกลั่น 2 - 3 หยดลงบนเจล รอให้เจลแข็งตัวประมาณ 40 นาที จะสังเกตเห็นรอยแบ่งชั้นระหว่างเจลกับน้ำกลั่นใช้กระดาษซับ ซับน้ำกลั่นส่วนบนออก เจลที่เตรียมได้ในหลอดแก้วจะนำไปใช้ทันทีในข้อ 3.5

3.3 การสะกัดเอ็นไซม์แลคเตตดีไฮโดรจีเนสจากเนื้อเยื่อเต้านม

สะกัดเอ็นไซม์แลคเตตดีไฮโดรจีเนสจากเนื้อเยื่อตามวิธีของ Goldman (1964) โดยนำก้อนเนื้อเยื่อเต้านมออกจากตู้เย็น -70 องศาเซลเซียส ตั้งทิ้งให้อ่อนตัวในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วล้างในสารละลายซูโครสที่มีความเข้มข้น 0.35 โมล/ลิตร ซึ่งแช่เย็นที่ 4 องศาเซลเซียส ใช้กรรไกรตัดไขมันและเส้นเลือดที่อยู่รอบ ๆ ก้อนเนื้อออก ชั่งน้ำหนัก

ตัดออกเป็นชิ้นตามน้ำหนักที่ต้องการ นำมาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ โดยทำในภาชนะที่แช่น้ำแข็งตลอดเวลา เติมสารละลายซูโครสที่มีความเข้มข้น 0.25 โมล/ลิตร จนได้สัดส่วนของชิ้นเนื้อกับซูโครสเป็น 100 - 300 มิลลิกรัม ต่อ 1 มิลลิลิตร นำมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องโฮโมจิไนเซอร์ด้วยความเร็ว 2000 รอบต่อนาที นานครั้งละ 20 วินาที ประมาณ 10 ครั้ง หรือจนละเอียดดี แล้วนำมาปั่นแยกตะกอนในเครื่องอุลตร้าเซ็นตริฟิวจ์ที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 100,000 g นาน 1 ชั่วโมง เก็บส่วนที่เป็นน้ำมาวัดแอคติวิตีของเอ็นไซม์แลคเตตดีไฮโดรจีเนส ตามวิธีข้อ 3.4 วัดปริมาณโปรตีน (ภาคผนวก ข้อ 1.2) และแยกเอ็นไซม์แลคเตตดีไฮโดรจีเนสโดยโพลีอะไครลาไมด์อีเล็กโตรโฟรีซีส ตามวิธีข้อ 3.5

3.4 <u>วิธีวัดแอคติวิตีของเอ็นไซม์แลคเตตดีไฮโดรจีเนส</u>

ปรับปรุงวิธีของ Wacker (1956) โดยผสมทริสไฮดรอกซีเมทิลอะมิโนมีเทน-บัฟเฟอร์ 0.03 โมล/ลิตร pH 8.8 จำนวน 1 มิลลิลิตรกับโซเดียมแลคเตต 1 มิลลิลิตร และส่วนที่เป็นน้ำใสที่แยกได้จากข้อ 3.3 จำนวน 0.1 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่น 0.4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเริ่มปฏิกิริยาโดยเติมนิโคตินาไมด์อะดีนินไดนิวคลีโอไทด์ (NAD) 0.5 มิลลิลิตร แล้ววัดการดูดแสงของนิโคตินาไมด์อะดีนินรีดิวส์ฟอร์ม (NADH) ที่เพิ่มขึ้นทันทีด้วยเครื่องสเปคโตรโฟมิเตอร์ โมเดล 25 ที่ความยาวคลื่น 345 นาโนเมตร ภายในเวลา 3 นาที คำนวณแอคติวิตีของเอ็นไซม์เป็นยูนิต ซึ่งเท่ากับจำนวนไมโครโมลของ NADH ที่เพิ่มขึ้น/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน

3.5 <u>วิธีแยกเอ็นไซม์แลคเตตดีไฮโดรจีเนสโดยโพลีอะไครลาไมด์เจลอีเล็กโตรโฟรีซีส</u>

ใช้วิธีของ Dietz และ Lubrano (1967) โดยนำหลอดแก้วที่บรรจุโพลีอะไคร-ลาไมด์เจลไว้จากข้อ 3.2 มาเสียบในช่องของเครื่องอีเล็กโตรโฟรีซีสที่ต่อกับเครื่องจ่ายไฟฟ้า (Power supply) และตั้งไว้ในห้องที่มีอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ให้ปลายหลอดจุ่มอยู่ในทริสไกลซีนบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.03 โมล/ลิตร pH 8.3 ในอ่างล่างแล้วเติมทริสไกลซีนบัฟเฟอร์ลงในอ่างบนจนท่วมหลอดเจล เปิดเครื่องให้กระแสไฟฟ้าเดินนาน 30 นาที โดยใช้กระแสไฟฟ้า 2.5 มิลลิแอมแปร์ ต่อ 1 เจล ที่ 50 โวลท์ ปิดเครื่องแล้วนำส่วนน้ำใสจากข้อ 3.3 ซึ่งเจือจางเท่าตัวด้วยสารละลายซูโครสที่มีความเข้มข้น 40 %

จำนวน 50 ไมโครลิตร เติมลงในหลอดแก้วที่บรรจุเจลที่แช่อยู่ในทริสไกลซีนบัฟเฟอร์ ในเครื่องอีเล็กโตรโฟรีซีส เติมสารละลายบรอมฟีนอลบลู (1 %) ลงในอ่างบัฟเฟอร์ บนจำนวน 1.5 มิลลิลิตร เปิดเครื่องต่อเป็นเวลานาน 45 นาที หรือจนกว่าสีฟ้าของบรอมฟีนอลบลูวิ่งจากส่วนบนของหลอดมายังส่วนล่างโดยห่างจากปลายล่างประมาณ 1 เซนติเมตร ปิดเครื่องและรอประมาณ 10 นาที จึงนำเจลออกมาจากหลอดแก้วโดยใช้กระบอกฉีดยาฉีดน้ำเข้าระหว่างเนื้อเจลกับผิวแก้วแยกเนื้อเจลออกมา นำเจลมาแช่ในหลอดแก้วที่ใส่สีย้อมที่เตรียมไว้ในข้อ 3.1.4 อุ่นในตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที หลังจากนั้นนำเจลแต่ละแท่งมาล้างด้วยน้ำประปา 1 ครั้ง และกรดอะซิติคที่มีความเข้มข้น 7.5 % 1 ครั้ง จะเห็นแถบสีน้ำเงินเกิดขึ้น 5 แถบ ซึ่งเป็นแถบของ LDH-1,LDH-2,LDH-3,LDH-4และ LDH-5 ตามลำดับ การวิ่งจากขั้วลบไปขั้วบวก (Dietz และ Lubrano 1967) นำมาแช่ในกรดอะซิติคที่มีความเข้มข้น 7.5 % และเก็บไว้ในตู้เย็นที่ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปวัดการดูดแสงของแถบสีทั้ง 5 แถบด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์โมเดล 25 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร โดย scan ด้วยอัตราเร็ว 10 เซนติเมตร/นาที จะได้ peak ของไอโซไซม์ 5 peaks คำนวณแอคติวิตีของไอโซไซม์ LDH-1,LDH-2,LDH-3,LDH-4และ LDH-5โดยวัดพื้นที่ใต้ peak แต่ละ peak คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใต้ peak ทั้งหมด

3.6 <u>การเตรียมคอลัมน์ Dowex 50W-X8</u>

เตรียมตามวิธีของ Seiler (1979) โดยนำ Dowex 50W-X8 มาล้างด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 1 โมล/ลิตร และมีปริมาตรเป็น 10 เท่า แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นปริมาตรเท่ากัน 1 ครั้ง ครั้งสุดท้ายล้างด้วยกรดไฮโดรคลอริคที่มีความเข้มข้น 6 โมล/ลิตร ปริมาตรเท่ากัน ระหว่างล้างใช้ปิเปตดูดเรซินเม็ดเล็ก ๆ ออกแล้วแช่เจลในกรดไฮโดรคลอริคที่เข้มข้น 6 โมล/ลิตร ปริมาตร 4 - 5 เท่า นำมาบรรจุลงในคอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร สูง 11 เซนติเมตร จนได้ความสูงของเรซินเป็น 3 เซนติเมตร ล้างคอลัมน์ด้วยน้ำกลั่นจนกระทั่ง pH ประมาณ 1

3.7 <u>การวิเคราะห์โพลีเอมีน</u>

3.7.1 <u>การไฮโดรไลส์ปัสสาวะ</u>

ตวงปัสสาวะ 5 มิลลิลิตรใส่หลอดแก้วที่มีจุกเกลียว เติมกรดไฮโดรคลอริคเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ปิดจุกเกลียวให้สนิท นำมาไฮโดรไลส์ในตู้อบที่ 110 องศาเซลเซียสนาน 16 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงนำมาปั่นแยกตะกอนในเครื่องเซ็นติฟิวส์ที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แยกเอาส่วนใสมาทำให้แห้งในเครื่องแก้วกลั่นระเหย (Rotary evaporator) ที่ 60 องศาเซลเซียส นำตะกอนมาละลายน้ำกลั่น 2 - 5 มิลลิลิตร แล้วแต่ความเข้มข้นของโพลีเอมีน ตั้งค้างคืนในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำมาปั่นแยกตะกอนในเครื่องเซ็นติฟิวจ์ที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บส่วนที่เป็นน้ำใสไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสในหลอดพลาสติคเพื่อนำไปผ่านคอลัมน์ Dowex 50W-X8 ต่อไป

3.7.2 <u>การแยกโพลีเอมีนโดยคอลัมน์ Dowex 50W-X8</u>

ดัดแปลงวิธีของ Inoue (1973) และ Braganca (1979) โดยนำส่วนที่เป็นน้ำใสจากข้อ 3.7.1 มา 1 มิลลิลิตร ใส่บนคอลัมน์ Dowex 50W-X8 ที่เตรียมจากข้อ 3.6 และให้มีอัตราการไหลเป็น 3 มิลลิลิตรต่อ 10 นาที ล้างคอลัมน์ด้วยโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.1 โมล/ลิตร pH 8.3 ซึ่งมีโซเดียมคลอไรด์อยู่ 0.7 โมล/ลิตร จำนวน 9.2 มิลลิลิตร แล้วล้างคอลัมน์ต่อด้วยกรดไฮโดรคลอริคที่เข้มข้น 1 โมล/ลิตร จำนวน 5 มิลลิลิตร แล้วจึงชะซูเทรสซีน สเปอร์มิดีนและสเปอร์มีนออกจากคอลัมน์ด้วยกรดไฮโดร-คลอริคเข้มข้น 2.5, 3.5 และ 4 โมล/ลิตร อย่างละ 3 มิลลิลิตร ตามลำดับ ด้วยอัตราการไหล 3 มิลลิลิตร/10 นาที พร้อมกับเก็บสารละลายที่ถูกชะออกจากคอลัมน์ไว้เป็นแต่ละส่วนทุกความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริคเพื่อนำไปวัดปริมาณของโพลีเอมีนต่อไป

3.7.3 <u>การวัดปริมาณโพลีเอมีนโดยวิธีคัลเลอริเมตริก</u>

ใช้วิธีของ Rosenthal และ Tabor (1956) โดยนำสารละลายแต่ละส่วนที่เก็บได้จากข้อ 3.7.2 มาปรับ pH ให้เป็นกลางหรือ pH 7 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 4 โมล/ลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 4 มิลลิลิตร นำสารละลายส่วนนี้มา 2 มิลลิลิตร ซึ่งมีโพลีเอมีนไม่เกิน 20 ไมโครกรัม และนำสารละลายมาตรฐานโพลีเอมีน 2 มิลลิลิตรซึ่งมีโพลีเอมีนอยู่ 0.5 - 20 ไมโครกรัม blank ใช้น้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร แทนสารมาตรฐานโพลีเอมีน เติมสารละลายอิ่มตัวของโซเดียมเทตราบอเรท 0.5 มิลลิลิตร และสารละลาย

2,4-dinitro-1-fluorobenzene 0.25 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากันนำมาอุ่นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วเติมกรดไฮโดรคลอริคที่มีความเข้มข้น 5 โมล/ลิตร จำนวน 0.5 มิลลิลิตร ทันที ตั้งทิ้งให้เย็นในอุณหภูมิห้อง นำมาสะกัดด้วยเอธิว-อะซีเตท 3 มิลลิลิตรโดยผสมกลับไปกลับมา 15 ครั้ง แยกเอาส่วนบนของเอธิวอะซีเตทมาวัดการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตโฟโตมิเตอร์เทียบกับ blank หาปริมาณโพลีเอมีนในปัสสาวะได้โดยเทียบจากกราฟมาตรฐานที่สร้างขึ้นระหว่างการดูดแสงและความเข้มข้นของโพลีเอมีน

3.7.4 <u>การทดสอบความเชื่อถือได้ของการวัดโพลีเอมีนในปัสสาวะโดยวิธีคัลเลอริเมตริก</u>

3.7.4.1 <u>ความถูกต้อง (Accuracy)</u>

ทำการทดลองโดยนำตัวอย่างปัสสาวะของคนปกติมาแบ่งเป็น 4 ส่วนๆ ละ 5 มิลลิลิตร ส่วนที่สอง สามและสี่เติมโพลีเอมีนที่มีความเข้มข้น 200, 300 และ 400 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 100 ไมโครลิตรตามลำดับ นำทั้ง 4 ส่วนไปไฮโดรไลส์ตามข้อ 3.7.1 แล้วจึงนำแต่ละส่วนมาใส่บนคอลัมน์ Dowex 50W-X8 แต่ละคอลัมน์ แล้วชะโพลีเอมีนออกจากคอลัมน์ด้วยกรดไฮโดรคลอริคความเข้มข้นต่าง ๆ กันตามข้อ 3.7.2 และวัดปริมาณโพลีเอมีนในแต่ละส่วนตามวิธีข้อ 3.7.3 จากนั้นนำค่าที่วัดได้ไปคำนวณหา% recovery

3.7.4.2 <u>ความแม่นยำ (Precision)</u>

ทำการทดลอง 2 วิธีคือ

ก. วัดปริมาณโพลีเอมีนในตัวอย่างปัสสาวะเดียวกันพร้อม ๆ กัน 5 ครั้ง (Intra - assay)

ข. วัดปริมาณโพลีเอมีนในตัวอย่างปัสสาวะเดียวกัน 5 ครั้ง ซึ่งทำการทดลองต่างวันกัน (Inter - assay)

ความแม่นยำพิจารณาได้จากค่าสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน (Coefficient of Variation, CV) ซึ่งคำนวณได้จากสูตร

$$CV\ (\%) = \frac{SD \times 100}{Mean}$$