2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ

สไปรูไลน่า

สไปรูไลน่า ชนิด *S. platensis* ได้รับความอนุเคราะห์จากห้างหุ้นส่วนสามัญยอดทอง 2001 ต. นาทับ อ.จะนะ จ.สงขลา

สัตว์ทดลอง

หนูขาว สายพันธุ์ Spraque-Dawley ทั้งหมดที่ใช้ในงานวิจัย มาจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล และได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เลขที่ ศธ. 1210/713

สารเคมี

สารเคมีทั้งหมดที่ใช้ในการทดลองเป็นชนิดคุณภาพวิเคราะห์ (analytical grade) หรือเทียบเท่า

ชื่อสารเคมี	M.W.	บริษัทผู้ผลิต
Acetic acid (glacial)	60.05	J.T. Baker
Benzoic acid	183.19	Fluka
Bilirubin	584.70	Sigma
Bovine serum albumin	-	Sigma
Bromcresol green	698.0	Sigma
Chloroform	119.37	Lab Scan
Copper (II) sulfate ($CuSO_4.5H_2O$)	249.68	J.T. Baker
Creatinine	113.20	Sigma
Diacetylmonoxime	101.10	Sigma
DL-Alanine	89.09	Merck
2,4-Dinitrophenylhydrazine	198.10	Sigma
L-Aspartic acid	133.10	Merck
Ferric chloride ($FeCl_3$)	162.20	Sigma

ชื่อสารเคมี	M.W.	บริษัทที่ผลิต
D-Glucose	180.16	Fluka
Glycine	75.07	Merck
Hydrochloric acid (37% w/v)	36.46	J.T. Baker
α-Ketoglutaric acid	146.1	Sigma
L-Lactic acid	112.06	Fluka
Lithium carbonate (Li_2CO_3)	73.89	Fluka
Magnesium chloride ($MgCl_2.6H_2O$)	203.31	Fluka
Methanol (absolute)	32.04	Lab Scan
p-Nitrophenylphosphate disodium salt	371.16	Sigma
p-Nitrophenol	139.11	Aldrich
o-Phosphoric acid (85% w/v)	98	Fisher Scientific
Picric acid	229.11	Merck
Potassium iodide (KI)	166.01	J.T. Baker
Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	136.09	Fluka
Sodium azide (NaN_3)	65.01	Fluka
Sodium carbonate (Na_2CO_3)	105.99	Carlo Erba
Sodium chloride (NaCl)	58.44	Merck
Sodium hydroxide	40	Lab Scan
Disodium hydrogen ortho phosphate (Na_2HPO_4)	141.96	APS
Sodium nitrite ($NaNO_2$)	69	Merck
Sodium potassium tartrate	282.23	Carlo Erba
Sodium pyruvate	110.04	Sigma
Sodium tungstate ($Na_2WO_4.2H_2O$)	329.86	Sigma
Sulfanilic acid	173.19	BDH
Sulfuric acid	98.08	Lab Scan
Thiosemicarbazide	91.14	J.T. Baker
Thiourea	72.12	Fluka
Toluene	92.13	Lab Scan

ชื่อสารเคมี	M.W.	บริษัทที่ผลิต
o-Toluidine	107.16	Sigma
Tween-20	1,228	APS
Urea	60.06	Fluka
Uric acid	168.11	J.T. Baker

อุปกรณ์

1. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-VIS recording spectrophotometer) รุ่น UV160A ของ Shimadzu, Japan
2. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-VIS recording spectrophotometer) รุ่น 8453 ของ Hewlett-Packard, USA
3. เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบตั้งโต๊ะและควบคุมอุณหภูมิได้ (refrigerated bench-top centrifuge) รุ่น 5804R ของ Eppendorf, Germany
4. เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น 18/80 MSE ของ Sanyo-Harrier, Japan
5. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น H10 ของ Mettler, Switzerland
6. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น PG5002-S ของ Mettler, Switzerland
7. เครื่องวัด pH ของสารละลาย (pH-meter) รุ่น PHM61 ของ Radiometer, Denmark
8. เครื่องกวนสารละลาย (magnetic stirrer) รุ่น PC-410 ของ Corning, USA
9. เครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer) รุ่น K-550-GE ของ Scientific Industries, USA
10. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (unstirred digital bath) รุ่น TW20 ของ Julabo, Germany
11. กล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนส์ (fluorescense microscope) รุ่น DML ของ Leica, Germany พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพดิจิตอล รุ่น Coolpix 4500 ของ Nikon, Japan
12. เครื่องวัดการดูดกลืนแสงสำหรับสารละลายปริมาณน้อย (automated microplate reader) รุ่น EL_x808 ของ Biotek Instrument, USA

วิธีการ

2.1 การเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างสไปรูไลน่าสดจากฟาร์มเพาะเลี้ยงของห้างหุ้นส่วนสามัญยอดทอง มาใช้ทดลองโดยตรง ส่วนสไปรูไลน่าแห้งเตรียมในห้องเตรียมยา ณ ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ โดยเทสไปรูไลน่าสดที่ได้มาใหม่ ๆ (น้ำหนักประมาณ 2 กิโลกรัม) ลงในถาดสแตนเลสที่ล้างสะอาดแล้วและผ่านการฆ่าเชื้อด้วยการเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ 70% (v/v) หลังจากนั้นใช้ช้อนที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์แล้ว ปาดให้มีความหนาประมาณ 3-4 มิลลิเมตรทั่วทั้งถาด เพื่อให้สไปรูไลน่าถูกอบจนแห้งอย่างสม่ำเสมอ หลังจากนั้น จึงนำถาดเข้าตู้อบ (hot air oven) ที่อุณหภูมิ 55-60 ^{0}ซ เป็นเวลาประมาณ 24 ชั่วโมง ลอกสไปรูไลน่าซึ่งอบแห้งแล้วออกมาเป็นแผ่น ๆ จากนั้นนำไปบดในโกร่งบดยา นำผงสไปรูไลน่าที่บดได้มาร่อนด้วยแร่งเบอร์ 45 เพื่อให้ได้ขนาดเล็กสม่ำเสมอ (ได้สไปรูไลน่าแห้งน้ำหนักประมาณ 270 กรัม) จากนั้นจึงนำใส่ขวดแก้วที่มีฝาปิดมิดชิดและผ่านการฆ่าเชื้อ (sterile) เรียบร้อยแล้ว และเก็บผงสไปรูไลน่าแห้งไว้ที่อุณหภูมิ 4-8 ^{0}ซ และป้องกันแสง

2.2 การเตรียมสัตว์ทดลอง

ก่อนทำการทดลองประมาณ 1 สัปดาห์ นำหนูขาว สายพันธุ์ Spraque-Dawley ทั้งเพศผู้ และเพศเมีย อายุประมาณ 5 สัปดาห์ มีน้ำหนักประมาณ 150-300 กรัม มาเลี้ยงในกรงโลหะสเตนเลส ขนาด 24 x 45 x 15 ซ.ม. (กว้าง x ยาว x สูง) ซึ่งมีที่ใส่อาหารและขวดน้ำพร้อมหลอดเสียบอยู่บนฝากรง และใช้ขี้เลื่อยที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยวิธี autoclave แล้ว เป็นวัสดุรองนอนบนพื้นกรง ขนาดบรรจุกรงละ 6 ตัว แยกตัวผู้กับตัวเมีย และเลี้ยงอยู่ภายในห้องของสถานสัตว์ทดลองภาคใต้ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ซึ่งควบคุมอุณหภูมิประมาณ 25 ± 2 ^{o}ซ ความชื้นสัมพัทธ์ 55 ± 5 % และได้รับแสงสว่างวันละประมาณ 12 ชั่วโมง (เวลา 6.00 – 18.00 น.) หนูทุกตัวได้รับอาหารเม็ดสำเร็จรูปของบริษัท CP Mice Feed และน้ำกรอง อย่างไม่จำกัด (*ad libitum*) ในแต่ละวัน

2.3 การทดสอบในสัตว์ทดลอง

ทดสอบผลของสไปรูไลน่าทั้งแบบสดและแบบแห้งในหนูขาว โดยในการทดสอบสไปรูไลน่าแต่ละแบบประกอบด้วยหนู 4 กลุ่ม แต่ละกลุ่มแบ่งออกเป็นหนูเพศผู้ 6 ตัว และเพศเมีย 6 ตัว กลุ่มควบคุมป้อนเฉพาะตัวทำละลายซึ่งได้แก่น้ำกลั่นในปริมาณ 5 มิลลิลิตรต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัว

(5 ml/kg) ส่วนหนูในแต่ละกลุ่มทดลองป้อนด้วยสารละลายสไปรูไลน่า (5 ml/kg) ในขนาดความเข้มข้น (dose) ต่าง ๆ กัน ดังนี้

แบบแห้ง		**แบบสด**	
กลุ่มควบคุม	เฉพาะน้ำกลั่น	**กลุ่มควบคุม**	เฉพาะน้ำกลั่น
กลุ่ม 1	ขนาด 30 mg/kg	**กลุ่ม 1**	ขนาด 300 mg/kg
กลุ่ม 2	ขนาด 60 mg/kg	**กลุ่ม 2**	ขนาด 600 mg/kg
กลุ่ม 3	ขนาด 120 mg/kg	**กลุ่ม 3**	ขนาด 1200 mg/kg

ในทุก ๆ เช้า เวลาประมาณ 10.00 – 12.00 น. ทำการชั่งน้ำหนักตัว และป้อนสไปรูไลน่าให้หนูแต่ละตัวตามขนาดที่กำหนด พร้อมกับสังเกตอาการทางคลินิก รวมทั้งความผิดปกติอื่น ๆ ติดต่อกันนาน 3 เดือน

เมื่อเสร็จสิ้นการทดลอง ฆ่าหนูทุกตัวโดยวิธีดึงคอ (cervical dislocation) แล้วชำแหละศพเพื่อเก็บตัวอย่างอวัยวะภายใน (vital organs) ได้แก่ ตับ ไต ม้าม และหัวใจ มาชั่งน้ำหนัก และสังเกตความผิดปกติต่าง ๆ ด้วยตาเปล่า จากนั้นจึงเก็บไว้ในน้ำยา 10% (v/v) formalin เพื่อวิเคราะห์ทางพยาธิวิทยาเนื้อเยื่อต่อไป ส่วนซากที่เหลือถูกเผากำจัดตามขั้นตอนของหน่วยเรือนเลี้ยงสัตว์ทดลอง คณะวิทยาศาสตร์

2.4 การเก็บตัวอย่างเลือด

ตลอดการทดลอง หนูแต่ละตัวถูกเก็บตัวอย่างเลือดทั้งหมด 4 ครั้ง คือ ก่อนการทดลอง ระหว่างได้รับสไปรูไลน่าเป็นเวลา 1 เดือน 2 เดือน และ 3 เดือน ตามลำดับ โดยก่อนการเก็บตัวอย่างเลือดแต่ละครั้ง งดให้อาหารหนูประมาณ 12 ชั่วโมง หลังจากสลบด้วยอีเธอร์ จึงเจาะเลือดจากแอ่งลูกตาหนู (occular bed puncture) โดยใช้หลอดแก้ว (capillary tube) ที่มี heparin เคลือบอยู่ด้านใน นำตัวอย่างเลือดที่เจาะได้ไปหมุนเหวี่ยง (centrifuge) เพื่อแยกพลาสมาออกมา ด้วยรอบแรงเหวี่ยงที่ 1,500 x g เป็นเวลา 7 นาที ที่ 4 ^{0}ซ เก็บพลาสมาที่แยกได้ไว้ที่ -20 ^{0}ซ สำหรับทดสอบต่อไป

2.5 การวัดระดับสารชีวเคมีต่าง ๆ ในเลือด

2.5.1 การหาค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ Aspartate Aminotransferase (AST) และ Alanine Aminotransferase (ALT)

ดัดแปลงจากวิธีของ Mohun และ Cook (1957) โดยอาศัยหลักการคือ เอนไซม์ aspartate aminotransferase (AST) และ alanine aminotransferase (ALT) เร่งปฏิกิริยาการย้ายหมู่อะมิโนจาก

aspartate และ alanine ตามลำดับ ไปให้กับ α-ketoglutarate ได้ผลผลิต (product) ของปฏิกิริยาคือ oxaloacetate ในกรณีของ AST และ pyruvate ในกรณีของ ALT ซึ่งล้วนทำปฏิกิริยากับ dinitrophenylhydrazine ให้ hydrazine ซึ่งมีสีน้ำตาลแดงในด่าง

การหาแอคติวิตีของเอนไซม์ AST เริ่มต้นจาก เติมสารละลายสับสเตรท (substrate) ของ AST (ส่วนประกอบอยู่ในภาคผนวก) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง แล้วนำไปอุ่นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่ 37^{0}ซ ประมาณ 5 นาที จากนั้น เติมตัวอย่างพลาสมาปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงไป ตั้งทิ้งไว้ในอ่างควบคุมอุณหภูมิต่อไปอีก 60 นาที พอดี แล้วจึงเติมสารละลาย 2,4-dinitrophenyl hydrazine (ส่วนประกอบอยู่ในภาคผนวก) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงไป ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 20 นาที เมื่อครบเวลา จึงเติมสารละลาย 0.4 N NaOH ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้อีก 5 นาที แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 505 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank

สำหรับการหาแอคติวิตีเอนไซม์ ALT นั้น มีวิธีการทดลองเหมือนกับของเอนไซม์ AST แต่ใช้สารละลายสับสเตรทเฉพาะของ ALT (ส่วนประกอบอยู่ในภาคผนวก) และระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรทเพียง 30 นาที เท่านั้น

หาค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ AST และ ALT ในพลาสมาตัวอย่างได้ โดยนำค่าการดูดกลืนแสงของ hydrazine ที่เกิดขึ้นไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ hydrazine ซึ่งเทียบเป็นค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ AST เท่ากับ 0, 36, 92, 171 และ 285 หน่วยต่อลิตร (U/L) ตามลำดับ และกราฟมาตรฐานของเอนไซม์ ALT ซึ่งเทียบเป็น 0, 24, 48 และ 82 U/L ตามลำดับ

แอคติวิตีของเอนไซม์ AST และ ALT 1 หน่วย (Unit) หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลง 1 μmole ของ aspartate และ alanine ตามลำดับ ได้ ในเวลา 1 นาที ที่ pH 7.4 และอุณหภูมิ 37^{0}ซ

2.5.2 การหาค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ Alkaline Phosphatase (ALP)

ดัดแปลงจากวิธีของ King และ Amstrong (1980) โดยใช้หลักการคือ alkaline phosphatase สามารถเร่งการสลาย (hydrolyse) *p*-nitrophenyl phosphate ให้ *p*-nitrophenol ซึ่งมีสีเหลืองในด่าง

ทำการหาค่าแอคติวิตีของเอนไซม์นี้โดย นำหลอดทดลองมา 2 หลอด ในหลอดแรกใส่สารละลาย alkaline buffer substrate (ส่วนประกอบอยู่ในภาคผนวก) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงไป แล้วนำไปอุ่นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37^{0}ซ นาน 5 นาที จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร ลงไป ตั้งทิ้งไว้ในอ่างควบคุมอุณหภูมิต่ออีก 30 นาที พอดี แล้วจึงนำออกมาเติม

สารละลาย 0.02 N NaOH ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เสร็จแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร (O.D. 1) หลังจากนั้นจึงเติมสารละลายกรดเกลือเข้มข้น (37% w/v HCl) ลงไปประมาณ 1 หยด ผสมให้เข้ากัน แล้วนำกลับไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร อีกครั้ง (O.D. 2) ส่วนหลอดที่ 2 ทำวิธีการเดียวกันกับหลอดแรก เพียงแต่เปลี่ยนจากน้ำกลั่นเป็นตัวอย่างพลาสมาและใช้หลอดที่ 1 เทียบเป็น blank ในขั้นตอนการวัดการดูดกลืนแสง

หลังจากนั้น นำค่าที่ได้จากการหักลบค่า O.D. 2 จากค่า O.D. 1 ของหลอดที่ 2 ไปเปรียบเทียบเป็นค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ จากกราฟมาตรฐาน *p*-nitrophenol ซึ่งเทียบเป็นค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ alkaline phosphatase เท่ากับ 0, 17, 34, 68, 102 และ 136 หน่วยต่อลิตร (U/L) ตามลำดับ

แอคติวิตีของเอนไซม์ 1 หน่วย (Unit) หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน 1 μmole ของ *p*-nitrophenyl phosphate ไปเป็น *p*-nitrophenol ได้ ในเวลา 1 นาที ที่ pH 10.5 และอุณหภูมิ 37^{0}ซ

2.5.3 การหาปริมาณ Total Bilirubin และ Direct Bilirubin

ดัดแปลงจากวิธีของ Malloy และ Evelyn (1937) โดยอาศัยหลักการคือ bilirubin ทำปฏิกิริยากับ diazotized sulfanilic acid ให้ azobilirubin ซึ่งเป็นสารสีม่วงแดงที่ดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

นอกจากนี้ การที่ conjugated bilirubin มีสมบัติละลายน้ำได้ดี ดังนั้นในการหาปริมาณ conjugated bilirubin จึงวัดสีม่วงแดงที่เกิดภายหลังการทำปฏิกิริยาระหว่าง bilirubin ในพลาสมากับ diazotized sulfanilic acid แค่ 1 นาที ด้วยวิธีการวัดปริมาณดังกล่าว บางทีจึงเรียก conjugated bilirubin ว่า direct bilirubin

สำหรับ unconjugated bilirubin นั้น ไม่สามารถละลายน้ำได้ ดังนั้น ภายหลังวัดค่า conjugated bilirubin แล้ว จึงเติมเมธานอล (methanol) ลงไป แล้วทิ้งไว้ให้ปฏิกิริยาเกิดเต็มที่นาน 30 นาที สีที่เกิดขึ้นเป็นผลรวมของปริมาณ azobilirubin ที่เกิดจาก conjugated และ unconjugated bilirubin ซึ่งได้แก่ total bilirubin นั่นเอง

ทำการหาปริมาณ total และ direct bilirubin โดยเติมตัวอย่างพลาสมาปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 0.9 มิลลิลิตร ลงไปในหลอดทดลอง 2 หลอด จากนั้น เติม 1.5% (v/v) HCl ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ลงในหลอดแรก ส่วนหลอดที่ 2 เติมสารละลาย diazo reagent (ส่วนประกอบอยู่ในภาคผนวก) ปริมาตรเท่ากัน ลงไปแทน ผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 นาที พอดี แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้หลอด

ที่ 1 เทียบเป็น blank ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ถือเป็นค่า O.D. 1 ต่อจากนั้น นำหลอดทดลองทั้ง 2 หลอด มาเติมเมธานอลปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร เหมือนกับครั้งแรก ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ใหม่นี้ถือเป็นค่า O.D. 2

หาปริมาณ direct bilirubin ในตัวอย่างพลาสมาจาก การหารค่า O.D. 1 ด้วย 2 แล้วนำค่าที่หารได้ไปเทียบเป็นปริมาณจากกราฟมาตรฐาน blirubin ความเข้มข้น 1, 2, 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร (mg/dL) ตามลำดับ ส่วน total bilirubin ได้จากการนำค่า O.D. 2 มาเทียบเป็นค่าปริมาณจากกราฟมาตรฐานโดยตรง

2.5.4 การหาปริมาณโปรตีน (Total Proteins)

ในวิธีการของ Biuret พันธะเปปไทด์ (peptide bond) ของโปรตีนจะจับกับ Cu^{++} เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีม่วงแดง ในสารละลายด่างซึ่งมี sodium potassium tartrate อยู่ด้วย ความเข้มของสีที่เกิดขึ้นวัดได้ที่ 540 นาโนเมตร และแปรตามปริมาณของพันธะเปปไทด์ที่มีอยู่ในตัวอย่าง (Doumas, 1978)

ขั้นตอนการทดลองประกอบด้วย นำหลอดทดลองมา 3 หลอด หลอดที่ 1 เติมน้ำกลั่น 0.05 มิลลิลิตร หลอดที่ 2 เติมสารละลายโปรตีน (albumin) ความเข้มข้น 7 g/dL ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร และหลอดที่ 3 เติมตัวอย่างพลาสมา 0.05 มิลลิลิตร หลังจากนั้น เติมสารละลาย Biuret (ส่วนประกอบอยู่ในภาคผนวก) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงไปในทุกหลอด ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้หลอดที่ 1 เทียบเป็น blank นำค่าการดูดกลืนแสงของหลอดตัวอย่างไปเทียบกับของหลอดโปรตีนมาตรฐาน เพื่อคำนวณเป็นปริมาณโปรตีนในตัวอย่างพลาสมาต่อไป

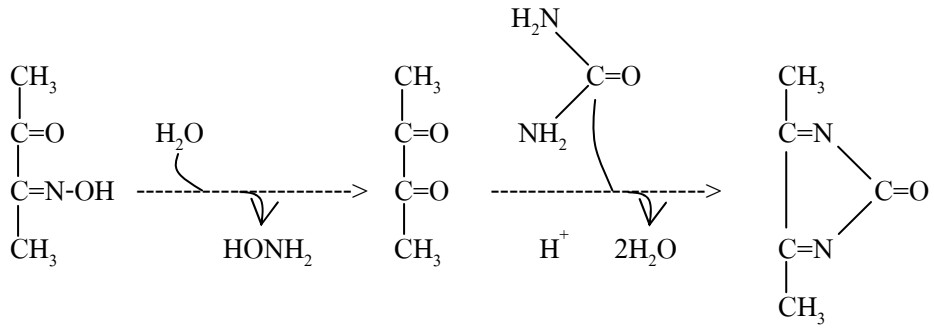
2.5.5 การหาปริมาณ Albumin

การทดสอบหาปริมาณ albumin ใช้สี bromcresol green ซึ่งสามารถจับจำเพาะกับโปรตีนชนิดนี้ได้ดีที่ pH 4.2 แล้วเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีฟ้า (Doumas, 1978) โดยนำหลอดทดลองมา 3 หลอด หลอดที่ 1 เติมน้ำกลั่น 0.01 มิลลิลิตร หลอดที่ 2 เติมสารละลาย albumin เข้มข้น 4 g/dL ปริมาตร 0.01 มิลลิลิตร และหลอดที่ 3 เติมตัวอย่างพลาสมา 0.01 มิลลิลิตร แล้วนำหลอดทดลองทั้งหมดมาเติมสารละลาย bromcresol green (ส่วนประกอบอยู่ในภาคผนวก) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร โดยใช้หลอดที่ 1

เทียบเป็น blank นำค่าการดูดกลืนแสงของหลอดพลาสมาไปเทียบกับของหลอด albumin มาตรฐาน เพื่อคำนวณเป็นปริมาณ albumin ในตัวอย่างพลาสมาต่อไป

2.5.6 การหาปริมาณ Blood Urea Nitrogen (BUN)

อาศัยหลักการคือ ยูเรีย (urea) รวมตัวกับหมู่ diacetyl ที่อุณหภูมิ 100 ^{0}ซ ในสภาวะที่เป็นกรด เกิดเป็นสารสีเหลืองแดงของ diazine derivative ซึ่งจะมีสีเข้มขึ้น เมื่อมี thiosemicarbazide อยู่ด้วย (Sampson and Baird, 1979) ดังสมการ



Diacetyl monoxime *Diacetyl* *Diazine derivative*

ทำการทดลองโดยนำหลอดทดลองมา 6 หลอด หลอดที่ 1 เติมน้ำกลั่น 0.05 มิลลิลิตร หลอดที่ 2, 3, 4 และ 5 เติมสารละลายยูเรียความเข้มข้น 3, 6, 12 และ 24 mg/dL ตามลำดับ ลงไปหลอดละ 0.05 มิลลิลิตร ส่วนหลอดที่ 6 เติมตัวอย่างพลาสมาปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย diacetylmonoxime (ส่วนประกอบอยู่ในภาคผนวก) 3 มิลลิลิตร และสารละลาย acid ferric chloride (ส่วนประกอบอยู่ในภาคผนวก) 2.5 มิลลิลิตร ตามลำดับ ลงไปในทุกหลอด ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที พอดี หลังจากแช่ในน้ำให้เย็นลง จึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร โดยใช้หลอดที่ 1 เทียบเป็น blank นำค่าการดูดกลืนแสงของยูเรียในหลอดที่ 2 ถึง 5 ไปสร้างกราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณยูเรียในหลอดพลาสมาต่อไป

2.5.7 การหาปริมาณ Creatinine

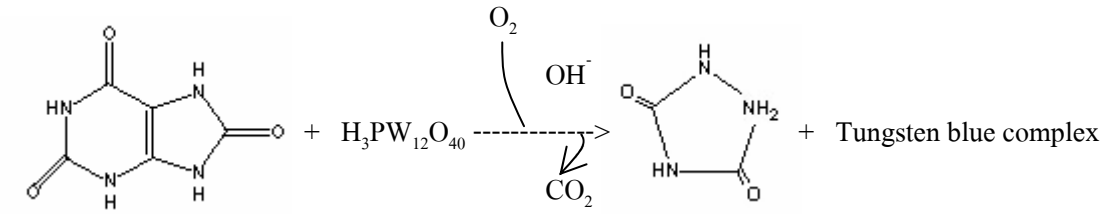
หาปริมาณ creatinine ในพลาสมาโดยอาศัย Jaffe's reaction กล่าวคือ creatinine ทำปฏิกิริยากับสารละลายเกลือ picrate ในด่าง ให้ creatinine picrate ซึ่งมีสีส้มแดงเกิดขึ้น (Jaffe, 1886)

ทำการทดลองโดยนำหลอดทดลองมา 6 หลอด หลอดที่ 1 เติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร หลอด

ที่ 2. 3. 4 และ 5 เติมสารละลาย creatinine เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (µg/ml) ปริมาตร 0.2, 0.6, 1 และ 2 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตร 1.8, 1.4, 1 และ 0 มิลลิลิตร ลงไป ตามลำดับ ส่วนหลอดที่ 6 ให้เติมสารละลาย protein free filtrate ซึ่งเตรียมจากตัวอย่างพลาสมาตามวิธีการที่ระบุอยู่ในภาคผนวก ปริมาตร 1 มิลลิลิตร หลังจากนั้น เติมสารละลาย 0.04 M picric acid ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และ 0.75 N NaOH ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงไปตามลำดับ ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร โดยใช้หลอดที่ 1 เทียบเป็น blank และนำค่าการดูดกลืนแสงของ creatinine ในหลอดที่ 2 ถึง 5 ซึ่งเทียบเป็นค่าปริมาณ creatinine ในพลาสมาได้ 1, 3, 5 และ 10 mg/dL ตามลำดับ ไปสร้างกราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณ creatinine ในหลอดพลาสมาต่อไป

2.5.8 การหาปริมาณ Uric Acid

อาศัยหลักการคือ uric acid สามารถทำปฏิกิริยากับเกลือ phosphotungstate ในสารละลายด่าง ได้สารประกอบสีน้ำเงิน (tungsten blue complex) (Hegazi, 2001) ดังสมการ

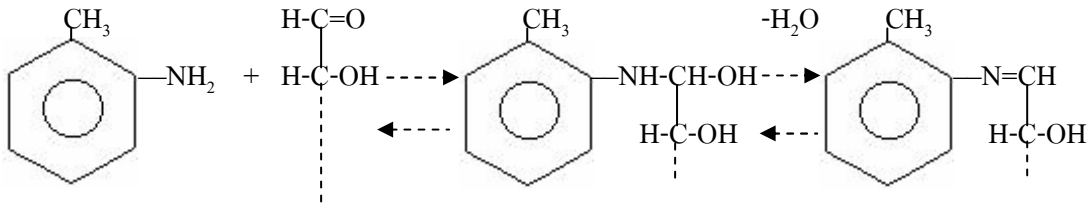


Uric acid *Phosphotungstic acid* *Allantoin*

นำหลอดทดลองมา 6 หลอด หลอดที่ 1 เติมน้ำกลั่น 1.5 มิลลิลิตร หลอดที่ 2, 3, 4 และ 5 เติมสารละลาย uric acid เข้มข้น 2 mg/dL ลงไป 0.15, 0.45, 0.75, และ 1.05 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตร 1.35, 1.05, 0.75 และ 0.45 มิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนหลอดที่ 6 เติมสารละลาย protein free filtrate ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำหลอดทดลองทั้งหมดมาเติมสารละลาย 14% (w/v) sodium carbonate ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร และสารละลาย working phosphotungstic acid (ส่วนประกอบอยู่ในภาคผนวก) ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ลงไปตามลำดับ ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 710 นาโนเมตร โดยใช้หลอดที่ 1 เทียบเป็น blank และนำค่าการดูดกลืนแสงของ uric acid ในหลอดที่ 2 ถึง 5 ซึ่งเทียบเป็นค่าปริมาณ uric acid ในพลาสมาได้ 2, 6, 10 และ 14 mg/dL ตามลำดับ ไปสร้างกราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณ uric acid ในหลอดพลาสมาต่อไป

2.5.9 การหาปริมาณน้ำตาล

หมู่ aldehyde ในโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคสสามารถควบแน่น (condense) กับสารกลุ่ม aromatic amines เช่น *o*-toluidine ในสารละลายกรด ที่อุณหภูมิสูง แล้วเกิดสารผสมของ glycosylamine และ Schiff 's base ซึ่งมีสีเขียว (Ceriotti, 1971) ดังสมการ

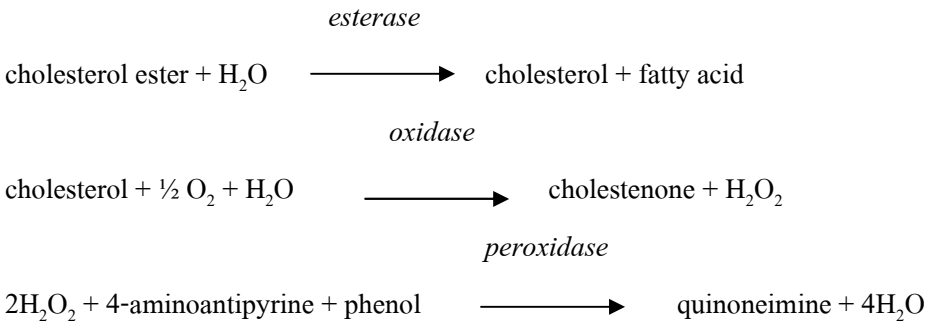


o-Toluidine *Glucose* *Glycosamine* *Schiff's base*

ทำการทดลองโดยนำหลอดทดลองมา 6 หลอด หลอดที่ 1 เติมน้ำกลั่น 20 ไมโครลิตร หลอดที่ 2, 3, 4 และ 5 เติมสารละลายกลูโคสที่มีความเข้มข้น 50, 100, 200 และ 400 mg/dL ตามลำดับ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และหลอดที่ 6 เติมตัวอย่างพลาสมาปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นนำหลอดทดลองทั้งหมดมาเติมสารละลาย *o*-toluidine (ส่วนประกอบอยู่ในภาคผนวก) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร แล้วต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที หลังจากนำไปแช่น้ำให้เย็นลง จึงวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร โดยใช้หลอดที่ 1 เทียบเป็น blank และนำค่าการดูดกลืนแสงของหลอดที่ 2 ถึง 5 ไปสร้างกราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณน้ำตาลในพลาสมาของหลอดที่ 6 ต่อไป

2.5.10 การหาปริมาณคอเลสเทอรอล (Total Cholesterol)

หาปริมาณคอเลสเทอรอลโดยรวม (total cholesterol) ในพลาสมาโดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูปของบริษัท CPT Diagnostics ซึ่งอาศัยปฏิกิริยาที่เร่งด้วยเอนไซม์ 3 ชนิด ได้ผลผลิตสุดท้ายคือ quinoneimine ซึ่งมีสีชมพู ดังแสดงข้างล่าง



ทำการทดลองโดยนำหลอดทดลองมา 3 หลอด หลอดที่ 1 เติมน้ำกลั่น 10 ไมโครลิตร หลอดที่ 2 (standard) เติมสารละลายคอเลสเทอรอล 200 mg/dL ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงไป ส่วนหลอดที่ 3 (sample) เติมตัวอย่างพลาสมาปริมาตร 10 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย cholesterol reagent ที่มาพร้อมกับชุดทดสอบลงไป 1 มิลลิลิตร (ประกอบด้วย Pipes 35 mM, sodium cholate 0.5 mM, phenol 28 mM, cholesterol esterase 200 units/L, cholesterol oxidase 100 units/L, peroxidase 800 units/L และ 4-aminoantipyrine 0.5 mM, pH 7.0) ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (O.D.) ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร โดยใช้หลอดที่ 1 เทียบเป็น blank คำนวณหาค่าปริมาณคอเลสเทอรอลโดยรวมในพลาสมา ได้จากสูตร

Total Cholesterol ในพลาสมา (mg/dL) = (O.D. sample ÷ O.D. standard) x 200

2.5.11 การหาปริมาณ Triglycerides

หาปริมาณ triglycerides ในพลาสมาโดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูปของบริษัท CPT Diagnostics ซึ่งอาศัยปฏิกิริยาที่เร่งด้วยเอนไซม์ 4 ชนิด ได้ผลผลิตสุดท้ายคือ quinoneimine ดังแสดงข้างล่าง

$$\text{triglycerides} + H_2O \xrightarrow{\textit{lipase}} \text{glycerol} + \text{fatty acids}$$

$$\text{glycerol} + \text{ATP} \xrightarrow{\textit{glycerol kinase}} \text{glycerol-3-P} + \text{ADP}$$

$$\text{glycerol-3-P} + O_2 \xrightarrow{\textit{glycerol-3-P-oxidase}} \text{dihydroxyacetone-P} + H_2O_2$$

$$2H_2O_2 + \text{4-aminoantipyrine} + \text{4-chlorophenol} \xrightarrow{\textit{peroxidase}} \text{quinoneimine} + 4H_2O$$

ทำการทดลองโดยนำหลอดทดลองมา 3 หลอด หลอดที่ 1 เติมน้ำกลั่น 10 ไมโครลิตร หลอดที่ 2 (standard) เติมสารละลาย glycerol 200 mg/dL ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงไป ส่วนหลอดที่ 3 (sample) เติมตัวอย่างพลาสมาปริมาตร 10 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย triglycerides reagent ที่มาพร้อมกับชุดทดสอบลงไป 1 มิลลิลิตร (ประกอบด้วย magnesium chloride 5 mM, PIPES 45 mM, 4-chlorophenol 6 mM, peroxidase 800 units/L, glycerol-3-phosphate oxidase 4,000 units/L, glycerol kinase 1,500 units/L, lipase 100,000 units/L, ATP 0.9

mM, 4-aminoantipyrine 0.75 mM, pH 7.0) ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร โดยใช้หลอดที่ 1 เทียบเป็น blank คำนวณหาค่าปริมาณ triglycerides ในพลาสมาได้จากสูตร

Triglycerides ในพลาสมา (mg/dL) = (O.D. sample ÷ O.D. standard) x 200

2.5.12 การหาปริมาณคอเลสเทอรอลในรูป High Density Lipoprotein (HDL-C)

หาปริมาณ HDL-C ในพลาสมาโดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูปของ บริษัท CPT Diagnostics ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนตกตะกอน VLDL และ LDL ด้วยสารละลาย phosphotungstate ที่มี Mg^{2+} อยู่ด้วย จากนั้นแยกเอาส่วนใส (supernate) ที่มี HDL อยู่ มาหาปริมาณคอเลสเทอรอลใน HDL โดยอาศัยหลักการเดียวกับการหาปริมาณคอเลสเทอรอลในหัวข้อ 2.5.10

ขั้นตอนแรก ทำการตกตะกอน LDL และ VLDL โดย นำหลอดทดลองมาเติมพลาสมาปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และสารละลาย HDL cholesterol precipitating reagent ที่มาพร้อมกับชุดทดสอบ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร (ประกอบด้วย 20% w/v polyethylene glycol 6000 ใน glycine buffer ที่ pH 10) ลงไป จากนั้นผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยรอบแรงเหวี่ยงที่ 2,000 x g เป็นเวลา 10 นาที จากนั้น แยกเฉพาะส่วนใสไปหาค่า HDL-C ต่อไป

ในการหาปริมาณ HDL-C ใช้วิธีการเดียวกันกับของคอเลสเทอรอลในหัวข้อ 2.5.10 เพียงแต่ในหลอดที่ 3 (sample) เป็นส่วนใสปริมาตร 20 ไมโครลิตร แทน พลาสมา 10 ไมโครลิตร คำนวณหาค่า HDL-C ในพลาสมาได้จากสูตร

HDL-C ในพลาสมา (mg/dL) = (O.D. sample ÷ O.D. standard) x 200

นอกจากนี้ ค่า HDL-C ที่หาได้นี้ ยังนำมาใช้คำนวณหาค่าปริมาณคอเลสเทอรอลในรูป low density lipoprotein (LDL-C) อีกด้วย (Stein, 1986) จากสูตร

LDL-C (mg/dL) = total cholesterol (mg/dL) – HDL-C (mg/dL) – triglycerides/5 (mg/dL)

2.5.13 การหาปริมาณ Na^+ และ K^+

ดำเนินการโดย หน่วยเคมีคลินิค ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ด้วยเครื่องหาปริมาณอิออนในสารละลายแบบอัตโนมัติ รุ่น CX-3 Delta ของ Beckman, USA โดยใช้ ion selective electrode ในการตรวจวัด

2.6 การทดสอบทางโลหิตวิทยา

นอกจากการหาระดับสารชีวเคมีต่าง ๆ ดังกล่าวข้างต้นแล้ว ยังดำเนินการตรวจวัดค่าเปอร์เซนต์เม็ดเลือดแดงอัดแน่น (% Hematocrit) รวมทั้งสัดส่วนเม็ดเลือดขาวแต่ละชนิด (% Differential WBC) ในตัวอย่างเลือดที่เก็บจากหนูทดลองแต่ละกลุ่มอีกด้วย

2.7 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

ข้อมูลทั้งหมดที่ได้แสดงค่าในรูปของ Mean ± S.E.M. และนำมาวิเคราะห์หาความแตกต่างทางสถิติโดยใช้ oneway ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (95% confidential) โดยใช้โปรแกรม SPSS for Window 11 (SPSS Inc., USA) จากนั้นจึงทำการทดสอบด้วย LSD test (Least Significant Difference Test) เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุม