บทที่ ๒

อุปกรณ์และวิธีทำการวิจัย

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

๒.๑ อุปกรณ์

๒.๑.๑ เคมีภัณฑ์

๒.๑.๑.๑ Ethinyl Estradiol (Sigma)

๒.๑.๑.๒ Norethindrone (Sigma)

๒.๑.๑.๓ Cholesterol (E.Merck)

๒.๑.๑.๔ Egg Lecithin (E.Merck)

๒.๑.๑.๕ Bovine Serum Alburmine (Sigma)

๒.๑.๑.๖ Disodium Hydrogen Phosphate ($Na_2HPo_4.7H_2o$) (Mallinckrodt)

๒.๑.๑.๗ Monosodium dihydrogen Phosphate ($NaH_2Po_4.H_2o$) (Carlo Erba)

๒.๑.๑.๘ N - Hexane (BDH)

๒.๑.๑.๙ Potassium Dichromate (May - Baker LTD)

๒.๑.๑.๑๐ Sulfuric acid (May - Baker LTD)

๒.๑.๑.๑๑ Absolute Alcohol (องค์การเภสัชกรรม)

๒.๑.๑.๑๒ Tridistilled Water (องค์การเภสัชกรรม)

๒.๑.๑.๑๓ Chloroform (BDH)

๒.๑.๒ เครื่องมือ

๒.๑.๒.๑ Surface Tensiometer (Biolar Coorporation)

๒.๑.๒.๒ Teflon Coated Trough and Movable Barrier (CAHN Instrument)

๒.๑.๒.๓ Agla Micrometer Syringe (Wellcome Reagent Limited)

๒.๑.๒.๔ Suction Pump (Tokyo Shibaura Electric Co.LTD.)

๒.๒ วิธีทำการวิจัย

๒.๒.๑ หาค่าแรงตึงผิวของน้ำกลั่น ๓ ครั้ง pH ประมาณ ๗.๔

๒.๒.๑.๑ เตรียมน้ำกลั่น ๓ ครั้ง pH ประมาณ ๗.๔ โดยใช้ Soresen Phosphate Buffer (๑๕)

๒.๒.๑.๒ วัดแรงตึงผิวของน้ำกลั่น ๓ ครั้งโดยวิธี Wilhelmy Plate Method

เครื่องมือ Surface Tensiometer จะมี Torsion balance และมี Platinum blade แขวนติดอยู่ น้ำที่ต้องการจะวัดแรงตึงผิวจะอยู่ในถาดที่เคลือบด้วย Teflon ซึ่งถาดนี้สามารถเปลี่ยนแปลงพื้นที่ของผิวหน้าได้ตามต้องการโดยมีสเกลที่มีหน่วยเป็นเซนติเมตรติดอยู่ ความยาว ๑๐ เซนติเมตร คิดเป็นพื้นที่ของผิวหน้า ๑๐๐ % Platinum blade จะจุ่มอยู่ในน้ำโดยขอบบนจะอยู่ใต้ผิวน้ำพอดี ตั้งให้เข็มที่หน้าปัดของ Surface Tensiometer อยู่ตรงขีดที่กำหนดไว้ ณจุดนี้ค่าที่บอกแรงตึงผิวของน้ำจะต้องปรับให้อยู่ที่ศูนย์เช่นกัน เมื่อเตรียมเครื่องมือให้อยู่ในสภาพเรียบร้อยอังกล่าวแล้วก็เริ่มวัดแรงตึงผิวของน้ำ โดยการค่อย ๆ เพิ่มค่าที่หน้าปัดของเครื่องที่ตั้งต้นไว้ที่จุดศูนย์ ซึ่งการเพิ่มค่านี้ก็คือการค่อย ๆ ยก Platinum blade ขึ้นมาจากน้ำ จะเพิ่มค่าที่หน้าปัดไปเรื่อย ๆ จนกระทั่งขอบบนของ Platinum blade ถูกยกขึ้นเหนือผิวน้ำ ณจุดนี้ค่าที่อ่านได้จากหน้าปัดก็จะเป็นค่าแรงตึงผิวของน้ำที่มีหน่วยเป็น มิลลิกรัม เมื่อคูณด้วย ๐.๑๙๘ ก็จะได้ค่าที่วัดมีหน่วยเป็นดายน์ต่อเซนติเมตร

๒.๒.๒ การสร้างเนื้อเยื่อเซลเทียมบนน้ำกลั่น ๓ ครั้ง pH ประมาณ ๗.๔

๒.๒.๒.๑ สร้างจาก Lecithin

ละลาย Egg Lecithin 10 มิลลิกรัมใน Hexane 250 มิลลิลิตร

ต้องใช้สารละลาย Egg Lecithin 0.134435 มิลลิลิตร จึงจะทำให้ Egg Lecithin สร้างเป็นเนื้อเยื่อเซลเทียมกระจายตัวเต็มถาดพอดี (๔๑)

สร้างเนื้อเยื่อเซลเทียมโดยใส่น้ำกลั่น pH ประมาณ ๗.๔ ลงในถาดให้เต็มพอดี แล้วหยดสารละลาย Egg Lecithin 0.134435 มิลลิลิตร (คิดเป็น ๔ ส่วน) ด้วย Agla Microsyringe ลงบนน้ำกลั่นขณะที่หยด Platenum blade จะต้องอยู่ใต้ผิวน้ำทิ้งไว้ประมาณ ๑๕ นาทีเพื่อให้ Hexane ระเหยออกไปให้หมดและ Egg Lecithin เรียงตัวเป็นระเบียบดี ค่อย ๆ ลดพื้นที่ผิวบนถาดด้วย Movable Barrier ซึ่งแต่ละพื้นที่ก็วัดค่าแรงตึงผิวไว้ (π) จะลดพื้นที่ผิวไปเรื่อย ๆ จนกระทั่งแรงตึงผิวมีค่าต่ำสุด

นำค่าความดันผิวและพื้นที่มาสร้างเป็น π-Area curve

๒.๒.๒.๒ สร้างจาก Cholesterol.

ละลาย Cholesterol 5 มิลลิกรัมใน n-Hexane 125 มิลลิลิตร ใช้สารละลาย 0.0975175 มิลลิลิตร(๔ ส่วน) จะเรียงตัวเต็มถาดพอดี (๔๑) ดำเนินการเช่นเดียวกับข้อ ๒.๒.๒.๑

๒.๒.๒.๓ สร้างจาก Egg Lecithin และ Cholesterol

ดำเนินการเช่นเดียวกับข้อ ๒.๒.๒.๑, ๒.๒.๒.๒ โดยใช้อัตราส่วนแตกต่างกันไป Egg Lecithin:Cholesterol = 4:0, 3:1, 2:2 และ 1:3

๒.๒.๒.๔ สร้างจาก Egg Lecithin, Cholesterol และBovine serum albumin.

ละลาย Bovine Serume albumin 5 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น ๓ ครั้ง ๑๒๕ มิลลิลิตร ใช้สารละลาย ๐.๑๕๒ มิลลิลิตร จะเรียงตัวเต็มถาดพอดี (คิดเป็น ๔ ส่วน) (๔๑)

ดำเนินการเช่นเดียวกับข้อ ๒.๒.๒.๓ แต่เพิ่ม Bovine Serume Albumine ลงไป ๔ ส่วนในทุกสัดส่วน

Egg Lecithin:Cholesterol:Bovine serume albumin = 4:0:4, 3:1:4, 2:2:4,และ 1:3:4

๒.๒.๓ ศึกษาปฏิกริยาของ Eithinyl estradiol และ Norethindrone กับเนื้อเยื่อเซลเทียม

๒.๒.๓.๑ ปฏิกริยาของ Eithinyl estradiol

เตรียม Ethinyl estradiol 5 มิลลิกรัม ละลายใน Absolute Alcohol 0.1 มิลลิลิตร แล้วเติม n-Hexane 7.9 มิลลิลิตร ปริมาณ Ethinyl estradiol ที่ใช้ศึกษาปฏิกริยา ๒๐, ๓๐, ๕๐, ๘๐ และ ๑๐๐ ไมโครกรัม

สร้างเนื้อเยื่อเซลเทียมตามข้อ ๒.๒.๒.๓ และ ๒.๒.๒.๔ แล้วหยด Ethinyl estradiol แต่ละปริมาณลงไป วัดแรงตึงผิวในแต่ละพื้นที่ที่เปลี่ยนแปลงไป นำมาสร้างเป็น π -Area curve เปรียบเทียบกัน π -Area curve ของเนื้อเยื่อเซลเทียมที่ไม่มี Ethinyl estradiol

๒.๒.๓.๒ ปฏิกริยาของ Norethindrone

เตรียม Norethindrone 50 มิลลิกรัม ละลายใน Chloroform 6 มิลลิลิตร ปริมาณ Norethindrone ที่ใช้ศึกษาคือ ๐.๕, ๑, และ ๒ มิลลิกรัม

ดำเนินการเช่นเดียวกับ ๒.๒.๓.๑ โดยใช้ Norethindrone แทน Ethinyl estradiol

๒.๒.๓.๓ ปฏิกริยาของ Ethinyl estradiol และ Norethindrone

สร้างเนื้อเยื่อเซลเทียมตามข้อ ๒.๒.๒.๓ และ ๒.๒.๒.๔ แล้วหยด Ethinyl estradiol 35 ไมโครกรัม กับ Norethindrone 0.5 มิลลิกรัม และ Ethinyl estradiol 35 ไมโครกรัม Norethindrone 1 มิลลิกรัม วัดแรงตึงผิวในแต่ละพื้นที่ที่เปลี่ยนแปลงไปนำมาสร้าง π -Area curve

I16441369.

- เครื่องมือเครื่องใช้ต่าง ๆ ในการทดลองต้องให้สะอาดที่สุด เครื่องแก้วทุกชนิดจะล้างให้สะอาดแล้วแช่ใน Chromic acid อย่างต่ำ ๑๒ ชั่วโมง แล้วนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นประมาณ ๖ ครั้ง

- ตรวจสอบความสะอาดบนผิวน้ำทุกครั้งก่อนที่จะสร้าง เนื้อเยื่อ เซล เทียม โดยการวัดแรงตึงผิวในพื้นที่ ๑๐๐%, ๕๐%, ๓๐% ถ้าได้เท่ากันตลอดแสดงว่าผิวน้ำบริสุทธิ์ ถ้าได้แตกต่างกันต้อง เตรียมใหม่ ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารละลายที่ใช้ โดยหยดสารละลาย ๐.๒ มิลลิลิตร ทิ้งไว้ประมาณ ๑๕-๒๐ นาที แล้ววัดแรงตึงผิวที่พื้นที่ต่าง ๆ ถ้าบริสุทธิจะไม่มีความแตกต่างกัน

- ค่าแรงตึงผิวในแต่ละพื้นที่ต้องอ่านด้วยความรวดเร็ว ใช้เวลาประมาณ ๓๐ วินาที

- การวิจัยนี้ทำในห้องทดลองอุณหภูมิ ๒๗ $\pm$ ๒ องศา เซน เซียส