

วัสดุที่ใช้

๑. สารเคมี

๑.๑ สารเคมีที่ใช้ในการแยกกรดอะมิโน คือ.-

Methylcellosolve

Thiodiglycol

Brij 35

Acetate buffer 4 N. pH 5.5

Ninhydrin & Hydrindantin

Chromo - Beads Type B

18 Standard amino acids

ทั้งหมดนี้มาจาก Technicon Chemical Company, Chauncey, N.Y., U.S.A.

๑.๒ สารเคมีที่ใช้ในการหาปริมาณโปรตีน คือ.-

Calibrate ใช้ในการทำกราฟมาตรฐาน ใช้ของ Warner-Lambert Company, U.S.A.

ส่วนสารเคมีอื่นที่ใช้ในการหาปริมาณโปรตีน คือ.-

Sodium tartrate, Sodium hydroxide, Copper sulfate, 5 H₂O

Potassium Iodide จาก Mallinckrod Chem. Work St. Louis, N.Y., U.S.A.

๑.๓ สารเคมีที่ใช้หา Tryptophan คือ

Standard tryptophan จาก Technicon Chemical Company, Chauncey
N.Y., U.S.A.

H₂SO₄ จาก J.T. Baker Chemical

Formaldehyde, H₂O₂, Trichloroacetic acid จาก E. Merck -

Damstadt, W. Germany

๒. เครื่องมือ

- ๒.๑ Electric Micro hematocrit Centrifuge speed 17,000 rpm. ของ International Equipment Company (IEC) Mass., U.S.A.
- ๒.๒ Hematocrit Reader ของ International Equipment Co., (IEC) Mass., U.S.A.
- ๒.๓ Water bath ของ Elconap Laboratory Apparatus, U.S.A.
- ๒.๔ Sorvall RC2-B Refrigerated Centrifuge ของ Ivan Sorvall Inc., Illinois, U.S.A.
- ๒.๕ Coleman Junior II Spectrophotometer Model 6/20 Coleman Instruments Co., Illinois, U.S.A.
- ๒.๖ Amino Acid Autoanalyzer ของ Technicon Chemical Co., Chauncey, N.Y., U.S.A.
- ๒.๗ Aminco - Keirs Spectrophotometer ของ American Instrument Co., Silver Spring, Maryland, U.S.A.

๓. เลือกที่ใช้ในการทดลอง

๓.๑ เลือกของหญิงปกติและชายปกติ ได้จากนักวิทยาศาสตร์และข้าราชการของหน่วยปฏิบัติการวิจัย คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี ชาย ๘ คน หญิง ๗ คน คนกลุ่มนี้มีอายุระหว่าง ๑๘ - ๓๒ ปี มีความเป็นอยู่ปานกลาง มีเงินเดือนระหว่าง ๗๕๐ - ๑,๗๕๐ บาทต่อเดือน (เฉลี่ย ๑,๐๐๐ บาทต่อเดือน) คนกลุ่มนี้ไม่มีประวัติของการเป็นโรคเรื้อรังหรือเป็นโรคเกี่ยวกับทางเลือกแต่อย่างใด

๓.๒ เลือกของหญิงตั้งครรภ์ปกติ ตั้งแต่ ๑ - ๕ เดือน ในกรุงเทพฯ ได้จากหญิงที่มาฝากครรภ์ปกติที่แผนกสูติ-นรีเวชวิทยา ของคณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี คนกลุ่มนี้เลือกมาจากคนท้องปกติที่ไม่มีอาการของครรภ์เป็นพิษ หรือเป็นโรคอื่น ๆ ในระยะตั้งครรภ์ คนกลุ่มนี้มีความเป็นอยู่ปานกลางไม่ขาดแคลนอาหารที่รับประทาน และมีอายุระหว่าง ๑๖ - ๓๕ ปี มีเงินเดือนระหว่าง ๗๕๐ - ๒,๐๐๐ บาทต่อเดือน (เฉลี่ย ๑,๑๐๐ บาทต่อเดือน)

๓.๓ เลือดของหญิงตั้งครรภ์ปกติ ตั้งแต่ ๑ - ๕ เดือน ที่จังหวัดอุบลราชธานี

ได้จากหญิงตั้งครรภ์ปกติที่มาจากครรภ์ที่โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จังหวัดอุบลราชธานี
คนกลุ่มนี้อยู่ตามชนบทนอกเมืองออกไป อาหารที่รับประทานส่วนใหญ่จะเป็นพวก ข้าวเหนียว -
ปลาร้า และผักต่างๆตามฤดูกาล อาหารเนื้อสัตว์ที่รับประทานโดยมากจะเป็น ปลา น้ำจืด,
กบ และเขียด เป็นต้น ส่วนพวกเนื้อวัว, เนื้อหมู, ปลาน้ำเค็ม, ไก่, ไข่ ฯลฯ ที่คนภาคกลาง
รับประทานกันเป็นประจำนั้นคนกลุ่มนี้จึงจะได้รับประทานเสียที่ ประมาณเดือนละ สองถึง
สามครั้ง ถ้าได้เข้าเมือง อาหารส่วนใหญ่ของคนกลุ่มนี้ คือ ทำนามีรายได้ไม่แน่นอน

๔. น้ำยาที่ใช้ในการทดลอง

๔.๑ น้ำยาที่ใช้ในการทดลองหาปริมาณโปรตีน

Biuret Reagent

Na,K tartrate	9.0	gm
0.2N NaOH	400.0	ml
CuSO ₄ 5H ₂ O	3.0	gm
KI	5.0	

สารละลายนี้ทำให้เป็น ๑ ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

Serum Blank

Na,K tartrate	9.0	gm
KI	5.0	gm

สารละลายนี้ทำให้เป็น ๑ ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

๔.๒ น้ำยาที่ใช้แยกกรดอะมิโน

น้ำยา pH 2.875, 3.1, 3.8

Sod. citrate 2H ₂ O	14.71	gm
Dist. Water	900.0	ml

2N NaOH	25.00	ml
Thiodiglycol	5.0	ml
Brij - 35 30% solution	10.0	ml

เตรียมน้ำยาให้ได้ pH ตามกำหนดด้วย 6N HCl แล้วจึงผสมน้ำยาให้เป็น ๑ ลิตร ด้วยน้ำกลั่น
น้ำยา pH 5.0

Sod. citrate 2H ₂ O	14.71	ml
Dist. Water	900.0	ml
2N NaOH	25.0	ml
NaCl	35.07	gm
Brij - 35 30% solution	10.0	ml

เตรียมให้เป็น pH 5.0 ด้วย 6N HCl แล้วทำให้เป็น ๑ ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

Stock Ninhydrin Reagent

Ninhydrin	20.00	gm
Hydrindantin	1.5	gm
Methyl cellosolve	650.0	ml
4N Sod. acetate buffer	350.0	ml

วิธีเตรียม

ใช้ภาชนะสีขาวในการเตรียม โดยละลาย Hydrindantin ลงใน Methyl - cellosolve เมื่อละลายหมดแล้วจึงเติม Ninhydrin ลงไป คนให้ละลาย ต่อจากนั้นจึง แทนที่อากาศในขวดด้วยแก๊สไนโตรเจนประมาณ ๑๕ นาที หลังจากนั้นจึงใส่ 4N Sodium - acetate buffer ลงไป ๓๕๐ มล. คนให้เข้ากันแล้วผ่านแก๊สไนโตรเจนลงไปอีกนานประมาณ ๑๕ นาที แล้วปัดจุกให้แน่นใ้หน้ายาในขวดอยู่ในบรรยากาศของแก๊สไนโตรเจน และต้องเก็บในที่มืดด้วย น้ำยาที่ผ่านเก็บไว้ใช้ได้ไม่นานไม่เกิน ๑ อาทิตย์

Working Ninhydrin Reagent

ผสม ๕๐% Methylcellosolve ๑ ส่วนกับ Stock ninhydrin ๑ ส่วน
ผ่านแก๊สไนโตรเจนประมาณ ๓๐ นาที ก่อนใช้

Buffer gradient สำหรับ Column ขนาด ๑๒๗ คูณ ๐.๖ มม.

<u>Chamber</u>	<u>Buffer pH 2.875</u>	<u>pH 3.8</u>	<u>pH 5.0</u>
	(ml)	(ml)	(ml)
1	75	0	0
2	75	0	0
3	75	0	0
4	75	0	0
5	0	70	5
6	6	9	60
7	0	0	75
8	0	0	75
9	0	0	75

๔.๓ น้ำยาสำหรับตรวจหา Tryptophan

10% Trichloacetic acid

5% H₂O₂ ซึ่งทำให้เจือจางด้วย Deionized water (เก็บใช้ไ้ภายในหนึ่งอาทิตย์)

19% Formaldehyde ซึ่งทำให้เจือจางด้วย Deionized water

0.2N H₂SO₄ (ต้องใช้ของบริษั้เดียวกันตลอดการทดลอง และต้องเป็น H₂SO₄ ที่
ได้เลือกทดลองมาแล้วว่าให้ผลดีที่สุด)