บทที่ 4

สรุปผลและวิจารณ์

การใช้ TLC ในการแยก phospholipids คือ phosphathidyl ethanolamine phosphathidyl serine phosphathidyl inositol phophathidyl choline shphingomyelin lysolecithin ด้วยระบบสารละลาย chloroform : methanol : acetic acid : น้ำในอัตราส่วน 65: 30 : 4 : 2 สามารถแยก phospholipids ทั้ง 6 ชนิด ซึ่งอาจจะเป็นส่วนประกอบในน้ำคร่ำได้ดี (ข้อ 3.1 หน้า)

กราฟมาตรฐานของ lecithin และ sphingomyelin เป็นเส้นตรง เมื่อมีความเข้มข้น 1–5 ไมโครกรัม แสดงว่าในช่วงความเข้มข้นนี้จะอ่านได้ถูกต้องกว่าช่วงอื่น และในช่วงนี้ พื้นที่ใต้กราฟของ lecithin และ sphingomyelin เมื่อวัดจากเครื่อง densitometer จะมีค่าใกล้เคียงกันมาก และจะมีค่าต่างกันเมื่อความเข้มข้นมากกว่า 5 ไมโครกรัมขึ้นไป กราฟมาตรฐานของ lecithin และ sphingomyelin ที่มีความเข้มข้น 5 ถึง 40 ไมโครกรัม จะเป็นเส้นโค้งทั้งนี้อาจเนื่องจากความเข้มข้นของ lecithin และ sphingomyelin มีมากเกินกว่าประสิทธิภาพของเครื่องที่จะนับได้ และเมื่อเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างอัตราส่วน L/S ด้วยวิธีเทียบอัตราส่วน น้ำหนัก/น้ำหนักของสารละลาย lecithin และ sphingomyelin มาตรฐานกับวิธีที่วัดพื้นที่ใต้กราฟของ lecithin และ sphingomyelin โดยเครื่อง densitometer พบว่า จะได้กราฟเป็นเส้นตรงเมื่ออัตราส่วน L/S มีค่าระหว่าง 0.5–2 :1 และจะเริ่มเป็นเส้นโค้งเมื่อมีอัตราส่วน 3 :1 ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเมื่ออัตราส่วน L/S สูงขึ้น lecithin ที่ spot มีความแตกต่างจาก sphingomyelin มาก

คือเป็น 3 เท่า และ 4 เท่าของ sphingomyelin และมีความเข้มข้นสูง 30 และ 40 ไมโครกรัมตามลำดับ ซึ่ง lecithin ที่มีความเข้มข้นนี้จะอยู่ในช่วงที่เป็นเส้นโค้ง ในขณะที่ sphingomyelin ในช่วงนี้เป็นเส้นตรงทำให้อัตราส่วน L/S ที่ได้ในช่วงนี้มีค่าต่ำกว่าที่เป็นจริง ผลการทดลองนี้สนับสนุนโดยรายงานของ Mallikarjuneswara (1975) ซึ่งได้กราฟมาตรฐานอัตราส่วน L/S เป็นเส้นตรงถึงอัตราส่วน L/S มีค่า 2 : 1

ความแม่นยำของวิธีทดลองทั้งในการทดลองเดียวกัน และระหว่างการทดลอง (ตารางที่ 1, 2 หน้า) ของน้ำคร่ำที่มีค่า L/S สูงปานกลาง มีค่า cafficient of variation ต่างกันเล็กน้อย และอยู่ในช่วงที่มีความเชื่อถือได้ (P 0.5) และพบว่าความถูกต้องของวิธีทดลองมีมาก เมื่อปริมาณของ lecithin และ sphingomyelin มีค่าต่ำ 10 และ 5 ไมโครกรัม และความถูกต้องของวิธีจะลดลง เมื่อปริมาณของ lecithin และ sphingomyelin ที่ใส่ในตัวอย่างสูงขึ้นถึง 20 และ 10 ไมโครกรัม ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเมื่อเติม lecithin และ sphingomyelin จำนวนมากลงไป ค่าที่วัดได้จะอยู่ในช่วงที่กราฟเป็นเส้นโค้ง เมื่อเปรียบกับ lecithin และ sphingomyelin ที่ได้จากน้ำคร่ำตัวอย่างด้วยวิธีคำนวณในข้อ 2.10 จะได้ผลลบซึ่งเป็นค่าของ lecithin และ sphingomyelin ที่เติมต่ำ ทำให้ได้ค่า recovery ที่คำนวณได้ต่ำกว่าที่ควรจะเป็น และต่ำกว่าเมื่อเติม lecithin และ sphingomyelin จำนวนน้อย คือ 10 และ 5 ไมโครกรัม ลงในน้ำคร่ำตัวอย่าง

โดยปกติแล้วการหาอัตราส่วน L/S ในน้ำคร่ำ จะต้องทำการทดลองทันทีที่ได้รับตัวอย่าง แต่บางครั้งไม่สามารถทำการทดลองตัวอย่างได้ทันที และบางกรณีต้องทำการทดลองซ้ำ จึงมีความจำเป็นต้องเก็บสารตัวอย่างไว้ทำการทดลองในวันถัดไป จากผลการทดลองในตารางที่ 1 แสดงผลการหาความแตกต่างของวิธีที่เก็บสารตัวอย่างสองวิธีคือ เก็บน้ำคร่ำไว้ที่ –20 องศาเซลเซียส และเก็บโดยใส่ 10% EDTA

และเก็บไว้ที่ –10 องศาเซลเซียส 7 วัน เปรียบเทียบกับผลการทดลองที่ทำทันที พบว่าทั้งสามวิธีนี้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เมื่อทำการทดลองเปรียบเทียบอัตราส่วน L/S กับระยะเวลาของการเก็บน้ำครำ พบว่าการเก็บน้ำครำไว้ที่อุณหภูมิห้องอัตราส่วนของ L/S จะลดต่ำลงร้อยละ 40.6 เมื่อเก็บสารตัวอย่างไว้นาน 24 ชั่วโมง ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 2 การที่อัตราส่วน L/S ลดลงนี้ Verder และ Clausen (1974) กล่าวว่าเพราะมี enzyme phospholipase ซึ่งอยู่ในน้ำครำซึ่งจะย่อย (deacylate) phosphatidylcholine ให้เป็น phosphatidyl ethanolamine (PE) Armstrong และ Wormer (1972) แนะนำว่าถ้าเก็บน้ำครำไว้ที่อุณหภูมิต่ำก็สามารถยับยั้งการทำงานของ enzyme นี้ได้ หรืออาจจะเติมสารเคมีที่สามารถยับยั้งการทำงานของ enzyme นี้ได้เช่นเดียวกับสารเคมีใช้กันมากเพื่อยับยั้งการทำงานของ enzyme ได้แก่ EDTA ซึ่ง EDTA นี้จะจับกับ Ca^{+2} ซึ่งเป็น cofactor ของ enzyme นี้ ทำให้ phospholipase ไม่สามารถย่อย phosphatidylcholine ให้เป็น phosphatidyl ethanolamine จึงทำให้สามารถเก็บสารตัวอย่างน้ำครำไว้ได้นาน และจากผลการทดลองการเก็บตัวอย่างน้ำครำในตารางที่ 2 พบว่าน้ำครำที่ถูกเก็บไว้โดยการเติม EDTA และเก็บไว้ที่ –20 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 60 วัน จะให้ผลการทดลองเช่นเดียวกัน คือไม่ทำให้อัตราส่วนของ L/S ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ จึงเก็บสารตัวอย่างไว้ที่ –20 องศาเซลเซียส ในกรณีที่ไม่สามารถทำการทดลองได้ทันที ซึ่งการเก็บสารตัวอย่างไว้ที่ –20 องศาเซลเซียสเป็นวิธีที่สะดวก และง่ายกว่าการเตรียมสารเคมีที่ใช้เติมลงในสารตัวอย่าง เพื่อยับยั้งการทำงานของ enzyme

Nelson ในปี 1972 รายงานว่าอัตราส่วน L/S ที่ได้จากวิธีการทดลองต่างกันจะได้ค่าอัตราส่วน L/S ต่างกันด้วย ทำให้ค่าปกติซึ่งแปลผลว่าเป็นค่าที่ทารกมีปอดเจริญสมบูรณ์ (mature) มีค่าต่างกันไปในแต่ละวิธี และไม่เหมาะที่จะนำค่า L/S ปกติใช้ร่วมกันได้ ทั้งนี้เพราะขึ้นอยู่กับวิธีการเตรียมสารตัวอย่างน้ำครำก่อนที่จะนำมาสกัดหา

L/S ต่างกัน Wagstaff (1974) ได้ทำการทดลองโดยการกรองน้ำคร่ำด้วยกระดาษกรอง และ Glson และคณะ (1975) ได้ใช้วิธีตั้งน้ำคร่ำไว้ให้ตกตะกอน และนำส่วนใสไปหาอัตราส่วน L/S ให้ค่าปกติเป็น 3.5 ด้วยเหตุนี้วิทยานิพนธ์นี้จึงได้ทำการทดลองหาแรงปั่นที่เหมาะสมในการเตรียมน้ำคร่ำตัวอย่างเพื่อสกัดหา L/S ด้วย จากผลการทดลองหาอัตราส่วน L/S ในน้ำคร่ำ 25 ตัวอย่าง ซึ่งมีอายุครรภ์ระหว่าง 37–41 สัปดาห์ พบว่าค่าเฉลี่ยของ L/S ที่ได้เมื่อปั่นด้วยแรง 350xg, 600xg และ 1400xg เมื่อนำมาหาความแตกต่างทางสถิติโดยแบ่งข้อมูลเป็นกลุ่ม พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากกลุ่มที่ 4.0–5.0 (ตารางที่ 9) เป็นที่น่าสังเกตุว่าน้ำคร่ำที่ทำการทดลองมีค่า L/S แตกต่างกันมาก คือมีค่าอยู่ระหว่าง 2.0–8.0 และในแต่ละตัวอย่างยังมีสิ่งเจือปนไม่เหมือนกัน และในสัดส่วนที่ไม่เท่ากันด้วย ทำให้ความผิดพลาดในกลุ่มตัวอย่างเองมีสูงอยู่แล้ว เมื่อเทียบกับความผิดพลาดในวิธีการปั่น จึงอาจเป็นสาเหตุให้อัตราส่วน L/S ที่ได้ จึงพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ อีกประการหนึ่งแรงปั่นในช่วง 350xg ถึง 700xg เป็นช่วงที่พบว่าอัตราส่วน L/S มีความแม่นยำน้อย (low precision) และจะพบว่าแรงปั่นที่ 3000xg ขึ้นไปจะไม่ทำให้อัตราส่วน L/S ที่คงที่มีความปรวนแปรน้อย (Cherayil 1977) และ – การทดลองไม่สามารถใช้ตัวอย่างเดียวกันแบ่งเป็นหลาย ๆ ส่วนเพื่อทดสอบหลายครั้ง เนื่องจากปริมาณตัวอย่างในแต่ละครั้งมีจำนวนน้อย อนึ่งการทดลองแรงปั่นต้องทำการทดลองทันที จึงไม่สามารถทำโดยการรวมตัวอย่างหลาย ๆ ตัวอย่างเข้าด้วยกัน Cherayil (1977) พบว่าอัตราส่วนที่ได้ผลถูกต้องมากที่สุด เมื่อใช้ปั่นด้วยแรงปั่นแยกที่สูงกว่า 2800xg เป็นเวลา 10 นาที แต่การทดลองในวิทยานิพนธ์นี้ เมื่อใช้แรงในการปั่นแยก 1400xg เป็นเวลา 15 นาที ซึ่งเป็นแรงปั่นสูงสุดของเครื่องปั่นแยกที่มีอยู่ในห้องทดลองซึ่งสามารถจะใช้ได้ พบว่าอัตราส่วน L/S ที่วัดได้ จะให้ค่าสอดคล้องกับผลทางคลินิค การทดลองครั้งต่อ ๆ ไปจึงอนุโลมใช้แรงปั่นในการแยกสารออกจากตัวอย่างน้ำคร่ำ 1400xg ในการหาค่า L/S เมื่อต้องการดูผลเปรียบเทียบกับผลทางคลินิค

จากผลการทดลองหาอัตราส่วน L/S โดยการตกตะกอนด้วย acetone ที่ 0 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับ L/S ที่ไม่ได้ตกตะกอนด้วย acetone จาก 52 ตัวอย่าง ซึ่งมีอายุครรภ์ระหว่าง 24 ถึง 42 สัปดาห์ พบว่าอัตราส่วนของ L/S ทั้งสองวิธีมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < .001$) (ตารางที่ 10) เมื่อคำนวณจากอัตราส่วนของ L/S ในช่วงความเข้มข้นต่าง ๆ คือ ตั้งแต่ 0–2.1, 2.1–4.0, 4.1–6.0, 6.1–8.0 พบว่าอัตราส่วน L/S 0–2.0 จะไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 11) ทั้งนี้เพราะบางตัวอย่างอาจมีทั้ง lecithin ที่มาจากส่วนอื่นด้วย และ lecithin ที่เป็น surfactant ในปอดปนอยู่ด้วย (Gluck 1971) ดังนั้นเมื่อตกตะกอนด้วย acetone ที่ 0 องศาเซลเซียส จะให้ผล L/S แน่ชัด และถูกต้องกว่าดังจะเห็นได้จากตัวอย่าง 4, 6 และ 7 ตารางที่ 10 เมื่อใช้ค่า L/S เท่ากับ 2 เป็นค่าปกติตาม Gluck (1974) อัตราส่วน L/S ที่ได้โดยไม่ตกตะกอนพบว่าจะเท่ากับ 2.1, 2.38 และ 2.4 ตามลำดับ ซึ่งแปลผลว่าทารกสมบูรณ์ดี (mature) แต่เมื่อเทียบผลกับทางคลินิคพบว่า ตัวอย่างที่ 4 และ 6 ทารกที่แรกเกิดเป็น RDS และในตัวอย่างที่ 7 ทารกแรกเกิดมีอาการ RDS เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และหลังจากนั้นมีอาการดีขึ้น เมื่อพิจารณาอัตราส่วน L/S ของตัวอย่างที่ 4, 6 และ 7 ที่ตกตะกอนด้วย acetone พบว่าได้ค่า 1.0, 1.5 และ 1.8 ตามลำดับ ซึ่งแปลผลทารกมีปอดไม่สมบูรณ์ 2 ราย และอยู่ในระหว่างกลาง 1 ราย สอดคล้องกับผลทางคลินิค การทดลองนี้ได้ผลเช่นเดียวกับผลทดลองของ Armstrong และ Van Wormer (1972) จากผลการทดลอง 52 ตัวอย่างพบว่าอัตราส่วน L/S ที่ได้โดยไม่ตกตะกอนผิดพลาด 3 ราย ส่วนอัตราส่วน L/S ที่ได้จากการตกตะกอน acetone นั้นให้ผลสอดคล้องกับผลทางคลินิคทั้ง 52 ราย มีผู้ทำการทดลองตัดขั้นตอนของการทดลองให้สั้นลง โดยการตัดการตกตะกอนด้วย acetone ออก (Blass และ Drasisey 1973) (Sakozi 1972) (Mallikanjuneswara 1975) แต่จากการทดลองพบว่า วิธีตกตะกอนด้วย acetone ยังไม่พบว่ามีข้อผิดพลาด ฉะนั้นเพื่อลดข้อผิดพลาดที่จะเกิดขึ้น และให้ผลที่ได้ถูกต้องมากที่สุด จึงใช้วิธีตกตะกอนด้วย acetone เป็นวิธีที่ใช้ในการหาอัตราส่วน L/S ในน้ำคร่ำ

การเลือกใช้สารที่ทำให้เกิดสีกับ lecithin และ sphimgomyelin โดยวิธี TLC เพื่อหาอัตราส่วน L/S มีอยู่หลายวิธีด้วยกัน (Olson และ Graven 1974) Gluck และ Kulovide (1971) พบว่าวิธีที่ดีให้จุดที่เห็นชัด และให้ผลถูกต้องมากที่สุดคือการพ่นด้วย aqueous sulfuric acid และอบที่อุณหภูมิ 220 ถึง 280 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 ถึง 25 นาที จะให้ความเข้มของจุด lecithin และ sphimgomyelin เกือบเท่ากัน เมื่อมีความเข้มข้นของสารอยู่ 2 นาโนโมล แต่วิธีนี้ไม่สะดวกในการทดลอง ไม่สามารถใช้กับ plate พลาสติกได้ ต้องใช้แผ่นแก้วแทนและความร้อนที่อุณหภูมิสูงเป็นเหตุทำให้แผ่นแก้วแตกได้ ซึ่งทำให้ต้องเสียเวลาและสิ้นเปลืองในการทำการทดลองซ้ำอีก Gerbie (1972) ใช้ bromthymol blue ย้อม plate พบว่า bromthymol blue ให้สีกับ lecithin และ sphingomyelin เกือบเท่ากัน แต่ให้ใช้ได้ถูกต้องในจำนวนความเข้มข้นของ phospholipid ที่มีค่าต่ำกว่า 5 ไมโครกรัม และมีข้อเสียคือจะให้สีที่มองเห็นเมื่ออยู่ในไอของแอมโมเนียเท่านั้น เมื่อปราศจากไอของแอมโมเนีย สีจะจางลงอย่างรวดเร็ว ทำให้ไม่สะดวกในการนำมาวัดหรือเข้าเครื่อง densitometer ไอโอดีนก็เป็นสารที่ให้สีกับ lecithin และ sphingomyelin เกือบเท่ากัน (Parkinom และ Harvey 1973)แต่มีข้อเสียเช่นเดียวกัน bromothymol blue จึงไม่สามารถนำมาใช้ในการวัดหาอัตราส่วน L/S โดยเครื่อง densitometer ได้ ในการทดลองนี้จึงใช้สารละลายกรด phosphomolybdic ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวกเหมาะสำหรับหา lecithin และ sphingomyelin เพราะเตรียมสารละลายได้ง่าย และเก็บไว้ได้หลายเดือน ใช้อบ plateที่ 110 องศาเซลเซียส เหมาะกับ plate พลาสติกที่ใช้ เมื่อย้อมplate แล้วเก็บไว้ไม่ให้ถูกแสงจะเก็บไว้ได้นาน (Kulkani และคณะ 1972) สะดวกในการนำไปวัดอัตราส่วน L/S โดยเครื่อง densitometer ผลการทดลองในตารางที่ 12 พบว่าใช้สารละลาย 7% ของกรด phosphomolybdic ย้อม plate อบที่ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จะได้ผลถูกต้องมากกว่าเมื่ออบที่เวลา 5–20 นาที โดยดูจากอัตราส่วน L/S เท่ากับ 2 และผลจากการวัด

อัตราส่วน L/S นี้จากเครื่อง densitometer มีค่า 2.03 และการอบที่ 40 นาที ก็ยังให้ผลที่ถูกต้องเช่นเดียวกันกับอบ 30 นาที แต่เนื่องจากการทดลองนี้ต้องการใช้เวลาสั้นที่สุดในการทำการทดลองจึงเลือกอบ plate ด้วยเวลา 30 นาที เมื่อทำการทดลองต่อไป

เมื่อเปรียบเทียบการหาอัตราส่วน L/S ด้วยวิธีต่างกัน 3 วิธีคือ วัดอัตราส่วน L/S โดยเครื่อง densitometer ดูขนาดและความเข้มข้นของสารตัวอย่างเทียบกับสารละลายมาตรฐาน และวัดพื้นที่ของจุด lecithin และ sphingomyelin พบว่าการวัดอัตราส่วน L/S โดยเครื่อง densitometer ให้ผลสอดคล้องกับผลทางคลินิกทั้งในกรณีที่มีอัตราส่วนของ L/S ในค่าต่ำคือ 0.5–1.5 ในค่าปานกลาง 1.5–2 และค่าที่สูงกว่า 2 ในการทดลองนี้พบว่ามีข้อผิดพลาด 1 ใน 72 ราย เนื่องจากทารกมีอาการโรค RDS เล็กน้อยขณะทำการตรวจแต่อัตราส่วน L/S ไม่สามารถบอกได้ คิดเป็นผลผิดพลาดร้อยละ 1.3 (ตารางที่ 16)

การหาอัตราส่วน L/S โดยใช้เทียบกับสารละลายมาตรฐานของ lecithin และ sphingomyelin พบว่าอัตราส่วน L/S มีค่าระหว่าง 1–1.5 ซึ่งอยู่ในช่วงที่ให้ผลลบ และอัตราส่วน L/S ที่มีค่ามากกว่า 2 : 1 ซึ่งให้ผลบวก เป็นอัตราส่วนที่อยู่ในช่วงที่ดูง่ายมีขนาดของจุด lecithin และ sphingomyelin ที่ต่างกันหรือเท่ากันอย่างชัดเจน เป็นช่วงที่เทียบผลได้สะดวก แต่อัตราส่วน L/S ที่มีค่าใกล้ 2 ซึ่งเป็นค่าที่อยู่ระหว่างกลางจะเทียบผลได้อยาก ต้องใช้ความชำนาญซึ่งขึ้นอยู่กับการตัดสินใจของผู้ทำการทดลอง ซึ่งทำให้ผลที่ได้ในช่วงนี้มีความผิดพลาดสูงกว่าในช่วงอื่น จากการทดลอง (ตารางที่ 13) พบว่าให้ผลสอดคล้องกับผลทางคลินิกทั้ง 18 ตัวอย่าง ซึ่งการทดลองวิธีนี้ Dun และ Bhatnagar (1973) พบว่าผลที่อยู่ในช่วงกลางมีความผิดพลาดร้อยละ 36

การหาอัตาส่วน L/S โดยใช้วิธีวัดพื้นที่จากจุด พบว่าอัตราส่วน L/S ที่ได้จากการวัดพื้นที่จากจุดมีค่าเฉลี่ยสูงกว่าอัตราส่วน L/S ที่ได้จากการวัดจากเครื่อง densitometer ร้อยละ 18.65 (ตารางที่ 14) และมีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 15) ผลจากตารางที่ 14 แสดงว่าในช่วงที่อัตราส่วน L/S มีค่าต่ำซึ่งแปลผลว่าทารกมีปอดไม่สมบูรณ์ และในช่วงที่ให้ผลระหว่างกลางพบว่า ทารกเป็นโรค RDS 5 ราย ในขณะที่อัตราส่วน L/S โดยวิธีวัดนี้ให้ค่าสูงกว่า 2 คิดเป็นผลผิดพลาดร้อยละ 9 ซึ่งเมื่อคิดผลผิดพลาดในที่อัตราส่วน L/S ในช่วง 0.65–1.88 (ตารางที่ 14) เทียบกับผลทางคลินิคพบว่ามีความผิดพลาดสูงถึงร้อยละ 55 แต่อัตราส่วน L/S ที่อยู่ในช่วงที่มากกว่าสอง ให้ผลที่สอดคล้องกับผลทางคลินิค

จากผลการทดลองพอสรุปได้ว่าทั้ง 4 วิธีนี้มีข้อดีและข้อเสียคือ การหาอัตราส่วน L/S โดย TLC และวัดอัตราส่วนโดย densitometer เป็นวิธีที่ให้ความแม่นยำสูงกว่าการเทียบกับสารละลายมาตรฐานและวัดพื้นที่ของจุด รวมทั้งวิธี shake test และให้ผลสอดคล้องกับผลทางคลินิคดีที่สุด ทั้งในกรณีที่อัตราส่วน L/S มีค่าต่ำ ค่าที่อยู่ระหว่างกลาง และค่าสูง ซึ่งให้ผลผิดพลาดเพียงร้อยละ 1.3 และยังสามารถนำมาประยุกต์หา phosphatidyl ethanolamine และ phosphalidyl glycerolหรือ phosphatidyl inositol ซึ่งเป็นสารที่มีปริมาณน้อยในน้ำคร่ำ โดยวิธีฉาก silica gel จาก plate และนำไปวัดโดยเครื่อง densitometer ได้ ซึ่งอาจเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาหาอุบัติการของโรค RDS ในรายที่สตรีตั้งครรภ์เป็นเบาหวานได้ และวิธีนี้ดีกว่าการหา surfactant โดยวิธี shake test หรือการหาปริมาณของlecithin แต่เพียงอย่างเดียว เพราะการหาอัตราส่วน L/S ไม่ขึ้นกับปริมาณของน้ำคร่ำ หลีกเลี่ยงข้อผิดพลาดในกรณีที่สตรีตั้งครรภ์ และมีน้ำคร่ำมากกว่าปกติ ถ้าหา surfactant โดยวิธี shake test จะมีผลที่ผิดพลาด false negativeและการหาปริมาณของ lecithin (Bhagwanini 1972) จะได้ค่า lecithin น้อยลง เพราะปริมาณของน้ำคร่ำที่มากกว่าปกติ จะเจือจาง phospholipidที่มีอยู่ ทำให้การวินิจฉัยทางคลินิคผิดพลาดได้

ข้อเสียของวิธีนี้คือ ใช้เวลาทำการทดลองนานถึง 4–5 ชั่วโมง และวิธีการทดลองยากกว่า ต้องการความชำนาญในการเตรียม plate และทำการทดลอง นอกจากนี้เครื่องมือที่ใช้มีราคาแพง คือ refrigerated centrifuge, TLC plate และ tank ที่ใช้ run รวมทั้ง densitometer ซึ่งเมื่อเทียบกับ shake test พบว่า shake test ทำได้ในระยะเวลาที่สั้น คือใช้เวลาเพียง 30 นาที เป็นอย่างมาก และไม่ต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพงดังกล่าวข้างต้น ห้องทดลองที่มีเพียง pipette และหลอดทดลองก็สามารถจะทำได้ สารเคมีที่ใช้คือ 95% ethanol และสารละลาย 0.9% NaCe ซึ่งเป็นสารเคมีที่หาได้ง่ายในห้องทดลองของโรงพยาบาลทั่ว ๆ ไป

การหาอัตราส่วน L/S โดยวิธีการเทียบกับสารละลายมาตรฐาน lecithin และ sphingomyelin วิธีนี้ให้ข้อดีคือสามารถลดระยะเวลาให้สั้นลงโดยไม่ต้องลอก silica gel ออกจาก plate และนำไปวัดโดยเครื่อง densitometer วิธีนี้จะให้ผลทางคลินิคและให้ค่าที่ถูกต้องแม่นยำ เมื่อมีอัตราส่วน L/S 1–1.5 และเมื่ออัตราส่วน L/S มากกว่า 2 แต่มีข้อเสียคือ เมื่ออัตราส่วน L/S อยู่ในช่วงที่ใกล้เคียง 2 พบว่าจะอ่านผลได้ยาก ทำให้มีโอกาสแปลผลทางคลินิคผิดพลาดได้มากกว่าช่วงอื่น

การหาอัตราส่วน L/S โดยใช้วัดพื้นที่จุด lecithin และ sphingomyelin นั้นพบว่า ให้ค่าอัตราส่วน L/S สูงกว่าอัตราส่วน L/S ที่หาจากเครื่อง densitometer และไม่สอดคล้องกับผลทางคลินิคในช่วงที่มีอัตราส่วน L/S ต่ำ ซึ่งในช่วงนี้ต้องการความแม่นยำมากเพราะเป็นช่วงที่ทารกมีโอกาสเกิดโรค RDS มากที่สุด (อัตราส่วน L/S 1–1.5) ส่วนมากทารกมักจะมีอาการหนักและมีอัตราการเสียชีวิตสูง วิธีนี้จึงไม่สามารถนำมาช่วยวินิจฉัยโรค RDS ได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่ผลจากการทดลองของ Parkinson และ Harvey (1973) พบว่าสามารถใช้วิธีนี้หาอัตราส่วน L/S ได้ และใช้ได้ผลดีโดยใช้วัดจุดด้วย Vernier scale calipers แต่ในวิทยานิพนธ์นี้ใช้ไม้บรรทัดวัด จึงอาจมีความละเอียดและแม่นยำของวิธีการน้อยเกินไป

จากอัตราส่วน L/S โดยวัดจากเครื่อง densitometer สรุปได้ว่าทารกจะมีปอดที่ไม่สมบูรณ์เต็มที่ (immature) เมื่อมีอัตราส่วน L/S อยู่ระหว่าง 1-1.5 และมีค่าที่อยู่ระหว่างกลาง (intermediate) คือทารกมีโอกาสจะเป็นโรค RDS ได้มาก จะมีอัตราส่วน L/S อยู่ระหว่าง 1.5-1.8 และทารกจะมีปอดสมบูรณ์เมื่อมีอัตราส่วน L/S มากกว่า 2.0 ขึ้นไป

การหาอัตราส่วน L/S โดยวิธีวัดจากเครื่อง densitometer ได้ผลสอดคล้องกับผลทางคลินิคที่สุด การใช้วิธีนี้หาอัตราส่วน L/S แต่ในกรณีที่ไม่มีเครื่อง densitometer สามารถที่จะใช้วิธีหาโดยเทียบกับสารละลายมาตรฐานได้ และในกรณีที่ต้องการผลเร็ว และไม่มีเครื่องมือในการทดลอง ก็สามารถจะใช้วิธี shake test ช่วยในการวินิจฉัยได้ ทั้งนี้ผู้ใช้ต้องทราบถึงข้อดีข้อเสียของแต่ละวิธี รวมทั้งวัตถุประสงค์ที่จะนำไปประยุกต์กับงานด้านคลินิค

ข้อเสนอแนะ

1. จากการศึกษาพบว่าอัตราส่วนของ L/S มีความสัมพันธ์ทางคลินิคกับการเกิดโรค **Hayaline membrane disease** แต่การวินิจฉัยของโรคนี้ที่ถูกต้องควรจะมีการวินิจฉัยทางพยาธิวิทยารวมไปด้วย จึงน่าจะมีการศึกษา L/S ควบคู่ไปกับการวินิจฉัยทางคลินิคและทางพยาธิวิทยา

2. จากความรู้ปัจจุบัน แสดงให้เห็นว่าในสตรีที่ตั้งครรภ์ปกติ ถ้าค่าเท่ากับ 2 แล้ว ทารกแรกเกิดจะมีอาการ RDS น้อยมาก แต่ในกรณีที่มารดาเป็นโรคเบาหวาน จะมีอัตราส่วน L/S ในระยะต่าง ๆ ของอายุครรภ์ต่างไปกับการตั้งครรภ์ที่ไม่มีโรคแทรกซ้อน จึงเป็นเรื่องที่น่าจะศึกษา L/S ในภาวะผิดปกติต่าง ๆ ร่วมกับการเกิด RDS

3. Gluck (1978) พบว่านอกจากอัตราส่วน L/S แล้ว จำนวนเป็นเปอร์เซ็นต์ของ **lecithin** ที่ตกตะกอนด้วย **acetone** ของจำนวน **lecithin** ทั้งหมด **phosphatidylinositol** และ **phosphatidyl glycerol** มีส่วนสำคัญในการใช้เป็นข้อบ่งชี้ถึงความสมบูรณ์ของปอดทารกทำให้มีความแม่นยำมากขึ้น ซึ่งมีความจำเป็นมากในกรณีที่การตั้งครรภ์มีอัตราเสี่ยงสูง จากผลการศึกษาของ Gluck พบว่าถ้าทารกมีอัตราส่วน L/S สูงกว่า 2 มีจำนวนร้อยละของ **lecithin** ที่ตกตะกอนด้วย **acetone** สูง และจำนวนร้อยละของ **phosphatidyl glycerol** สูง จะไม่มีอาการของ RDS เลย แต่ในกรณีที่มารดาเป็นโรคเบาหวาน **classes A, B** และ C มีความจำเป็นจะต้องตรวจหา **phosphatidyl glycerol** เพิ่มขึ้น Gluck (1978) พบว่าถ้าพบ **phosphatidyl glycerol** ยังไม่พบเลยว่าทารกมีอาการ RDS ฉะนั้นจึงสมควรที่จะทำการศึกษาหา **phosphatidyl glycerol** ในสตรีตั้งครรภ์ที่เป็นโรคเบาหวาน