การหาอัตราส่วนเลซิทินและสฟิงโกมัยอีลินในน้ำคร่ำ

นางสาวไพสิน แตงแก้ว

002214

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

แผนกวิชาชีวเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2521

I16819868X

Lecithin and Sphingomyelin Ratio in Amniotic Fluid

Miss Pailin Tangkeo

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirment

for the Degree of Master of Science

Department of Biochemistry

Graduate School

Chulalongkorn University

1978

หัวข้อวิทยานิพนธ์	อัตราส่วนของเลซิทินและสฟิงโกมัยลินในน้ำคร่ำ
โดย	นางสาวไพลิน แตงแก้ว
แผนกวิชา	ชีวเคมี
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์ประมวล วีรุตมเสน

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ศาสตราจารย์ ดร. วิศิษฐ์ ประจวบเหมาะ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. กำจัด มงคลกุล)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์ประมวล วีรุตมเสน)

.....กรรมการ

(อาจารย์ ดร. พีรดา สิริจินตกานต์)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์แพทย์หญิงยุวัน อนุมานราชธน)

สิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การหาอัตราส่วนเลซิทินและสฟิงโกมัยอีลินในน้ำคร่ำ
ชื่อนิสิต	นางสาวไพลิน แตงแก้ว
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์ประมวล วิรุฒมเสน
แผนกวิชา	ชีวเคมี
ปีการศึกษา	2520

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

ได้ทำการทดลองหาอัตราส่วนของ phospholipid lecithin และ sphingomyelin ในน้ำคร่ำ (amniotic fluid) กับสตรีที่มีอายุครรภ์ระหว่าง 24–42 สัปดาห์ 120 ตัวอย่าง เพื่อหาค่าปกติและวิธีการที่เหมาะสม เมื่อเปรียบเทียบกับอาการทางคลินิคของทารกแรกเกิด

จากการศึกษาพบว่า ถ้าเก็บน้ำคร่ำที่อุณหภูมิห้อง ภายหลัง 24 ชั่วโมง อัตราส่วนของ lecithin/spingomyelin (L/S) จะลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ถ้าเก็บไว้ที่ –20 องศาเซลเซียส อัตราส่วน L/S จะมีค่าคงที่ และสามารถเก็บได้นานถึง 60 วัน เมื่อนำน้ำคร่ำมาปั่นที่ 350xg 600xg 1400xg พบว่าแรงปั่นที่เหมาะสมคือ 1400 xg

ได้เปรียบเทียบวิธีการระหว่างการตกตะกอน phospholipid ด้วย acetone กับการไม่ตกตะกอนก่อนที่จะไปแยกชนิดต่าง ๆ ของ phospholipid ด้วยวิธี Thin - Layer Chromatography จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่า การตกตะกอนด้วย acetone อัตราส่วนของ L/S ให้ผลแน่นอนและมีความสัมพันธ์กับอาการทางคลินิคเป็นอย่างดี เมื่อนำสารที่แยกได้หาอัตราส่วนด้วยเครื่อง densitometer โดยการคำนวณจากพื้นที่ของจุด lecithin และ sphingomyelin และโดยวิธีเปรียบเทียบกับสารละลาย

มาตรฐานของ lecithine และ sphingomyelin ในอัตราส่วนต่าง ๆ พบว่า วิธีการหาอัตราส่วนที่ทำ L/S โดยเครื่อง densitometer ให้ผลสอดคล้องกับอาการทางคลินิค

ได้ทำการศึกษาอัตราส่วน L/S ด้วย TLC เปรียบเทียบกับการหาคุณสมบัติของ surfactant โดยการทำ shake test เพื่อหาความสัมพันธ์กับอาการทางคลินิคของทารกแรกเกิด พบว่าการหา L/S ด้วย TLC มีความถูกต้องเชื่อถือได้มากกว่าร้อยละ 95 ส่วนวิธี shake test มีความถูกต้องก็ต่อเมื่อได้ผลเป็นบวก แต่ถ้าผลเป็นลบหรือ intermediate ความถูกต้องจะมีน้อยกว่า

สรุปได้ว่าอัตราส่วน L/S ถ้ามีค่าระหว่าง 1–1.5 ทารกแรกเกิดอยู่ในสภาพ immature แต่ถ้าค่า L/S มากกว่า 1.5 แต่น้อยกว่า 2 ทารกอาจจะเกิด Respiratory distress syndrom ได้ ถ้าค่า L/S มากกว่า 2 ทารกจะเกิดกลุ่มอาการโรคดังกล่าวน้อยกว่าร้อยละ 2

Thesis Title Lecithin and Sphingomyelin Ratio in Amniotic Fluid

Name Miss Pailin Tangkeo

Thesis Advisor Dr. Pramuan Virutamasen, M.D.

Department Biochemistry

Academic Year 1978

ABSTRACT

The aims of this study was to find the reliable method and the normal value in determining of phospholipid (lecithin/sphingomyelin ratio) in the amniotic fluid. One hundred and twenty samples were collected from the pregnant women between 24 to 42 weeks of gestation. Correlation of L/S ratio with clinical manifestation of the newborn was evaluated.

The results of this study found that amniotic fluid at -20°C the L/S ratio will be constant as long as 60 days. If the assays could not processed within 24 hours after getting the samples, the L/S ratio would significantly reduced.

The different rate of centrifugation (350xg, 600xg, 1400xg) of amniotic fluid prior to assay were carried out to ascertain the proper speed. It was found that centrifugation at 1400xg was shown of optimal result.

The results of this study had also shown that L/S ratio was more reliable and accurate if phospholipid was precipitated with acetone as compared with none. Furthermore, the findings are completely agreeable with the clinical manifestations. To ascertain the reliability of L/S ratio in differents procedures, namely, by comparison with standard solution, densitometer, measuring area of lecithin and sphingomyelin, it came to conclude that the L/S ratio by densitometer yeilded a reliable result as to compare with the clinical findings.

The study was also conducted to compare the practical and feasible method "shake test" in determining of surfactant properties of amniotic fluid with L/S ratio. These findings were directly correlated with clinical manifestations of the newborn infant. It was shown that the L/S ratio was reliable at 95% while shake test would give a reliability when the test was interpreted as positive. If the shake test was interpreted either negative or intermediate reliability was somewhat low.

It was concluded that L/S ratio determining with thin layer chromatomography and densitometer gave a reliable result. In immature infant, the L/S ratio of amniotic fluid was 1 to 1.5, if the ratio was more than 1.5 but less than 2. RDS may or may not develop. If the ratio was morethan 2 the risk of RDS was less than 2 percent.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณและขอบคุณ ท่านผู้มีรายนามต่อไปนี้ที่ได้กรุณารับเป็นผู้ควบคุมการวิจัย ให้คำแนะนำตลอดจนให้ความช่วยเหลือในทุก ๆ ด้าน จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี

ผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์ประมวล วีรุตมเสน
รองศาสตราจารย์นายแพทย์นิกร คุสิตสิน
ดร. สุกัญญา วีรวัฒนะกุมพะ
รองศาสตราจารย์นายแพทย์พินัย มะโนทัย
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ วราพรรณ ด่านอุตรา
อาจารย์ ดร. พีรกา สิริจินตกานต์
นายแพทย์ สมภพ ลิ้มพงศานุรักษ์
นายแพทย์ ประมวล ริ้วตระกูลชัย
คุณ มนูญ นากสุข
คุณ นภาพร หีบทาไม้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ฝ่ายเวชศาสตร์ประชากร สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย และเจ้าหน้าที่แผนกสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา คณะแพทย์ศาสตร์

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาให้ทุนอุดหนุนการวิจัยในครั้งนี้

สารบัญ

		หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย		ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ		ฉ
กิตติกรรมประกาศ		ช
รายการตารางประกอบ		ฌ
รายการรูปประกอบ		ญ
บทที่ 1	บทนำ	1
บทที่ 2	วัสดุ และเครื่องมือ และวิธีดำเนินการทดลอง	
2.1	วัสดุ	11
2.2	เครื่องมือ และเครื่องแก้ว	12
2.3	ตัวอย่างน้ำคร่ำที่ทำการวิจัย	13
2.4	การเตรียมสารละลาย	13
2.5	วิธีทำการทดลอง	16
2.5.1	การสะกัด phospholipid จากน้ำคร่ำ	16
2.5.2	การตกตะกอน total phospholipid ด้วย acetone	17
2.5.3	การตรวจหาโดย Thinlayer chromatography	17
2.5.4	การวัดความเข้มของ Lecithin และ Sphingomyelin โดยเครื่อง densitometer	18

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

		หน้า
2.6	ทดลองหาความสามารถในการแยก phospholipid	18
2.7	ความไวในการวัด phospholipid	21
2.8	Standard curve ของ lecithin และ sphingomyelin	21
2.9	Reliability ของวิธีทดลอง	21
2.10	Percentage recovery	22
2.11	การเตรียมสารตัวอย่าง	23
2.12	ทดลองหาแรงปั่นที่เหมาะสมในการปั่นแยกน้ำครำ	24
2.13	การตกตะกอน phospholipid ด้วย acetone ที่ 0 องศาเซลเซียส	24
2.14	การทดลองหาเวลาที่เหมาะสมในการอบ plate	25
2.15	การหาอัตราส่วนของ lecithin และ sphingomyelin ในน้ำครำตัวอย่างโดย Thin Layer Chromatography	25
2.15.1	การหาอัตราส่วน lecithin และ sphingomyelin โดยวิธีเทียบอัตราส่วนกับสารละลายมาตรฐานของ lecithin และ sphingomyelin	25
2.15.2	การหาอัตราส่วน lecithin และ sphingomyelin โดยการวัดขนาดของจุด lecithin และ sphingomyelin	26
2.15.3	การหาอัตราส่วน lecithin และ sphingomyelin โดยวัดด้วยเครื่อง densitometer	26

		หน้า
2.16	การหา surfactants ในน้ำคร่ำโดยวิธี shake test	26
บทที่ 3	ผลการทดลอง	28
3.1	ผลการทดลองหาความสามารถในการแยก phospholipid	28
3.2	ผลการทดลองหาความไวในการวัด phospholipid	28
3.3	Standard curve ของ lecithin และ sphingomyelin	30
3.4	Reliability ของวิธีทดลอง	30
3.5	Percentage of recovery	34
3.6	ผลของการเก็บตัวอย่างน้ำคร่ำที่อุณหภูมิและเวลาต่าง ๆ ต่ออัตราส่วน L/S	37
3.7	ผลการทดลองหาแรงปั่นที่เหมาะสมในการปั่นแยกน้ำคร่ำ	40
3.8	ผลการตกตะกอน phospholipid ด้วย acetone 0 องศาเซลเซียส	40
3.9	ผลการทดลองหาเวลาที่เหมาะสมในการอบ plate	46
3.10	ผลการหาอัตราส่วน lecithin และ sphingomyelin โดยวิธี Thin Layer Chromatography และเทียบกับสารละลายมาตรฐาน	48
3.11	ผลการหาอัตราส่วน lecithin และ shingomyelin โดยการวัดพื้นที่ของจุด เปรียบเทียบกับการวัดด้วยเครื่อง densitometer	50

หน้า

3.12 ผลการหาอัตราส่วน lecithin และ sphingomyelin โดยวัดด้วยเครื่อง densitometer 55

3.13 ผลการหา surfactant ในน้ำคร่ำ โดยวิธี shake test 57

3.14 ผลการหาอัตราส่วน lecithin และ sphingomyelin โดยวิธีเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานกับวิธี shake test 58

บทที่ 4 สรุปผลและวิจารณ์ 61

เอกสารอ้างอิง 72

ภาคผนวก 82

ประวัติผู้ฌขียน 86

รายการตารางประกอบ

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

		หน้า
ตารางที่ 1	แสดงความแม่นยำของวิธีวัดอัตราส่วน L/S ในน้ำคร่ำหลายตัวอย่างในเวลาเดียวกัน	32
ตารางที่ 2	แสดงความแม่นยำของวิธีหาอัตราส่วน L/S ในน้ำคร่ำหลายตัวอย่าง เมื่อทำต่างเวลากัน	33
ตารางที่ 3	Percentage of recovery ที่ได้จากการเติม 5 ไมโครกรัม sphingomyelin ลงในน้ำคร่ำ	34
ตารางที่ 4	Percentage of recovery ที่ได้จากการเติม 10 ไมโครกรัม Sphingomyelin ลงในน้ำคร่ำ	35
ตารางที่ 5	Percentage of recovery ที่ได้จากการเติม lecithin ลงในน้ำคร่ำ	36
ตารางที่ 6	การเปรียบเทียบอัตราส่วน L/S ที่ทำการทดลองทันที กับอัตราส่วน L/S ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง	37
ตารางที่ 7	แสดงอัตราส่วน L/S ที่ได้จากการเก็บสารตัวอย่างน้ำคร่ำ โดย 3 วิธีคือ ทำการทดลองทันที เก็บไว้ที่ –20 องศาเซลเซียส และใส่ 10% EDTA	38
ตารางที่ 8	แสดงผลการทดลองหาอัตราส่วนของ L/S จากการเก็บน้ำคร่ำ –20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10, 30 และ 60 วัน	39

หน้า

ตารางที่	9	แสดงอัตราส่วนของ L/S จากน้ำคร่ำที่ได้จากการปั่นแยกด้วยแรง 350xg 600xg และ 1400xg	41
ตารางที่	10	แสดงผลการหาอัตราส่วน L/S โดยวิธีตกตะกอนด้วย acetone เปรียบเทียบกับวิธีที่ไม่ได้ตกตะกอนด้วย acetone	43
ตารางที่	11	แสดงอัตราส่วน L/S ที่ได้จากการตกตะกอนด้วย acetone และค่าความแตกต่างระหว่างอัตราส่วนที่ได้จากการตกตะกอน และไม่ตกตะกอนด้วย acetone	45
ตารางที่	12	แสดงผลของระยะเวลาในการอบ plate ที่มีต่ออัตราส่วน L/S	46
ตารางที่	13	ผลการหาอัตราส่วน L/S โดยเทียบกับสารละลายมาตราฐานของ lecithin และ sphingomyelin อัตราส่วน 1 : 1, 1.5 และ 2 : 1 และผลทางคลินิค	49
ตารางที่	14	แสดงผลการวัดอัตราส่วนของ L/S โดยเครื่อง densitometer เปรียบเทียบกับการหาอัตราส่วน L/S โดยวิธีวัดพื้นที่ของจุด	51
ตารางที่	15	แสดงผลการวัดอัตราส่วนของ L/S โดยเครื่อง densitometer เปรียบเทียบกับการหาอัตราส่วน L/S โดยวิธีวัดพื้นที่ของจุด เมื่อแยกเป็นกลุ่มตามอัตราส่วน	54
ตารางที่	16	แสดงอัตราส่วน L/S ที่ได้จากตัวอย่างน้ำคร่ำของสตรีที่มีอายุครรภ์ 24–42 สัปดาห์ หาโดย TLC และวัดอัตราส่วน L/S โดยเครื่อง densitometer	56
ตารางที่	17	แสดงผลการหา surfactant โดยวิธี shake test เทียบกับอายุครรภ์ น้ำหนักเด็ก และผลทางคลินิค	57

		หน้า
		หน้า
ตารางที่ 18	แสดงผลการหาสารที่เป็น surfactant ในน้ำคร่ำเปรียบเทียบกับการหาอัตราส่วน L/S โดยวิธีเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานและเปรียบเทียบความสัมพันธ์กับอายุครรภ์ น้ำหนักทารกและผลทางคลินิค	59
ตารางที่ 19	เปรียบเทียบอัตราส่วน โดยหาจากวิธีต่างๆกัน 3 วิธี ใช้วิธีเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน lecithin และ sphingomyelin ใช้วัดอัตราส่วน L/S จากเครื่อง densitometrt และวิธี shake test เทียบกับผลทางคลินิค	60

รายการรูปประกอบ

		หน้า
รูปที่ 1	การแยก phospholipid โดย TLC จากน้ำคร่ำตัวอย่างเทียบกับสารละลายมาตราฐานของ Lecithin ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัม และสารละลายมาตราฐานของ Sphingomyelin 10 ไมโครกรัม ในสารละลาย Chloroform: Methanol: Aceti acid : น้ำ 65: 30: 4: 2	19
รูปที่ 2	แสดงรูปกราฟของ Lecithin(L) และ Sphingomyelin(S) แผ่น silica gel ที่วัดด้วยเครื่อง densitometer	20
รูปที่ 3	แสดง standard curve ของ lecithin และ sphingomyelin ความเข้มข้น 1 ถึง 40 ไมโครกรัมกับพื้นที่ใต้กราฟของ lecithin และ sphingomyelin	29
รูปที่ 4	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนโดยน้ำหนักของ lecithin และ sphingomyelin และอัตราส่วนโดยพื้นที่ที่ได้จากการวัดความเข้มของจุด L และ S โดยเครื่อง densitometer	34
รูปที่ 5	แสดงจุดของ lecithin และ sphingomyelin เมื่ออบ plate เป็นเวลา 5,10,15,20 และ 30 นาที ที่ 110องศาเซลเซียส	47