บทที่ ๒

อุปกรณ์และวิธีทำการวิจัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

๒.๑ อุปกรณ์

๒.๑.๑ เคมีภัณฑ์

๒.๑.๑.๑ Hexamidine (Rhone - Poulene. S.A.)

๒.๑.๑.๒ Egg Lecithin (E. Merck)

๒.๑.๑.๓ Cholesterol (E. Merck)

๒.๑.๑.๔ Bovine Serum Albumin (Sigma)

๒.๑.๑.๕ Monosodium Dihydrogen Phosphate (Carlo Erba)

๒.๑.๑.๖ Disodium Hydrogen Phosphate (Mallinckrodt)

๒.๑.๑.๗ n - Hexane (J. T Baker Chemical LTD.)

๒.๑.๑.๘ Potassium Dichromate (May - Baker LTD.)

๒.๑.๑.๙ Sulfuric Acid (May - Baker LTD.)

๒.๑.๑.๑๐ Tridistilled Water (องค์การเภสัชกรรม)

๒.๑.๑.๑๑ Absolute Alcohol (องค์การเภสัชกรรม)

๒.๑.๒ เครื่องมือ

๒.๑.๒.๑ Tensiometer (Biolar Coorporation)

๒.๑.๒.๒ Teflon Coated Trough with 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.)

๒.๑.๒.๕ Alcoholic Lamp

๒.๒ วิธีการวิจัย

๒.๒.๑ การเตรียมสารที่ใช้ในการสร้างเยื่อเซลล์เทียม[๕๐-๕๑]

๒.๒.๑.๑ Egg Lecithin Solution

ละลาย Egg Lecithin 5 mg. ใน n - Hexane 25 ml. ต้องใช้สารละลายนี้ 0.026887 ml. (คิดเป็น ๔ ส่วน) ต่อพื้นที่ถาด 6.08×10^{17} $\overset{\circ}{A}^2$ มันจะเรียงตัวเต็มถาดในลักษณะ Monomolecular Film พอดี

๒.๒.๑.๒ Cholesterol Solution

ละลาย Cholesterol 5 mg. ใน n - Hexane 25 ml. ต้องใช้สารละลายนี้ 0.0195235 ml. (คิดเป็น ๔ ส่วน) ต่อพื้นที่ถาด 6.08×10^{17} $\overset{\circ}{A}^2$ มันจะเรียงตัวเต็มถาดในลักษณะ Monomolecular Film พอดี

๒.๒.๑.๓ Bovine Serum Albumin Solution

ละลาย Bovine Serum Albumin 10 mg.ใน Tridistilled Water 25 ml. ต้องใช้สารละลายนี้ 0.0152 ml. (คิดเป็น ๔ ส่วน) ต่อพื้นที่ถาด 6.08×10^{17} $\overset{\circ}{A}^2$ มันจะเรียงตัวเต็มถาดในลักษณะ Monomolecular Film พอดี

๒.๒.๒ การหาแรงตึงผิวของ Tridistilled Water pH. ๕.๙ และ ๗.๔

๒.๒.๒.๑ เตรียม Tridistilled Water ให้มี pH. ๕.๙ และ ๗.๔ โดยใช้ Sorensen's Phosphate Buffer (0.01 M)[๕๒]

๒.๒.๒.๒ วัดแรงตึงผิวของ Tridistilled Water pH. ๕.๙ และ ๗.๔ โดยวิธี Wilhelmy Plate Method[๔๓-๔๔,๔๖-๔๗,๕๓]

การวัดแรงตึงผิวใช้เครื่องมือที่เรียกว่า Surface Tensiometer ซึ่งประกอบด้วย Torsion Balance และมี Platinum Blade แขวนติดอยู่ บรรจุน้ำ

ที่ต้องการวัดแรงตึงผิวลงในถาดให้เต็มพอดี ปรับระดับน้ำด้วย Suction Pump ถาดนี้สามารถเปลี่ยนแปลงพื้นที่ผิวหน้าได้ด้วย Movable Barrier ปรับให้ Platinum Blade จุ่มลงในน้ำ โดยให้ขอบบนอยู่ใต้ผิวน้ำพอดี ซึ่งเข็มที่หน้าปัทม์ของ Torsion Balance จะอยู่ตรงขีดที่กำหนดให้ ที่จุดนี้จะต้องปรับค่าแรงตึงผิวบนหน้าปัทม์ให้เป็นศูนย์ด้วย เมื่อต้องการจะวัดแรงตึงผิวให้ค่อย ๆ เพิ่มค่าที่หน้าปัทม์ ขณะเดียวกัน Platinum Blade จะถูกยกขึ้นจากน้ำ เข็มซึ่งเป็นตัวปรับระดับของ Platinum Blade จะเคลื่อนขึ้นอย่างช้า ๆ เมื่อ Platinum Blade ถูกยกขึ้นจากน้ำจนกระทั่งขอบบนถูกยกขึ้นเหนือผิวน้ำ เข็มจะเคลื่อนเร็วขึ้นกว่าเดิม ที่จุดนี้ค่าที่อ่านได้จากหน้าปัทม์จะเป็นค่าแรงตึงผิวของน้ำซึ่งมีหน่วยเป็น Milligram เมื่อคูณด้วย ๐.๑๙๘ จะได้ค่าที่มีหน่วยเป็น dyne/cm. Torsion Balance นี้ สามารถวัดแรงตึงผิวที่เปลี่ยนแปลงได้ ๐.๐๓๙๖ dyne/cm.

๒.๒.๓ การสร้างเยื่อเซลล์เทียม

ใช้หลักการสร้างเยื่อเซลล์เทียมของ Langmuir [๔๔-๔๕,๕๔-๕๕]

๒.๒.๓.๑ สร้างจาก Egg Lecithin

ทดสอบความสะอาดของผิวน้ำก่อนที่จะสร้างเยื่อเซลล์เทียมทุกครั้ง ด้วยการวัดแรงตึงผิวของน้ำในพื้นที่ผิว ๑๐๐ % และ ๓๐ % ค่าที่วัดได้จะต้องเท่ากัน[๕๐] ใช้ Agla Micrometer Syringe ในการหยดสารละลายลงบนผิวน้ำ ค่าที่อ่านได้จาก Agla Micrometer Syringe เป็นระยะทางที่ Micrometer Spindle ถูกดันเข้าไปใน Barrel ซึ่งสามารถคำนวณได้ดังนี้

$$20\,M = V$$

เมื่อ M = ค่าที่อ่านได้จาก Micrometer Syringe

V = ปริมาตรของสารเป็น Microliter

ดังนั้นเมื่อต้องการใช้ Egg Lecithin Solution ๐.๐๒๖๘๘๗ ml. จะต้องใช้จำนวน ๑.๓๔๔๓๕ ช่องของ Micrometer Syringe ขณะหยดสารละลายลงบนผิวน้ำนั้น ถือ Syringe ให้สูงจากผิวน้ำประมาณ ๒ - ๓ mm. และหยดลงอย่างช้าๆ[๕๐,๕๔] ขณะเดียวกัน Platinum Blade จะต้องอยู่ใต้ผิวน้ำ เมื่อหยดสารละลายลงไปแล้วทิ้งไว้ประมาณ ๑๐ นาที เพื่อให้ n - Hexane ระเหยออกหมด และ Egg Lecithin เรียงตัวเป็นระเบียบ ค่อย ๆลดพื้นที่ถาดด้วย Movable Barrier ในแต่ละพื้นที่วัดค่าแรงตึงผิว ๓ ครั้ง เพื่อหาค่าเฉลี่ย อ่านค่าแรงตึงผิวอย่างรวดเร็วเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงพื้นที่แต่ละครั้ง ลดพื้นที่ถาดจนกระทั่งค่าแรงตึงผิวไม่เปลี่ยนแปลงหรือลดลง ซึ่งแสดงว่า Film จะเรียงตัวไม่เป็นระเบียบ และเสียไป (Collapsing Point) นำค่าที่วัดได้มาสร้าง π - A (Surface Pressure - Surface Area) curve เมื่อ

$$\pi = r_o - r$$

π = ความดันผิว

r_o = แรงตึงผิวของน้ำ

r = แรงตึงผิวที่วัดได้ใน System

๒.๒.๓.๒ สร้างจาก Egg Lecithin และ Cholesterol

ดำเนินการเช่นเดียวกับข้อ ๒.๒.๓.๑ โดยใช้อัตราส่วน Egg Lecithin : Cholesterol = ๓ : ๑, ๒ : ๒ และ ๑ : ๓

๒.๒.๓.๓ สร้างจาก Egg Lecithin, Cholesterol และ Bovine Serum Albumin

ดำเนินการเช่นเดียวกับข้อ ๒.๒.๓.๑ และ ๒.๒.๓.๒ แล้วเพิ่ม Bovine Serum Albumin ลงไป ๕ ส่วน ในทุกอัตราส่วน แล้วทิ้งไว้ประมาณ ๑๐ นาที เพื่อให้สารประกอบต่าง ๆมีการเรียงตัวเป็นระเบียบ ทั้งนี้เวลาหยด Bovine Serum Albumin Solution จะต้องหยดลงอย่างช้า ๆ และระมัดระวัง[๕๖-๕๘] จะได้อัตรา

ส่วน Egg Lecithin : Cholesterol : Bovine Serum Albumin = ๔:๐:๔ ๑:๓:๔ , ๒:๒:๔ และ ๑:๓:๔

๒.๒.๔ ศึกษาปฏิกริยาของ Hexamidine กับเยื่อเซลล์เทียม

๒.๒.๔.๑ เตรียมยา Hexamidine

ผสมยา Hexamidine ใน Tridistilled Water ให้มีความเข้มข้น ๐.๑%, ๐.๒ %, ๑.๐ %, ๑.๕ %, และ ๒.๐ %

๒.๒.๔.๒ ศึกษาปฏิกริยาของ Hexamidine กับเยื่อเซลล์เทียมที่ pH. ๕.๔

สร้างเยื่อเซลล์เทียมตามข้อ ๒.๒.๓ บน Tridistilled Water pH. ๕.๔ แล้วหยด Hexamidine ในแต่ละระดับความเข้มข้นลงบนเยื่อเซลล์เทียม ๐.๕ ml. ทิ้งไว้ประมาณ ๑๐ นาที แล้ววัดค่าแรงตึงผิวในแต่ละพื้นที่ที่เปลี่ยนแปลง นำค่าที่วัดได้มาสร้าง π - A curve เปรียบเทียบกับ π - A curve ของเยื่อเซลล์เทียมที่ไม่มี Hexamidine ใน System เดียวกัน

๒.๒.๔.๓ ศึกษาปฏิกริยาของ Hexamidine กับเยื่อเซลล์เทียม ที่ pH. ๗.๔

สร้างเยื่อเซลล์เทียมตามข้อ ๒.๒.๓ บน Tridistilled Water pH. ๗.๔ แล้วหยด Hexamidine ในแต่ละระดับความเข้มข้นลงบนเยื่อเซลล์เทียม ๐.๕ ml. ทิ้งไว้ประมาณ ๑๐ นาที แล้ววัดค่าแรงตึงผิวในแต่ละพื้นที่ที่เปลี่ยนแปลง นำค่าที่วัดได้มาสร้าง π - A curve เปรียบเทียบกับ π - A curve ของเยื่อเซลล์เทียมที่ไม่มี Hexamidine ใน System เดียวกัน

การวิจัยนี้ทำในห้องทดลอง ซึ่งควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ตลอดการทดลองที่ ๒๕ $\pm$ ๒° c

เครื่องมือเครื่องใช้ต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดลองจะต้องให้สะอาดที่สุด เครื่องแก้วทุกชนิดล้างให้สะอาด แล้วแช่ใน Chromic Acid ค้างคืน หรือประมาณ ๑๒ ชั่วโมง แล้วล้างด้วยน้ำประปา และน้ำกลั่นอย่างน้อย ๖ ครั้ง (๕๙)