

บทที่ 3

วิจารณ์และสรุปผล3.1 การทดลองเลี้ยงหนู

ในการทดลองครั้งนี้ได้เลี้ยงหนู โดยใช้กระป๋องนมเป็นกรง ขนาดกระป๋องมีเนื้อที่ไม่ว่างพอที่จะให้หนูเคลื่อนไหวไต่สะดวกและภายในกระป๋องอากาศถ่ายเทไม่คอยสะดวก การวางหนูไม่อ่อนแอจนเกินไป จะสังเกตได้ว่ามันพยายามกระโดดขึ้นมาเกาะที่ฝากระป๋องเป็นประจำ สถานที่และอากาศจึงเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้หนูเกิดอาการอ่อนเพลียเร็วกว่าปกติ และตายเกือบหมดภายในระยะเวลา 3 เดือน จากหนู 11 ตัว (เลี้ยงโดยให้กิน HCB) จะเหลือเพียง 1 ตัว ส่วนหนูที่ไม่ได้ให้กิน HCB จาก 4 ตัวจะเหลือเพียง 3 ตัว จากการสังเกตอุจจาระและปัสสาวะจะพบว่า ในเดือนแรกจะมีจำนวนมากว่าเดือนที่ 2 และเดือนที่ 3 ในช่วงเดือนที่ 3 ปัสสาวะจะมีจำนวนมากและสีปัสสาวะเป็นสีแดง ซึ่งเป็นอาการที่หนูเกิดโรค porphyria แล้ว อุจจาระมีจำนวนน้อยและมีลักษณะแข็งสีดำ ร่างกายหนูจะอ่อนแอมากในเดือนที่ 3 ไม่ค่อยกินอาหารและน้ำ ก่อนจะตายจะมีอาการสันกระดูกตามร่างกายให้เห็น ซึ่งเป็นอาการทางระบบประสาท

3.2 การเตรียม porphyrins methyl ester

การเตรียม porphyrins methyl ester ได้ใช้วิธีของ Z.J PETRYKS (12) แต่ได้ดัดแปลงสารที่จะ esterified ใหม่ คือใช้ 5 % H_2SO_4 ใน CH_3OH ใส่ในอุจจาระโดยตรงและทิ้งไว้ค้างคืนแทนสาร BF_3 ใน CH_3OH ซึ่งจะทดลอง reflux บน water bath เป็นเวลา 20 นาที (โดยไม่ต้องทิ้งไว้ค้างคืน) นอกจากวิธีนี้แล้วยังมีวิธีอื่น ๆ อีกเช่น วิธีการทดลองของ GH Elder (8) ซึ่งหลักการส่วนใหญ่ก็คล้ายๆ กัน แต่การทดลองของ GH Elder นี้ ใช้ talc เป็นตัว adsorb porphyrin ก่อนที่จะนำไป esterified ด้วย 5 % H_2SO_4 ใน CH_3OH .

3.3 การวิเคราะห์แยก porphyrins methyl ester

ไตทดลองเลี้ยงหนูโทกิน HCB เป็นเวลา 3 เดือน พบว่าในแต่ละเดือนจะสามารถแยก porphyrin methyl ester ได้ โดยใช้เทคนิคทาง Thin layer chromatography ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายและสะดวกจะสามารถแยกได้ดังนี้

Proto, copro, penta, hexa, hepta, uro, porphyrin 1 และ porphyrin 2 porphyrin 1 ยังสามารถแยกได้เป็น isocoproporphyrin methyl ester และ de-ethylisocoproporphyrin methyl ester

จะได้ proto อยู่บนสุดของ plate และ porphyrin 2 อยู่ล่างสุด จากการทดลอง plate ที่ใช้ควรจะอบไว้ที่อุณหภูมิ 110 °C เป็นเวลาอย่างน้อย 3 ชม. แล้วทิ้งไว้ค้างคืนก่อนจะนำไป run TLC พบว่าจะสามารถแยก porphyrin methyl ester ออกได้ชัด จากค่า Rf value พอที่จะสังเกตได้ว่าแต่ละ spot เป็น porphyrin ชนิดใด แต่ถ้าวาง plate ที่ไม่ได้อบความร้อน แต่ทิ้งไว้หนึ่งคืน ก่อนจะนำมาใช้ จะพบว่าไม่สามารถแยก porphyrin methyl ester ได้ชัดพอที่จะบอกได้ว่า spot ไหนเป็น porphyrin ชนิดอะไร เพราะใน plate อาจจะมีน้ำอยู่ น้ำเป็นค้ำทำให้ porphyrin methyl ester เคลื่อนที่ได้น้อย

จากอุจจาระหนูที่ไม่ได้ให้กิน HCB พบว่าจะสามารถแยก porphyrin methyl ester ได้ดังนี้คือ

proto, copro, penta, uro จะได้ proto > copro > penta > uro

จะได้ proto อยู่บนสุดของ plate ส่วน uro อยู่ล่างสุด จะไม่พบ porphyrin 1 และ 2 จาก อุจจาระที่ไม่ให้ HCB เลย ในมีสสารหนูที่ให้กิน HCB และไม่ให้กิน HCB จะไม่พบ porphyrin 1 และ porphyrin 2 (Ref) เลย จะพบแต่เฉพาะในอุจจาระที่ให้กิน HCB เท่านั้น

เมื่อส่องจาก uv lamp จะพบว่า pme ในอุจจาระหนูที่ได้ HCB spot มีสีเข้มมากกว่าในอุจจาระหนูที่ไม่ให้ยา penta และ uroporphyrins methyl ester จะเห็น spot สีแดงจางมากในอุจจาระหนูที่ไม่ให้กิน HCB

3.4 การหาปริมาณเปรียบเทียบของ (pme)

จากอุจจาระหนู 20 g จะสามารถหาปริมาณ porphyrin methyl ester แต่ละชนิดได้ โดยชั่งหา น.น. ของ solet peak แต่ละชนิดของ porphyrin จะได้ค่า relative concentration ดังนี้ (ผลการทดลองในเดือนที่ 3)

Proto = 14.02 %, Copro = 23.39 %, porphyrin 1 = 12.28 %
 penta = 9.99 %, hexa = 11.48 %, hepta = 17.17 %, uro = 10.79 %
 porphyrin 2 = 0.87 %

Copro > hepta > proto > porphyrin 1 > uro > hexa > penta >
 porphyrin 2

จากการทดลองในแต่ละเดือนส่องจาก uv lamp พบว่า Copro เป็นสารที่ส่องได้ง่ายกว่า porphyrin ตัวอื่น ในเดือนแรกจะพบปริมาณ copro มากกว่า uro ในเดือนที่ 2 จะพบ uro มีปริมาณมากกว่า copro และในเดือนที่ 3 จะพบ copro มีปริมาณมากกว่า uro ผลการทดลองที่ได้ปริมาณ porphyrin methyl ester ไม่คงที่ อาจจะมากขึ้นหรือน้อยลงก็ได้ ขึ้นกับช่วงระยะเวลาที่ทดลอง ถ้าเปรียบเทียบผลการทดลองนี้กับการทดลองของ Robert Ockner (13) (ในรูปที่ 4 หน้า ๗) จะสังเกตเห็นว่าในช่วงเดือนแรกปริมาณ copro มากกว่า uro และประมาณช่วงปลายเดือนที่ 2 ปริมาณ uro จะมากกว่า copro เช่นเดียวกัน

อุจจาระหนูที่ไม่ให้ยา 40 g ทา relative concentration จะได้ดังนี้

Pro > copro > penta > uro ปริมาณ porphyrin methyl ester จะได้ ปริมาณน้อยกว่า porphyrin methyl ester จากอุจจาระหนูที่ให้ยามาก การทดลองครั้งนี้ต้องการได้ปริมาณ porphyrin methyl ester และ ชนิดจำนวนมาก เพื่อนำมาทำให้เกิดผลึกและศึกษา nmr spectrum จึงทำ TLC โดยใช้จำนวนหลายแผ่นและฉาบ silicagel ให้หนา และทุก band ชนิดเดียวกัน มารวมกัน แต่จากการทดลองหลังจาก run TLC แล้ว เมื่อส่องดูด้วย uv lamp จะพบว่าแต่ละ band ที่แยกออกในแต่ละ plate ถ้าเตรียมจาก porphyrin methyl ester ครั้งเดียวกัน จะมีลักษณะเหมือนกัน จะสามารถทำ porphyrin ชนิดเดียวกันมารวมกันได้ แต่ถ้าเตรียมจาก porphyrin methyl ester คนละครั้ง จะได้ลักษณะ band ในแต่ละ plate ไม่เหมือนกัน พิจารณาไม่ถือว่าเป็น porphyrin ชนิดเดียวกันหรือไม่ จึงไม่สามารถนำมารวมกันได้

ยกเว้น band ที่ 1 และ band ที่ 2 มีลักษณะแยกเด่นชัดกว่า band อื่น เพราะอายุส่วนบนของ plate พอจะสังเกตเห็นได้ จึงสามารถนำ porphyrin band 1 ที่ 1 ของทุก ๆ plate ในทุก ๆ ครั้ง มารวมกันได้ และ porphyrin band ที่ 2 ของทุก ๆ plate มารวมกันได้ porphyrin methyl ester ที่เตรียมได้ในแต่ละครั้ง จะเก็บไว้ในตู้มืด ณ อุณหภูมิห้อง ก่อนที่จะนำไปทำ preparative TLC

ในเดือนที่ 3 ได้ทำการทดลองใหม่ ทุก ๆ ครั้งหลังจากเตรียม porphyrin methyl ester ได้แล้ว นำไป run TLC เลย (ไม่ต้องทิ้งไว้ค้างคืน) พบว่าเมื่อส่องดูด้วย uv lamp ลักษณะแต่ละ band ที่แยกใน plate ทุก ๆ plate จะได้ลักษณะเดียวกัน จึงสามารถนำ pme ชนิดเดียวกัน มารวมกันได้

All rights reserved

จากการทดลองจึงคิดว่า การเตรียม porphyrin methyl ester ในแต่ละครั้ง แล้วทิ้งไว้ค้างคืน ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลาหลายวัน เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ porphyrin methyl ester บางตัวสลายตัว จึงทำให้ผลการทดลองของแต่ละ band ที่แยกออกมา ไม่อยู่ในลักษณะเดียวกันในแต่ละ plate จากการทดลองของ GH Elder (8) หลังจากสกัด porphyrin methyl ester ได้แล้ว จะเก็บไว้ในที่มืดอุณหภูมิต่ำ -20°C ซึ่งเป็นสภาวะที่ porphyrin methyl ester คงตัวที่สุด

3.5 การตกผลึกของ porphyrin methyl ester แต่ละชนิด

ปริมาณ copro และ protoporphyrin methyl ester ที่รวบรวมได้จากการทำ preparative TLC พยายามทำให้เกิดผลึก แต่ผลปรากฏว่าไม่สามารถจะเกิดได้ ทั้งนี้อาจจะเป็นเพราะว่า เมื่อ evaporate ให้ CHCl_3 ระเหยแล้ว ก็ยังมีของเหลวจำนวนเล็กน้อย เหลืออยู่ในช่องเหลวนี้อาจจะมีน้ำปนอยู่ จึงไม่สามารถทำให้เกิดผลึกได้

ในระยะเดือนที่ 3 แม้จะรวบรวม porphyrin แต่ละชนิดได้มากและทำการทดลองเพื่อให้เกิดผลึกเช่นเดียวกัน ผลปรากฏว่า ไม่สามารถเกิดผลึกเหมือนเดิม เพราะเมื่อ evaporate ให้ CHCl_3 ระเหยแล้ว ก็ยังมีของเหลวจำนวนเล็กน้อยอยู่เช่นเดิม ปริมาณที่รวบรวมได้คงจะมีปริมาณไม่มากพอ นี่ก็เป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ไม่สามารถทำให้เกิดผลึกได้ เพราะจำนวนหมู่ที่เลี้ยงไว้จำนวนน้อย และเหลือไม่กี่ตัวในช่องปลายเดือนที่สาม

3.6 ลักษณะ type ของ porphyrin methyl ester ที่แยกได้

De Matteis al (3) และ San Martin (2) ใ้รายงานว่า porphyrin methyl ester ใน urine หนู ที่เลี้ยงด้วย HCB เป็น type III ถ้าเป็นเช่นนั้นจริง ในอุจจาระหนูที่เลี้ยง HCB ก็ควรจะเป็น type III ด้วย ซึ่ง G H Elder (8) ก็ยืนยันเช่นนั้น