

ภาคผนวก

การศึกษาคุณสมบัติความคงตัวของสาร indocyanine green (ICG)

เป็นที่ทราบกันดีว่า ICG เป็นสารที่มีคุณสมบัติไม่คงตัว เมื่อละลายอยู่ใน aqueous solutions ทั่ว ๆ ไป (Plaa และ Hewitt, 1989; Kraft et al., 1991) แต่มีรายงานว่า เมื่อละลาย ICG ในซีรัมหรือสารละลายที่มีโปรตีนผสมอยู่ จะทำให้ ICG มีความคงตัวยิ่งขึ้น (Cherrick et al., 1960; Plaa และ Hewitt, 1989) ดังนั้น ผู้วิจัยจึงต้องการศึกษาถึงปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนที่เหมาะสมในการนำมาใช้เป็นสารละลาย สำหรับวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ ICG ในพลาสมา ตลอดจนต้องการศึกษาคุณสมบัติเกี่ยวกับการดูดกลืนแสงของ ICG เพื่อนำมาใช้ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

วิธีการทดลอง

1. ทำการชั่ง ICG แล้วละลายในน้ำกลั่น (DDW) ก่อน ให้ได้สารละลายเข้มข้น แล้วจึงละลายต่อไปด้วยน้ำกลั่น หรือสารละลายชนิดต่าง ๆ จนท้ายสุดให้ได้ ความเข้มข้นของ ICG เท่ากัน ($1.7 \mu\text{g/ml}$) ในสารละลายประเภทต่าง ๆ คือ DDW, NSS และในสารละลายโปรตีนที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน ตั้งแต่ 0.05 %-2.0 % ของ Bovine Serum Albumin (BSA) ใน NSS ขั้นตอนทั้งหมดปฏิบัติอย่างรวดเร็วตั้งแต่เริ่มการละลาย ICG และนำไปวัดการดูดกลืนแสงทันที
2. นำสารละลาย ICG ทั้งหมด ไปวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV/VIS Spectrophotometer ที่มีอุปกรณ์ multiple cuvette holder ที่ความยาวคลื่น 800 nm ที่เวลาต่าง ๆ คือ 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 90, 120, 150 และ 180 นาที
3. หลังจากที่ได้ค่าการดูดกลืนของตัวอย่างสารละลาย ICG มีค่าค่อนข้างคงที่แล้ว ทำการ scan ช่วงคลื่นการดูดกลืนแสง และหาความยาวคลื่นที่สามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุด (λ_{max})

การคำนวณ

Extinction coefficient (E) คำนวณจากสูตร

$$E = \frac{\text{Absorbance}}{\text{Conc.} \times l} \quad M^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

เมื่อ Conc คือ ความเข้มข้นของสาร (หน่วยเป็น Molar)

l คือ light path (เท่ากับ 1 cm)

ICG มี MW เท่ากับ 774.96, ความบริสุทธิ์ของสี ICG ตามที่ระบุในข้างขวดเท่ากับ 90 % ดังนั้นความเข้มข้น ICG 1.7 $\mu\text{g/ml}$ จะเท่ากับ $1.974 \times 10^{-6} \text{ M}$

$$\text{ดังนั้น} \quad E = \frac{\text{Absorbance}}{1.974 \times 10^{-6}} \quad M^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

ผลการทดลอง

สาร ICG เมื่อละลายอยู่ในสารละลาย DDW หรือ NSS จะมีสภาวะความคงตัวไม่ดี โดยพิจารณาจากคุณสมบัติในการดูดกลืนแสง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วง 30 นาทีแรก ICG ใน DDW และ NSS มีค่าลดลง 18-24 % เมื่อมี BSA 0.05 % ค่าลดลงน้อยกว่า 5 % และยิ่งความเข้มข้นของ BSA สูงขึ้น ค่าดูดกลืนแสงจะมีค่าลดลงน้อยมาก เมื่อเวลาผ่านไป 3 ชั่วโมง ก็ยังคงพบว่า สาร ICG ใน DDW หรือ NSS จะยังมีค่าลดลง แต่มีอัตราช้าลง ที่เวลา 3 ชั่วโมง ICG ใน DDW และ NSS มีค่าการดูดกลืนแสงลดลง 32-40 % ในขณะที่ ICG เมื่อละลายอยู่ในสารละลายที่มี albumin ผสมอยู่ จะมีความคงตัวดีมากกว่าเมื่อละลายอยู่ใน DDW หรือ NSS ICG เมื่ออยู่ในสารละลาย BSA 0.05 % จะมีค่าลดลง 12 % หลังเวลา 3 ชั่วโมง ในขณะที่ความเข้มข้น BSA ตั้งแต่ 0.5% ขึ้นไป ค่าการดูดกลืนแสงจะมีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก (น้อยกว่า 5%) ดังแสดงในภาพที่ 27

นอกจากนั้นแล้ว เมื่อทำการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 800 nm พบว่า สาร ICG ในปริมาณความเข้มข้นเท่ากัน (1.7 $\mu\text{g/ml}$) เมื่อละลายอยู่ในสารละลายโปรตีน จะสามารถดูดกลืนแสงได้มากกว่าเมื่อละลายอยู่ใน DDW หรือ NSS ตามลำดับ และถ้าความเข้มข้นของโปรตีนในสารละลายยิ่งสูง ก็จะทำให้ ICG สามารถดูดกลืนแสงได้สูง เป็นลักษณะ dose-response relationship ดังแสดงในค่า extinction coefficient ที่ได้แสดงใน

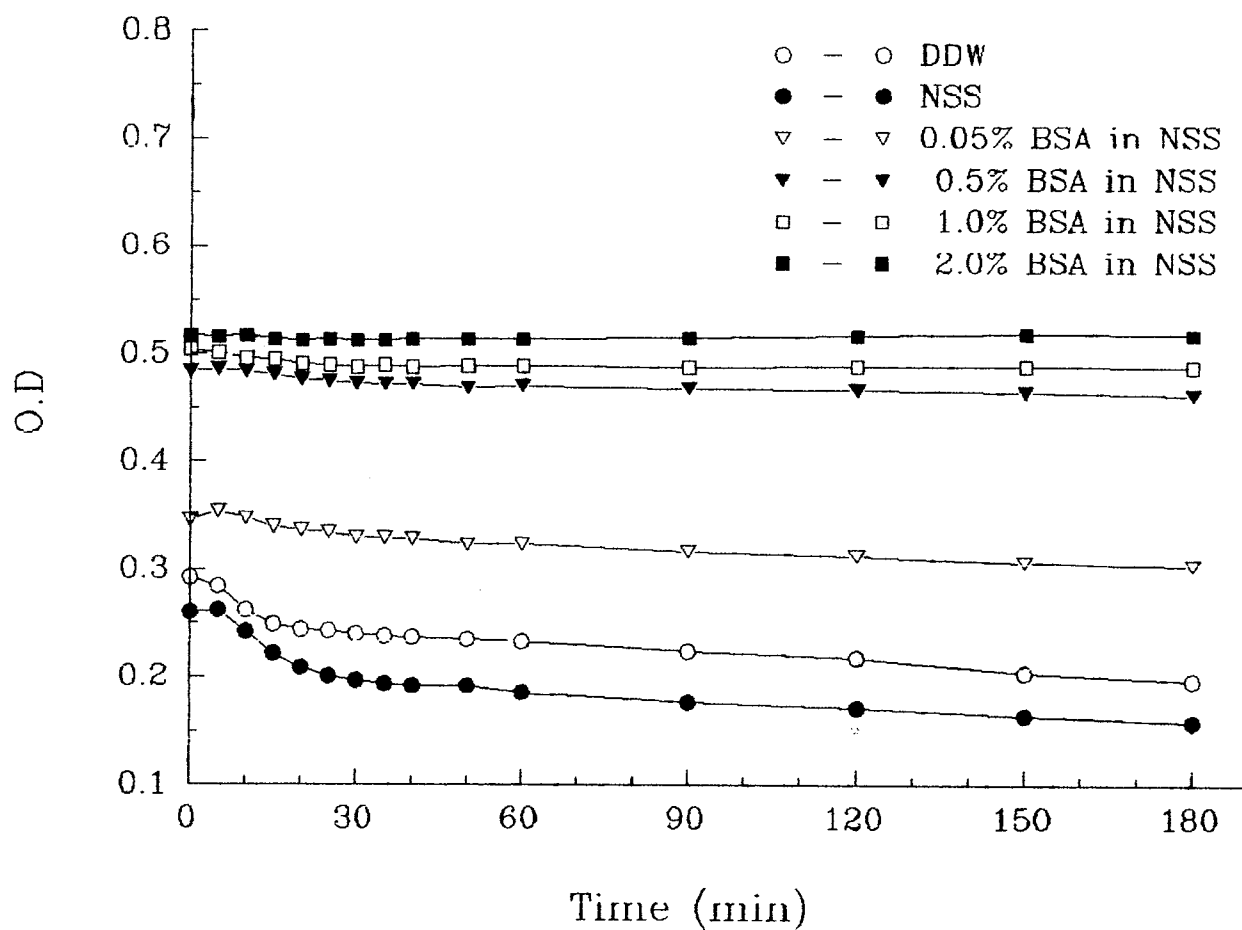
ตารางที่ 10 คือ ค่า E ที่ความยาวคลื่น 800 nm ซึ่งใช้กันทั่วไป และ E ที่ $\lambda_{\max}$

หลังจากการดูดกลืนแสงของสารละลาย ICG มีค่าคงที่ หรือเกือบคงที่ (ประมาณ 1.5 ชั่วโมง) ทำการ scan หาความยาวคลื่นที่ ICG สามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุด ($\lambda_{\max}$) พบว่า สาร ICG เมื่อละลายอยู่ใน DDW (curve A) หรือ NSS (curve B) จะมีค่า $\lambda_{\max}$ ใกล้เคียงกันคือ 777.5 และ 778 nm ตามลำดับ เมื่อสารละลายมี BSA ละลายอยู่ จะพบว่า $\lambda_{\max}$ เลื่อนเพิ่มสูงขึ้น ตั้งแต่ BSA 0.05% (curve C) มี $\lambda_{\max}$ 795 nm. และมีค่าคงที่ ที่ 803 nm เมื่อมี BSA ตั้งแต่ 0.5–2.0 % ดังแสดงในภาพที่ 28 และค่า $\lambda_{\max}$ แสดงในตารางที่ 10

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

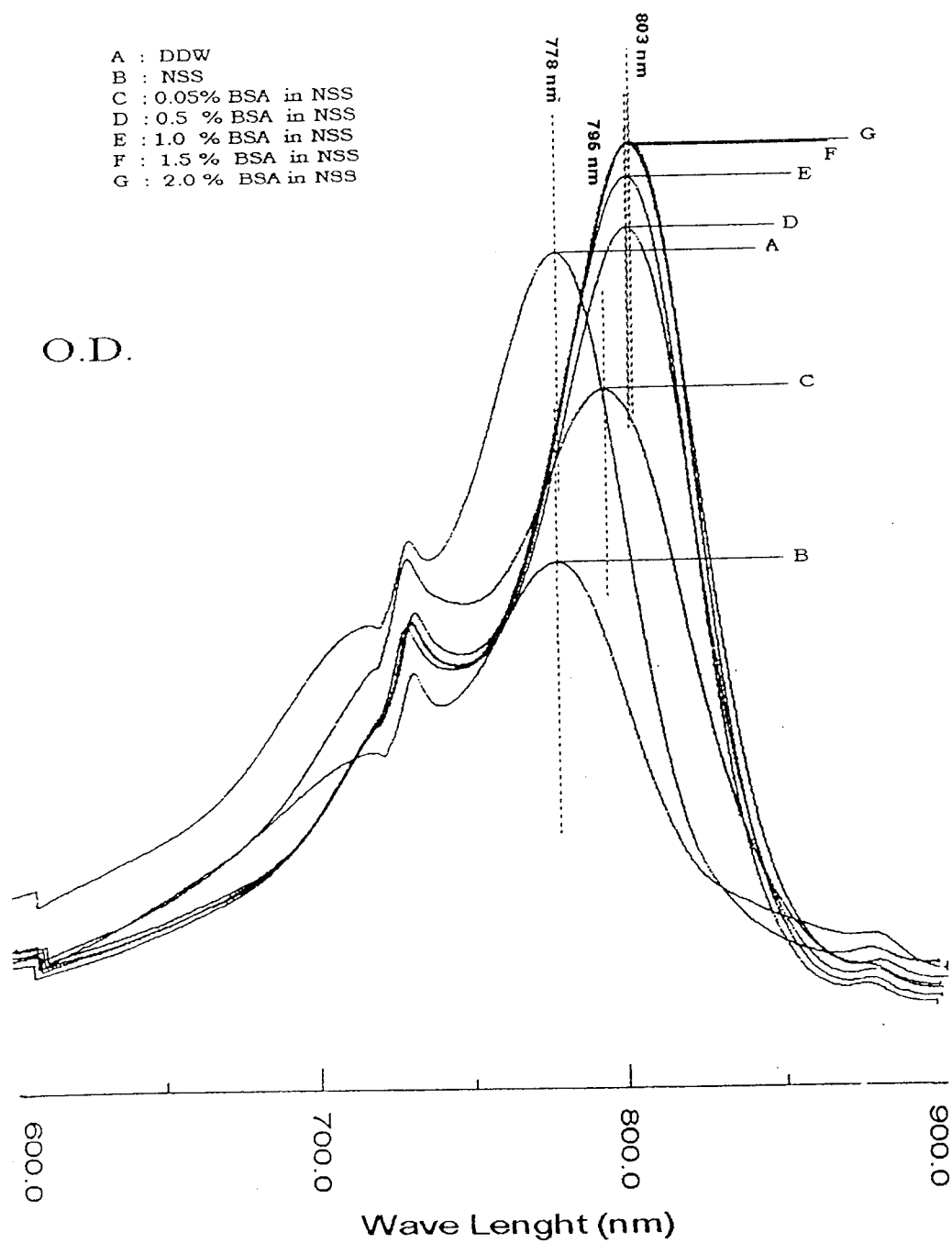
จากการศึกษาครั้งนี้ จะเห็นว่าสารละลาย ICG จะมีความคงตัวเมื่ออยู่ในสารละลายที่มี BSA นอกจากนี้ BSA ยังทำให้ extinction coefficient มีค่าสูงขึ้น (มีความไวมากขึ้น) และทำให้การดูดกลืนคลื่นแสงที่ $\lambda_{\max}$ มาคงตัวที่ประมาณ 803 nm ในขณะที่ ICG ในน้ำกลั่นหรือน้ำเกลือ หรือที่มี BSA ที่เจือจางมากจะมีค่า $\lambda_{\max}$ ต่ำกว่า การศึกษานี้สอดคล้องกับรายงานของ Cherrick และคณะ (1960) ที่พบว่า albumin ทำให้เกิดการเลื่อนของ absorption spectrum แม้ค่าตัวเลขของ $\lambda_{\max}$ จะพบที่ไม่เท่ากันก็ตาม ผู้วิจัยจึงเลือกใช้สารละลายโปรตีนในความเข้มข้น 1.0 % BSA ใน NSS มาเป็นสารละลายในการวัดค่าดูดกลืนแสงของสาร ICG ในพลาสติก โดยปล่อยให้ทิ้งไว้นาน 30 นาที จึงนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 800 nm โดยที่สารละลายที่เตรียมฉีดเข้าในสัตว์ และสารละลายที่ทำเป็นสารละลายความเข้มข้นมาตรฐานได้เตรียมขึ้นมาพร้อม ๆ กัน

Effects of BSA on the stability of ICG solution



ภาพที่ 27 ผลของสารละลายชนิดต่าง ๆ ต่อสภาวะความคงตัวของ ICG

Absorption Spectrum of Indocyanine Green



ภาพที่ 28 ค่า $\lambda_{\max}$ ของ ICG เมื่อละลายอยู่ในสารละลายชนิดต่าง ๆ

ตารางที่ 10 การดูดกลืนแสงของ ICG ในสารละลายชนิดต่าง ๆ

Concentration of BSA	Extinction coefficient at 800 nm ($M^{-1} cm^{-1}$)	λ_{max}	Extinction coefficient at λ_{max} ($M^{-1} cm^{-1}$)
Distilled water	1.00×10^5	778	1.41×10^5
Normal saline solution	0.81×10^5	777.5	1.09×10^5
0.05% BSA in NSS	1.54×10^5	795	1.52×10^5
0.1% BSA in NSS	—	798	—
0.5% BSA in NSS	2.34×10^5	802	2.36×10^5
1.0% BSA in NSS	2.47×10^5	802.5	2.50×10^5
1.5% BSA in NSS	—	803	—
2.0% BSA in NSS	2.62×10^5	803	2.67×10^5