View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Srinakharinwirot University: SWU e-Journals System

นิพนธ์ต้นฉบับ / Original article
Journal of Medicine and Health Sciences (Vol.15 No.2 August 2008)

การปรับค่า pH ที่เหมาะสมสำหรับสีย้อม Eosin ที่หมดอายุ โดยใช้กรด hydrocholic acid หรือ glacial acetic acid เพื่อการย้อมสีเนื้อเยื่อให้มีประสิทธิภาพดีที่สุด

สุมล จึงอุดมเจริญ, บุษบา ปันยารชุน, วิภาวี อนุพันธ์พิศิษฐ์
ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้ เพื่อศึกษาสีย้อม Eosin ที่หมดอายุแล้วให้สามารถนำกลับมาใช้ได้ใหม่โดยการใช้กรด 2 ชนิด การศึกษา ใช้สีย้อม Eosin Y 1% aqueous solution (สำเร็จรูปชนิดน้ำ) ที่หมดอายุแล้วนาน 4 ปี ทำการย้อมสีในเนื้อเยื่อลำไส้ของสัตว์ทดลอง โดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มเพื่อเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงหลังจากเติมกรด 2 ชนิด คือ Glacial acetic acid (GA) และ Hydrochloric acid (HCl) ที่ปริมาตรต่างๆ ดังนี้ ใน HCl ใช้ 22.32 μM (pH~5.94), 44.64 μM (pH~5.74), 66.96 μM (pH~4.80), 111.61 μM (pH~2.13), 446.43 μM (pH~0.79) ส่วน GA ใช้ 22.32 μM (pH~5.93), 111.61 μM (pH~5.23), 223.21 μM (pH~5.02), 446.43 μM (pH~4.59), 1,339.29 μM (pH~4.02) ส่วนกลุ่ม control ใช้สี eosin ชนิดน้ำทั้งสีใหม่และสีเก่าที่ไม่ได้เติมกรด ผลการศึกษาภาพและเปรียบเทียบประสิทธิภาพสีย้อม หลังจากเติมกรด พบว่า HCl ที่ 22.32 μM ติดสีย้อม eosin ได้ใกล้เคียงกับ GA ที่ 22.32 μM เมื่อเติมกรด HCl เพิ่มขึ้น เนื้อเยื่อลำไส้ติดสีชมพูเข้มขึ้นมากกว่าเมื่อเติม GA อย่างเห็นได้ชัดเจน ปริมาตรกรดที่เหมาะสม ให้สีใกล้เคียงกับ control ใหม่ อยู่ในช่วง 44.64-66.96 μM ส่วน GA จะมีการเปลี่ยนแปลงอย่างค่อยเป็นค่อยไป ช่วงที่เหมาะสมคือ 446.43-1,339.29 μM สำหรับการใช้ HCl ควรระมัดระวังการใช้ เพราะการใช้เพียงเล็กน้อยแต่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงที่เนื้อเยื่อมาก จากการศึกษาทำให้ทราบว่า การใช้กรดทั้ง 2 ชนิดที่มีปริมาตรและค่า pH ที่หน่วยต่างๆ กัน สามารถนำมาปรับสภาพของสีย้อม eosin ที่หมดอายุแล้วให้สามารถย้อมติดสีได้ใกล้เคียงกับสีใหม่ได้

(โครงการนี้ได้รับการสนับสนุนจากเงินรายได้ศูนย์การแพทย์ฯ ปีงบประมาณ 2551)

คำสำคัญ: สีย้อม eosin, ค่า pH, Hydrocholic acid, Glacial acetic acid

Adjusting the pH of expired eosin dye by using either hydrocholic acid or glacial acetic acid to improve the efficiency of staining tissue.

Sumon Jungudomjaroen, Busaba Panyarachun, Vipavee Anupunpisit✉
Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University

Abstract

This research work focused to study the improvement of expired eosin dye by using two types of acids. This dye is Eosin Y 1% aqueous solution that was commercial expired for 4 years. Eosin solution was divided into two groups that were tested with either hydrochloric acid (HCl) or Glacial acetic acid (GA) in different volume and pH. Acid quality of the first group was increased by using different volumes of HCl which were adjusted by 22.32 μM (pH~5.94), 44.64 μM (pH~5.74), 66.96 μM (pH~4.80), 111.61 μM (pH~2.13), 446.43 μM (pH~0.79) while acidity of the second group was adjusted by GA as 22.32 μM (pH~5.93), 111.61 μM (pH~5.23), 223.21 μM (pH~5.02), 446.43 μM (pH~4.59), 1,339.29 μM (pH~4.02), respectively. The control group used both new and old eosin dye. At low volume (22.32 μM), there was no significant difference on the quality of staining using HCl and GA. To compare the efficiency of both acids in higher volume and pH, the efficiency of intestine tissue's color staining was slightly changed little by using GA, whereas the more changing was revealed by using HCl. The efficient optimum range of HCl was 44.64-66.96 μM (pH~5.74-4.80), while the efficient range of GA was 446.43-1,339.29 μM (pH~4.59-4.02), compared with new control dye. The staining efficiency by using HCl should be careful because of rapid and strong impact in tissue. Therefore, this work will be useful to improve the efficiency of expired eosin dye by adjusting concentrations and pH of HCl and GA.

(This work was supported by the grant from HRH Princess Mahachakri Sirindhorn Medical Center)

Keywords: Eosin dye, pH, Hydrocholic acid, Glacial acetic acid

Vipavee Anupunpisit✉
Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University
114 Sukhumvit 23, Wattana, Bangkok 10110, Thailand. E-mail: vanupunp@swu.ac.th

บทนำ

การศึกษาโครงสร้างของสิ่งมีชีวิตที่มีขนาดเล็ก เทคนิคทางเนื้อเยื่อวิทยาเป็นวิธีการที่สำคัญยิ่งในการเตรียมเนื้อเยื่อ และเซลล์สำหรับการเรียนการสอนและการวิจัยในสาขาต่างๆ

ขั้นตอนการย้อมสี เป็นขั้นตอนหนึ่งในขบวนการทางเนื้อเยื่อวิทยา เพื่อให้เห็นความแตกต่างภายในของเซลล์และเนื้อเยื่อ โดยสีแต่ละชนิดจะย้อมติดส่วนต่างๆ ของเซลล์และเนื้อเยื่อแตกต่างกันออกไป สีที่ใช้ย้อมส่วนมาก มีคุณสมบัติเป็นกรด หรือ เป็นด่าง วิธีการย้อมซึ่งใช้กันเป็นประจำคือ Routine staining โดยการใช้สี hematoxylin เป็นสีแรก (primary stain) และใช้สี eosin เป็นสีที่ 2 (counterstaining) นิยมใช้ตัวย่อของสีย้อมทั้งสอง คือ H&E stain สีย้อมชนิดแรก ส่วนใหญ่เป็น basic dye เพื่อย้อม nuclei ส่วน สีย้อมซ้ำ ส่วนใหญ่ เป็น acid dye ย้อม ไซโตพลาสม หรือส่วนอื่นของเซลล์และเนื้อเยื่อ ที่ไม่จำเพาะเจาะจงเท่าสีชนิดแรก[1]

จากคุณสมบัติของ eosin ซึ่งมี คุณสมบัติเป็น acid dye ทำให้ผู้วิจัยมีความสนใจที่จะทดสอบคุณสมบัติของสี eosin ที่หมดอายุแล้ว โดยการเพิ่มความเป็นกรดที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้กรด 2 ชนิด hydrocholic acid (HCl) กรดแก่ และ glacial acetic acid (GA) กรดอ่อน ว่ามีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของสี eosin แตกต่างกันอย่างไรในกรด 2 ชนิด

วิธีการศึกษา

นำตัวอย่างลำไส้สัตว์ทดลอง มาผ่านขบวนการ fixation ด้วย Bouin's solution 24 ชม. washing ด้วย 70% แอลกอฮอล์ จนกว่าสีของ Bouin's จางลง, dehydration ด้วย 70%, 95%, 100% แอลกอฮอล์ อย่างละ 2 ครั้ง นานครั้งละ 2 ชม. clearing ด้วย xylene 2 ครั้ง ครั้งละ 2 ชม. infiltration ด้วย พาราฟิน 2 ครั้ง ครั้งละ 2 ชม. (ขั้นตอนตั้งแต่ dehydration จนถึง infiltration ใช้ automatic tissue processing) หลังจากนั้นมาผ่านขั้นตอน การฝังเนื้อเยื่อลงในพาราฟิน การตัดชิ้นเนื้อ การย้อมสี[2,3]

ขั้นตอนการเตรียมสีย้อม

eosin Y 1% aqueous solution ชนิดน้ำสำเร็จรูป (รุ่นใหม่หมดอายุปี 09-2009 และ รุ่นเก่าหมดอายุปี 07-2004 นำสี eosinทั้ง 2 ชนิด มาเตรียมเป็น working solution โดยแต่ละชนิดเติม 95% แอลกอฮอล์ อัตราส่วน 1:1 ผสมกัน นำ working solution มาตวงด้วยกระบอกตวง ตวงใส่บีกเกอร์ ขนาด 50 ml. บีกเกอร์ละ 40 ml.

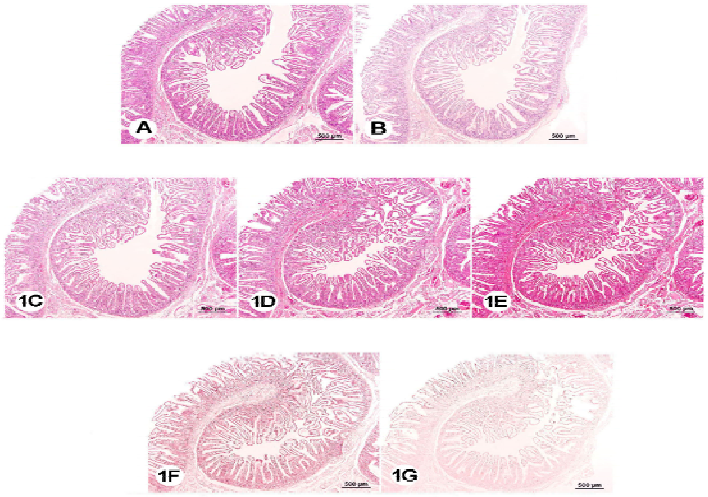
ขั้นตอนการศึกษา

แบ่งการศึกษาเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มควบคุม(control) และ กลุ่มทดลอง (เติมกรด) กลุ่มควบคุม ใช้สี eosin ชนิดน้ำสำเร็จรูป ทั้งสีใหม่และสีเก่า โดยกลุ่มนี้ไม่ต้องเติมกรด อย่างละ 1 บีกเกอร์ ส่วนกลุ่มทดลอง นำสีย้อม eosin สีเก่า มาแบ่งเป็น 2 กลุ่ม เพื่อทดสอบกรด 2 ชนิด คือ HCl และGA กลุ่ม HCl เติมความเข้มข้นของกรด 22.32, 44.64, 66.96, 111.61 μM และ 446.43 μM ส่วนกลุ่ม GA เติมความเข้มข้นของกรด 22.32, 111.61, 223.21 μM, 446.43 μM และ 1,339.29 μM

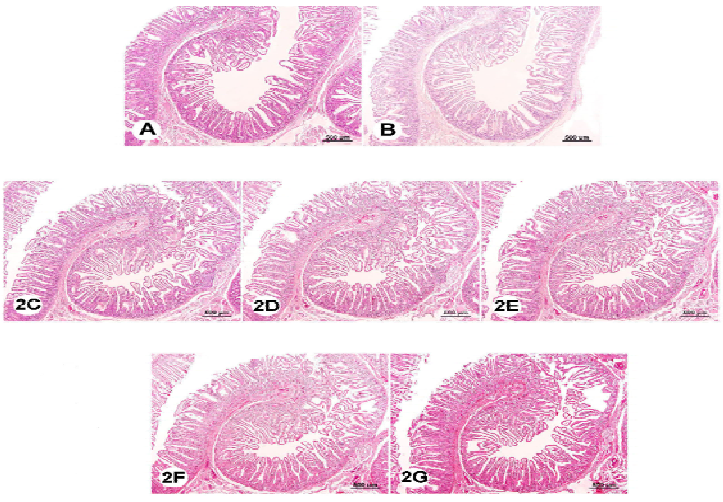
ผลการศึกษา

การติดสีย้อม Eosin ชนิดน้ำสำเร็จรูป ในภาพ A ซึ่งเป็นสีใหม่ เปรียบเทียบกับสีย้อม eosin ชนิดน้ำสีเก่า ภาพ B (control) ในทั้ง 2 รูป พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด ภาพ A ย้อมติดสีเข้ม มีความสวยงามมากกว่าภาพ B เมื่อนำสีย้อม eosin เก่ามาเติมความเข้มข้นของกรดทั้ง 2 ชนิด คือ HCl ในรูปที่ 1 ได้ภาพ 1C-1G และ GA ในรูปที่ 2 ได้ภาพ 2C-2G การเปลี่ยนแปลงของภาพ 1C-1G ในรูปที่ 1 มีการเปลี่ยนแปลงการติดสีอย่างรวดเร็วเมื่อมีการเติม HCl เพิ่มขึ้น โดยภาพ 1C-1E มีการติดสีเข้มขึ้นตามการเพิ่มของปริมาณ

กรด HCl ภาพ 1F สีเริ่มซีดและสีหายไปในภาพ 1G ส่วนการเปลี่ยนแปลงในรูปที่ 2 ภาพ 2C-2G มีการเปลี่ยนแปลงการติดสีอย่างช้าๆ ซึ่งมีสีเข้มมากที่สุดในภาพ 2G เมื่อนำภาพ 1C ในรูปที่ 1 เปรียบเทียบกับภาพ 2C ในรูปที่ 2 ที่ความเข้มข้น 22.32 μM ภาพทั้ง 2 ติดสีย้อม eosin ได้ใกล้เคียงกัน ปริมาณกรด HCl ที่เติมแล้วให้สีใกล้เคียงกับ control อยู่ในช่วง 44.64-66.96 μM (ภาพ 1D และภาพ 1E ในรูปที่ 1)สำหรับ GA อยู่ในช่วง 446.43-1,339.29 μM (ภาพ 2F และ ภาพ 2G ในรูปที่ 2)



รูปที่ 1 ภาพแสดงเนื้อเยื่อลำไส้ ที่ผ่านการเติมกรด Hydrocholic เปรียบเทียบกับ control
ภาพ A – B: เป็นภาพ control ที่ไม่ได้เติมกรด โดยภาพ A เป็นภาพที่ย้อมด้วยสีใหม่ pH 7.40 ภาพ B เป็นภาพที่ย้อมด้วยสีเก่า pH 6.87 ที่หมดอายุแล้วนาน 4 ปี
ภาพ 1C–1G: เป็นภาพที่เติมกรด HCl ที่ความเข้มข้น 22.32 μM pH 5.94, 44.64 μM pH 5.74, 66.96 μM pH 4.80, 111.61 μM pH 2.13 และ 446.43 μM pH 0.79 ตามลำดับ



รูปที่ 2 ภาพแสดงเนื้อเยื่อลำไส้ ที่ผ่านการเติมกรด Glacial acetic เปรียบเทียบกับ control
ภาพ A – B : เป็นภาพ control ที่ไม่ได้เติมกรด โดยภาพ A เป็นภาพที่ย้อมด้วยสีใหม่ pH 7.40 ภาพ B เป็นภาพที่ย้อมด้วยสีเก่า pH 6.87 ที่หมดอายุแล้วนาน 4 ปี
ภาพ 2C–2G: เป็นภาพที่เติมกรด GA ที่ความเข้มข้น 22.32 μM pH 5.93, 111.61 μM pH 5.23, 223.21 μM pH 5.02, 446.43 μM pH 4.59, และ 1,339.29 μM pH 4.02 ตามลำดับ

วิจารณ์

จากการศึกษา eosin ชนิดน้ำ ที่หมดอายุแล้วนาน 4 ปี ให้สามารถนำกลับมาใช้ได้ใหม่โดยการเพิ่มความเป็นกรด โดยใช้กรดแก่ HCl[4] และกรดอ่อน GA[5,6] พบว่าการเพิ่มความเป็นกรด (ไม่ว่าเป็นกรดแก่หรือกรดอ่อน) สามารถเพิ่มความเข้มในการติดสีย้อม eosin ได้มากขึ้น[7] กว่าสีย้อม eosin ชนิดน้ำที่ไม่ได้เติมกรด (control สีเก่า) เนื่องจาก HCl เป็นกรดแก่ จึงใช้ปริมาณกรดเพียงเล็กน้อยก็มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วแต่การเพิ่มความเข้มของสีจะเพิ่มมากที่สุดที่ความเข้มข้นหนึ่งแล้วจะมีสีซีดลงจนสีชมพูนั้นหายไป ปริมาณกรดที่เหมาะสมที่ทำให้สีย้อม eosin ติดสีเนื้อเยื่อได้ใกล้เคียงกับ control สีใหม่ อยู่ในช่วง 44.64-66.96 μM ดังนั้นการใช้กรดแก่จึงควรมีความระมัดระวังในการนำไปใช้ เพราะถ้าใช้ปริมาณมากเกินไปแทนที่จะได้สีที่เข้มขึ้นกลับทำให้สีย้อมนั้นหายไป ส่วน GA เป็นกรดอ่อนจึงต้องใช้ปริมาณที่มากจึงจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของสีให้เข้มมากขึ้นได้ ปริมาณกรดที่เหมาะสม อยู่ในช่วง 446.43-1,339.29 μM ต่อ ปริมาณสีย้อม eosin สำเร็จรูปชนิดน้ำ 40 ml. ปริมาณ GA ที่ได้จากการศึกษา ใช้ปริมาณใกล้เคียงกันคุณศุภลักษณ์ โรมรัตนพันธ์ 2545 กล่าวไว้ว่า ควรเพิ่ม glacial acetic acid เป็น 1-1.5 ml ต่อ100 ml.[8]

ผลการศึกษา ทำให้ทราบว่า สีย้อม eosin สำเร็จรูปชนิดน้ำ เมื่อหมดอายุแล้วคุณสมบัติการติดสีลดลง สามารถยืดอายุการใช้งานได้ด้วยการเติมกรด ซึ่งถ้าใช้ HCl: ซึ่งอยู่ในกลุ่มของกรดแก่ก็ต้องเพิ่มความระมัดระวังเกี่ยวปริมาณที่ใช้เนื่องจากปริมาณกรดที่ใช้แม้เพียงเล็กน้อยก็มีผลต่อการเปลี่ยนแปลง สำหรับอายุการใช้งานหลังจากเมื่อแก้ไขด้วยการเติมกรดแล้ว จะนานเท่าไร ต้องมีการศึกษาต่อไป

กิตติประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับการสนับสนุนจาก เงินรายได้ศูนย์การแพทย์ฯ ปีงบประมาณ 2551

เอกสารอ้างอิง

1. เวคิน นภนิตย์. เทคนิคทางเนื้อเยื่อวิทยา สำนักพิมพ์ห้างขายยาตรานกยูง พิมพ์ครั้งที่ 1, 2524.
2. Luna, Lee G. Routine Mayer's Hematoxylin and Eosin stain Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology. 3rd edition, McGrau Hill Publishers, New York 1960.Preece, Ann. A manual for histologic technicians. 3rd edition Little Broun&Co., Boston, 1968:428.
4. กรดไฮโดรคลอริก จากวิกิพีเดีย สารานุกรมเสรี p.1-5. Available from: URL: http://th.wikipedia.org/wiki/.
5. Chemtutor Acids and bases p.1-29. available from: URL: http://www.chemtutor.com/acid.htm.
6. Bodner Research Web pH, pOH, and K. Available from: URL: http://chemed.chem, purdue.edu/genchem/topicreview/bp/ch17/ph.php.
7. สุมล จึงอุดมเจริญ. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงสีย้อม Eosin โดยใช้กรด-ด่าง การประชุมวิชาการกายวิภาคศาสตร์ (ประเทศไทย) ครั้งที่ 31 ระหว่างวันที่ 30 เม.ย.-2 พ.ค. 2551 ณ โรงแรมเมธาวลัย อ.ชะอำ จ.เพชรบุรี 2551:84-7.
8. ศุภลักษณ์ โรมรัตนพันธ์. เทคนิคเนื้อเยื่อสัตว์ สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ พิมพ์ครั้งที่ 1 ก.ย. 2545.