

การศึกษาฮอร์โมนของคนที่เป็นโรคคอพอกเป็นพิษหลังจากการรักษาด้วย ^{131}I
 (Hormonal Studies in Grave's Disease after Treatment with ^{131}I)



โดย

นางสาว วราพรรณ คานอตรา วท.บ.(2507)

004506

วิทยานิพนธ์นี้

เป็นส่วนประกอบการศึกษาตามระเบียบปริญญาโทบัณฑิต

ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แผนกวิชาเคมี (สาขาชีวเคมี)

พ.ศ. 2511

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นักศึกษานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนประกอบ
การศึกษาตามระเบียบปริญญามหาบัณฑิต


.....
//ด.ม. ๒๕๖๖

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการตรวจวิทยานิพนธ์

..... ๕๓๖๖ ๑๒๑๒ : ประธานกรรมการ

..... ๑๒๑๒ ๑๒๑๒ : กรรมการ

.....  : กรรมการ

..... ๑๒๑๒ : กรรมการ

อาจารย์ผู้ควบคุมงานวิจัย นายแพทย์ วิชัย โปษยะจินดา

วันที่ ๑๑ เดือน พฤษภาคม พ.ศ. ๒๕๖๖

เรื่อง : การศึกษาฮอร์โมนของคุณที่เป็นโรคคอพอกเป็นพิษ หลังการรักษาด้วย ^{131}I
 ผู้เขียน : นางสาว วราพรรณ คานอุตรา
 แผนกวิชา : เคมี
 วันที่ : 2 พฤษภาคม 2511

บทคัดย่อ

ความผิดปกติของธัยรอยด์ฮอร์โมนนั้นเกิดจากสาเหตุต่าง ๆ หลายประการ สาเหตุที่สำคัญอันหนึ่งคือ ความผิดปกติที่เกิดจากการสร้างฮอร์โมนในชั้นโคซันหนึ่ง การศึกษาความผิดปกติของธัยรอยด์ฮอร์โมนนั้น ควรจะศึกษาทั้งทางปริมาณและคุณภาพ การศึกษาทางปริมาณนิยมใช้วิธีหา protein bound iodine (PBI) หรือ butanol extractable iodine (BEI) และวิธีที่เหมาะสมที่สุดในการศึกษาความผิดปกติในการสร้างฮอร์โมนจะเป็นวิธีโครมาโตกราฟี

ในการศึกษานี้ใช้วิธีที่ทำให้เป็นกรดแล้วสะกัดด้วย n-butanol ทำ thin-layer chromatography (TLC) ซึ่งใช้ silicagel GF₂₅₄ หรือ silicagel HF₂₅₄ เป็น adsorbent. Solvent system ที่พบว่ายกธัยรอยด์ฮอร์โมนได้คือ 5 ชนิด คือ

Ethyl acetate - Methanol - 6N NH ₄ OH	5:2:3
Ethyl acetate - Methanol - 2N NH ₄ OH	5:2:3
Amyl alcohol - Dioxane - 3N NH ₄ OH	2:2:1 หรือ 1:3:1 และ
Ethanol - Methylene ketone - 6N NH ₄ OH	1:4:1

จากการศึกษาพบว่าเราสามารถจะหาปริมาณของฮอร์โมนได้โดยทำ autoradiography (ARG) ของซีรัมคนไข้ซึ่งได้รับ ^{131}I เพื่อทำให้ฮอร์โมนเปลี่ยนเป็นสารกัมมันตรังสี อัตราส่วนของธัยรอยด์ฮอร์โมนแต่ละชนิดหาได้โดยการเปรียบเทียบความเข้มบนฟิล์มซึ่งอ่านจาก densitometer และเนื่องจากปริมาณของ T₄ นั้นหาได้อย่างแน่นอนโดยวิธี radioimmuno assay ปริมาณที่แน่นอนของฮอร์โมนตัวอื่น ๆ ก็อาจจะหาได้โดยคำนวณเทียบจากปริมาณ T₄ ตามอัตราส่วนที่หาได้จาก ARG

ผลของการใช้วิธี TLC ศึกษาซีรัมคนไข้คอพอกเป็นพิษ (Grave's Disease) หลังรับการรักษาด้วย ^{131}I แล้วประมาณ 4-7 วัน พบแต่ซีรัมกัมมันตรังสี 9 ราย ส่วนอีก 9 รายพบซีรัมกัมมันตรังสีและ iodine compound อีกตัวหนึ่งซึ่งมี R_f 0.72 ซึ่งน่าจะศึกษาต่อไปว่าเป็นอะไร เพราะถ้าสารตัวนี้ไม่ใดเป็น artifact ที่เกิดจากการทดลองก็น่าจะสงสัยว่าสารตัวนี้มีความเกี่ยวข้องกับโรคคอพอกเป็นพิษที่พบในประเทศไทย

Title : Hormonal Studies in Grave's Disease after Treatment with ¹³¹I
Name : Miss Varapan Danutra
Department : Chemistry
Date : 2 May 1968

Abstract

There are several etiology for thyroid hormone disorders. One significant factor is abnormality in the metabolic pathway. Both quantitative and qualitative study of thyroid hormones should be applied to study pathologic physiology of the disease. Protein bound iodine (PBI) or butanol extractable iodine (BEI) can be used to assay the disorder in amount of production and the chromatographic analysis is probably the best parameter for evaluation of abnormal biosynthesis of the hormones.

The thin - layer chromatography (TLC) using silicagel HF₂₅₄ or silicagel GF₂₅₄ as adsorbent of n-butanol extracted acidified serum was used in this study. Five solvent systems, Ethyl acetate-Methanol-6N NH₄OH 5:2:3, Ethyl acetate-Methanol-2N NH₄OH 5:2:3, Amyl alcohol - Dioxane-3N NH₄OH 2:2:1 or 1:3:1, and Ethanol-Methylethylketone-6N NH₄OH 1:4:1, were found to be effective in separating the thyroid hormones.

Through this study another possibility of a new method for semi-quantitative measurement of the thyroid hormones is suggested. The method is autoradiography (ARG) of the serum chromatogram after ¹³¹I was administered to the subject to render the hormones radioactive. The ratio between each fraction of the hormones can be estimated through densitometer readings of the dark spots intensity on exposed film. Since T₄ could be accurately measured by radioimmuno assay, the absolute amount of the other fraction can be calculated through the ratio obtained from ARG.

Serum of nine cases from 18 thyrotoxic patients, taken 4-7 days after the treatment, with ¹³¹I, analysed by TLC showed only T₄. The rest of them showed T₄ and another iodocompound with an R_f 0.72. This compound is interesting because it may be related to unusual pathologic physiology of thyrotoxicosis found in Thailand, if definite conclusion can be made that this iodocompound is not an experimental artifact.

คำขอบคุณ

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณท่านผู้มีรายนามต่อไปนี้ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำและช่วยเหลือ
ให้วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลงด้วยดี

อาจารย์ นายแพทย์ วิชัย โปษยะจินดา

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กำจัด มงคลกุล

อาจารย์ แพทย์หญิง มาคมครอง วาสนะสมสิทธิ์

อาจารย์ นายแพทย์ พันิช มโนทัย

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย และ บริษัท การบินไทย ที่ได้ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยเรื่องนี้

วราพรรณ คานอุตรา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ.....	ก
คำขอบคุณ.....	ง
สารบัญ.....	จ
รายการตารางประกอบ.....	ช
รายการรูปประกอบ.....	ซ
บทนำ.....	1
วัสดุที่ใช้.....	8
วิธีทำ	
1. การเตรียม plate สำหรับทำโครมาโตกราฟี.....	9
2. การเตรียมตัวทำละลายสำหรับโครมาโตกราฟี.....	9
3. การหา solvent system ที่เหมาะสมในการแยก Thyroxine มาตรฐาน.....	9
4. การทำ iodination ของ Thyroxine T_3 และ T_4 เพื่อใช้ในการหาเปอร์เซ็นต์การสะกั Thyroxine ในตัวอย่างด้วยตัวทำละลายอินทรีย์.....	10
5. การหาเปอร์เซ็นต์การสะกั labeled thyroid hormone ที่เติมลงใน pooled serum.....	11
6. การอ่าน UV-absorption ของ Thyroxine มาตรฐานโดย UV-spectrophotometer.....	11
7. การหาความสัมพันธ์ของปริมาณ ^{131}I กับความเข้มของฟิล์ม.....	12
8. การทำโครมาโตกราฟีของ labeled thyroid hormone โดยใช้ pooled serum เป็น carrier.....	12



9. การทำโครมาโตกราฟฟีของธัยรอยด์ฮอร์โมนมาตรฐานที่เติมลงใน pooled serum.....	12
10. การทำโครมาโตกราฟฟีของซีรัมคนไข้ที่เป็นโรคคอพอกเป็นพิษ.....	13
ผลการทดลอง	
1. ผลการหา solvent system ที่เหมาะสมในการแยกธัยรอยด์ฮอร์โมนมาตรฐาน.....	14
2. ผลการใช้ silicagel HF ₂₅₄₊₃₆₆	22
3. ผลการทำ iodination ของธัยโรซีน T ₃ และ T ₄	23
4. ผลการสกัด labeled thyroid hormone ที่เติมลงใน pooled serum... ..	24
5. ผลการอ่าน UV-spectrum ของธัยรอยด์ฮอร์โมนมาตรฐานโดย UV-spectrophotometer.....	28
6. ผลการหาความสัมพันธ์ของปริมาณ ¹³¹ I กับความเข้มของฟิล์ม.....	28
7. ผลการทำโครมาโตกราฟฟีของ labeled thyroid hormone โดยใช้ pooled serum เป็น carrier.....	28
8. ผลการทำโครมาโตกราฟฟีของธัยรอยด์ฮอร์โมนมาตรฐานที่เติมลงใน pooled serum.....	29
9. การทำโครมาโตกราฟฟีของซีรัมคนไข้ที่เป็นโรคคอพอกเป็นพิษ.....	31
วิจารณ์ผลการทดลอง.....	33
สรุปผลการทดลอง.....	41
บรรณานุกรม.....	43

รายการตารางประกอบ

	หน้า
ตารางที่ 1 แสดง R _f value ของ Thyroxine มาตรฐานเมื่อใช้ silicagel HF ₂₅₄	14
ตารางที่ 2 แสดง R _f value ของ Thyroxine มาตรฐานเมื่อใช้ silicagel GH ₂₅₄	15
ตารางที่ 3 แสดงผลการสกัด labeled thyroid hormone ที่เติมลงใน pooled serum.....	24

รายการรูปประกอบ

หน้า

รูปที่ 1	แสดง R_f value ของซึบรอยคัสอร์โมนมาตรฐานใน solvent system 21 ชนิด เมื่อใช้ plate silicagel HF ₂₅₄	15
รูปที่ 2	แสดง R_f value ของซึบรอยคัสอร์โมนมาตรฐานใน solvent system 21 ชนิด เมื่อใช้ plate silicagel GF ₂₅₄	17
รูปที่ 3	แสดงผลการแยกซึบรอยคัสอร์โมนมาตรฐาน เมื่อใช้ solvent system Ethanol Methyl ethyl ketone-2N NH ₄ OH 1:4:1.....	18
รูปที่ 4	แสดงผลการแยกซึบรอยคัสอร์โมนมาตรฐาน เมื่อใช้ solvent system Amyl alcohol-Dioxane - 3 N NH ₄ OH 2:2:1.....	19
รูปที่ 5	แสดงผลการแยกซึบรอยคัสอร์โมนมาตรฐาน เมื่อใช้ solvent system 2-butanol-2.5 % NH ₃ w/v 3:2.....	19
รูปที่ 6	แสดงผลการแยกซึบรอยคัสอร์โมนมาตรฐาน เมื่อใช้ solvent system n-butanol-sat. with 2 N HOAc.....	20
รูปที่ 7	แสดงผลการแยกซึบรอยคัสอร์โมนมาตรฐาน เมื่อใช้ solvent system ก. Ethyl acetate-Methanol-2 N NH ₄ OH 5:2:3 ข. Ethyl acetate-Methanol-6 N NH ₄ OH 5:2:3.....	20
รูปที่ 8	แสดงผลการแยกซึบรอยคัสอร์โมนมาตรฐาน เมื่อใช้ solvent system ก. Ethanol - Methyl ethyl ketone- 6N NH ₄ OH 1:4:1 ข. Amyl alcohol - Dioxane - 3 N NH ₄ OH 1:3:1 ค. Amyl alcohol - Dioxane - 3 N NH ₄ OH 2:2:1.....	21

รายการประกอบ (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 9 แสดงผลการใช้ silicagel HF₂₅₄₊₃₆₆ แทน silicagel HF₂₅₄ หรือ silicagel GF₂₅₄..... 22

รูปที่ 10 แสดงผลการ iodination ของ thyroxine..... 23

รูปที่ 11 แสดง UV-spectrum ของ MIT, DIT, T₃ และ T₄ 25

รูปที่ 12 แสดงความสัมพันธ์ของความเข้มของ Kodak X-ray film กับ ปริมาณ ¹³¹I 26

รูปที่ 13 แสดงความสัมพันธ์ของความเข้มของ Kodak X-ray film กับ เวลา ที่ expose..... 27

รูปที่ 14 แสดงออโตเรดิโอแกรมของ labeled thyroid hormone เมื่อ มี pooled serum และไม่มี pooled serum เป็น carrier... 29

รูปที่ 15 แสดงโครมาโตแกรมของ thyroxine มาตรฐานที่มี pooled serum เป็น carrier..... 30

รูปที่ 16 แสดงโครมาโตแกรมของ thyroxine ที่เป็นโรคคอพอกเป็นพิษที่พบ iodocompound ที่นอกเหนือไปจาก T₄..... 31

รูปที่ 17 แสดงโครมาโตแกรมของ thyroxine ที่เป็นโรคคอพอกเป็นพิษที่พบแต่ T₄.. 32